UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Deposição de colesterol de uma microemulsão lipídica em
fragmentos vasculares removidos de pacientes durante a cirurgia de
revascularização miocárdica: estudos *in vivo* e *in vitro*

Ricardo David Couto

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Titular Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo
2005

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Deposição de colesterol de uma microemulsão lipídica em
fragmentos vasculares removidos de pacientes durante a cirurgia de
revascularização miocárdica: estudos *in vivo* e *in vitro*

Ricardo David Couto

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Titular Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo
2005

18.928

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013028

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Couto, Ricardo David

C871d Deposição de colesterol de uma microemulsão lipídica em fragmentos vasculares removidos de pacientes durante a cirurgia de revascularização miocárdica : estudos *in vivo* e *in vitro* / Ricardo David Couto. -- São Paulo, 2005. 104p.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Maranhão, Raul Cavalcante

1. Bioquímica clínica : Medicina 2. Metabolismo lipídico
3. Doenças metabólicas : Medicina I. T. II. Maranhão, Raul Cavalcante, orientador.

616.0756 CDD

Ricardo David Couto

Deposição de colesterol de uma microemulsão lipídica em
fragmentos vasculares removidos de pacientes durante a cirurgia de
revascularização miocárdica: estudos *in vivo* e *in vitro*

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
orientador/presidente

Prof. Dr. Sergio Paulo Bydlowski
1º. examinador

Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky
2º. examinador

Prof. Dr. Raul Dias dos Santos Filho
3º. examinador

Profa. Dra. Ana Paula Marte Chacra
4º. examinador

São Paulo, 12 de abril de 2005.

EPÍGRAFE...

“lehavin u-le’ askil; lish’moá, lilmod u-lelamed; lish’mor vê-la’ assot; u-lekaiem” – compreender e conceber; ouvir, aprender e ensinar; guardar e agir, manter.

A conexão entre uma coisa e outra em nossas vidas não é evidente, mas existe e está mergulhada numa riqueza abundante de saber...
Precisamos aprender a entender o oculto do aparente para superar os obstáculos que impedem a nossa trajetória...

Modificado de: O Segredo Judaico
de Resolução de Problemas

Rav Nilton Bonder

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador, Prof. Titular Raul Cavalcante Maranhão, pelo direcionamento dado a minha vida como docente e pesquisador, pela paciência, confiança, amizade e conhecimentos transmitidos durante o programa de pós-graduação na FCF/InCor-HCFMUSP;
 - Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo, pelo apoio recebido durante todo o programa de pós-graduação;
 - À Profa. Dra. Ana Campa pela amizade e auxílio durante o programa de pós-graduação;
 - À Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas, pela atenção sempre que necessária;
 - Aos amigos da Secretaria de Pós-Graduação da FCF-USP, bloco 13A, Sr. Jorge de Lima e Sra. Elaine Midori, pelo carinho, atenção e eficiência presentes em todos os momentos;
 - Às secretárias da pós-graduação (B17), Sras. Márcia, Suely, Ana e Dora pela atenção e amizade.
 - Aos amigos Prof. Dr. Raul Dias dos Santos Filho, Prof. Dr. Antonio Ricardo Gagliardi, Prof. Dr. Andrei Sposito e Profa. Dra. Ana Paula Chacra, pela amizade e auxílio sempre presentes;
 - Aos estagiários de capacitação técnica, iniciação científica, trabalho de conclusão de curso de graduação, alunos de mestrado e doutorado que compartilharam momentos importantíssimos durante minha educação científica no Laboratório de Metabolismo de Lípidos do InCor-HCFMUSP;
 - Aos colegas das FCF, em particular a Émerson Silva Lima e família, pela grande amizade que construímos estudando e convivendo juntos;
-

-
-
- Aos amigos e amigas Denise Carmona, Claudete Valduga, Débora Rodrigues, Rosângela Amâncio, Carmem Vinagre, Conceição, Raquel, Carol, Amanda, Debinha, Lisa, Renato e todos aqueles com quem compartilhei momentos alegres e difíceis desde minha chegada a São Paulo;
 - Ao Prof. Titular Sérgio A. de Oliveira pela colaboração e incentivo indispensáveis à realização da minha dissertação e trabalho de tese, assim como pela atenção em todos os momentos necessários;
 - Ao Prof. Dr. Luis A. Oliveira Dallan pela colaboração indispensável, amizade, orientação, incentivo, atenção e presença em todos os momentos da realização da minha dissertação e trabalho de tese;
 - Ao Dr. Luiz A. Ferreira Lisboa pela colaboração, amizade, atenção e incentivo durante a realização da minha dissertação e trabalho de tese;
 - Aos Professores Doutores Mário H. Hirata e Carlos Alberto Sannazzaro pela amizade e aprendizado enquanto aluno de suas disciplinas;
 - À CAPES e à FAPESP, agências de fomento à Pesquisa, pela fundamental e importantíssima contribuição às pesquisas em andamento no Laboratório de Metabolismo de Lípidos do InCor-HCFMUSP;
 - À CAPES em especial pelas bolsas de mestrado e doutorado;
 - Ao Prof. Dr. José Luis Goldfarb, Assessor do Gabinete da Secretaria de Estado da Cultura do Estado de São Paulo, pelo apoio moral e incentivo ao estudo;
 - Ao Dr. Maurício Mindrisz e família pelo apoio e carinho de sempre;
 - À Sra. Adélia Waldmann Dimantas, secretária do Centro de Estudos Judaicos da Faculdade de Filosofia e Letras da Universidade de São Paulo, pelo carinhoso acolhimento durante todos os momentos vividos em São Paulo;
 - À Profa. Ângela C. Pontes pelo carinho de sempre e ao seu irmão Sr. Paulo Carvalho e família por me hospedarem com distinção e carinho em sua residência durante o momento inicial em São Paulo;
-
-

-
- À minha Sogra, Sra. Sara, e meu Sogro, Sr. Rubens Levy, pelo carinho de sempre;

 - **Aos Pacientes** pela confiança em mim depositada e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desta tese.
-

ÍNDICE

Resumo	I
Summary	ii
Listas de Abreviaturas	iii- v
1. Introdução.....	1-2
1.1 Histórico dos Estudos de Influxo e Efluxo de Lipoproteínas Contendo apoB e seus Lipídios Constitutivos no Endotélio da Íntima Vascular	2 - 9
1.2 Diferença entre as Vias de Efluxo para a Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) e para a LDL.....	10
1.2.1 Descrição da Partícula de HDL.....	10 - 12
1.2.2 Vias de Efluxo para a HDL e para a LDL.....	12 - 13
1.2.3 Receptores para Remoção da LDL.....	13 - 14
1.2.4 Compartimentalização do Colesterol Celular.....	14 - 16
1.2.5 Transporte Reverso do Colesterol (RCT).....	16 - 19
1.3 Proteínas de transferência de OC, CL e PL.....	19 - 22
1.4 Microemulsão Lipídica Rica em Colesterol (LDE).....	23 - 25
1.5 Estudos Cinéticos: modelos compartimentais.....	25
1.5.1 Bases Matemáticas da Farmacocinética Clínica: cinética de eliminação de primeira ordem.....	25 - 26
1.5.2 Conceito de Meia-Vida de Eliminação ($t_{1/2}$).....	27 - 28
2. Justificativa.....	29
3. Objetivos.....	30 - 31
4. Casuística.....	32
4.1 Pacientes.....	32
4.2 Critérios de inclusão.....	32 - 33
4.3 Critérios de exclusão.....	33
5. Material e Métodos.....	36
5.1 Materiais Utilizados.....	36
5.2 Esterilização do Material.....	36 - 37
5.3 Preparação da LDE Marcada com OC- ¹⁴ C e CL- ³ H.....	37- 38
5.4 Determinações Laboratoriais.....	38
5.5 Determinação da Cinética de Remoção da LDE.....	38 - 40
5.6 Análise da Cinética Plasmática dos Lipídeos OC- ¹⁴ C e CL- ³ H.....	40 - 43
5.7 Procedimento Cirúrgico e Obtenção dos Fragmentos.....	44 - 45
5.8 Extração de Lipídeos.....	45 - 46
5.9 Tamanho das Partículas de HDL.....	46 - 47
5.10 Transferência de Éster de Colesterol (OC), Fosfolípidos (PL) e Colesterol Livre (CL) para a HDL.....	47
5.11 Modelo Celular de Captação da LDE.....	48 - 49
5.12 Cultura de Células NCI-H292 para Realização dos Estudos de Bloqueio de Captação da LDE.....	49 - 50
5.13 Análise Histológica, Imunohistoquímica Convencional e Dupla Marcação.....	51 - 54

ÍNDICE

6. Análise Estatística.....	55
6.1 Teste de Kolmogorov-Smirnov.....	55
6.2 Teste de Mann-Whitney.....	55 - 56
6.3 Teste de Kruskal-Wallis	56
6.4 Teste de Correlação Linear.....	56 - 57
7. Resultados.....	58
7.1 Lípides Plasmáticos.....	58
7.2 Remoção Plasmática da LDE.....	59
7.3 Parâmetros de Transferência da LDE.....	59 - 61
7.4 Medida de Radioatividade Plasmática e Captação Tecidual da LDE.....	62 - 63
7.5 Cálculo da Proporção entre Massa, Mol e Moléculas de CL e OC na LDE.....	64
7.6 Estudos de Captação <i>In Vitro</i> da LDE Utilizando Células de Microendotélio Vascular Humano (HMEC)	65 - 66
7.7 Estudos de Bloqueio de Captação da LDE em Células de Microcarcinoma Pulmonar (epitélio brônquico) NCI-H292	67 - 68
7.8 Estudo do Tamanho das Partículas da HDL dos Pacientes.....	69
7.9 Estudos de Transferência de Éster de Colesterol (OC), Fosfolípidos (PL) e Colesterol livre (CL) para a HDL	70 - 71
7.10 Estudos Histológicos e Imunohistoquímicos.....	72 - 77
7.11 Dupla Marcação Imunoenzimática para Constituintes Celulares: von Willebrand factor (vWf) e LDL-r	78 - 79
8. Discussão.....	80 - 86
9. Conclusões.....	87
10. Referências.....	88 - 104
11. Anexos	
I. Tabela A	
II, III. Fórmulas utilizadas	
IV, V. Unidades em Energia Nuclear	

RESUMO

COUTO, R.D. **Deposição de colesterol de uma microemulsão lipídica em fragmentos vasculares removidos de pacientes durante a cirurgia de revascularização coronária: estudos *in vivo* e *in vitro***. São Paulo, 2005. 104p. Tese (doutorado). Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Como demonstrado em estudos prévios, quando injetada em indivíduos, a microemulsão lipídica rica em colesterol sem proteína (LDE) que mimetiza a composição da LDL adquire apoE no plasma e é captada por receptores de LDL. No presente estudo, a LDE marcada com colesterol- H^3 (CL) e oleato de colesterol- C^{14} (OC) foi injetada em 20 pacientes com doença arterial coronária antes da cirurgia de revascularização miocárdica. Fragmentos de aorta, artéria radial, artéria torácica interna, veia safena e pericárdio descartados durante a cirurgia foram coletados e analisados para radioatividade juntos com amostras seriadas de plasma. A contagem radioativa de LDE-OC foi maior do que a de LDE-CL em todas amostras de plasma coletadas durante 24h, entretanto a captação de LDE-CL foi expressivamente maior do que a do OC em todos os fragmentos. A captação de LDE-CL pela aorta foi cinco vezes maior do que a de LDE-OC ($p=0,0379$), quatro vezes maior na artéria torácica interna ($p=0,033$), dez vezes maior na veia safena ($p=0,006$) e quatro vezes maior no pericárdio ($p=0,010$). Apenas na artéria radial a captação não obteve significância estatística ($p=0,053$). Os estudos *in vitro* de captação celular, bloqueio e das marcações imuno-histoquímicas confirmaram os achados *in vivo*. Concluindo, a expressiva captação vascular do CL comparada com a do OC sugere que o CL dissocia-se a partir das partículas da microemulsão e precipita-se nos vasos. Considerando a LDE como um modelo de microemulsão artificial para a LDL, os resultados sugerem que este tipo de deposição do CL na parede vascular pode constituir um novo mecanismo para a aterogênese.

SUMMARY

COUTO, R.D. **Deposition of cholesterol from a lipid microemulsion in vascular fragments excised from patients during coronary by-pass surgery: *in vivo* and *in vitro* studies.** São Paulo, 2005. 104p. Tese (doutorado). Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

As shown in previous studies, when injected into subjects, a protein-free cholesterol-rich microemulsion (LDE) that mimics LDL composition acquires apoE in the plasma and is taken-up by LDL receptors. In the current study, LDE labeled with H^3 -Cholesterol (FC) and C^{14} -Cholesteryl Oleate (CO) was injected into 20 coronary artery disease patients 24h before myocardial revascularization surgery. Fragments of aortic, radial, internal thoracic arteries, safenous vein and pericardium discarded during surgery were collected and analyzed for radioactivity together with serial plasma samples. The radioactive counting of LDE-CO was greater than that of LDE-FC in all the plasma samples collected over 24h, but the uptake of LDE-FC was markedly greater than that of CO in all fragments. The uptake of LDE-FC by aorta was 5-fold greater than that of LDE-CO ($p=0,0379$), 4-fold greater in the internal thoracic artery ($p=0,033$), 10-fold greater in safenous vein ($p=0,006$) and 4-fold greater in pericardium ($p=0,010$). Only in the radial artery the uptake didn't attains statistical significance ($p=0,053$). The *in vitro* studies of cell uptake, blocking and immunohistochemistry marks confirm the *in vivo* finds. In conclusion, the remarkably greater vessel tissue uptake of FC compared with CO suggests that FC dissociate from the microemulsion particles and precipitate in the vessels. Considering LDE as an artificial microemulsion model for LDL, the results suggests that this type of FC deposition in the arterial wall, might constitute a novel atherogenic mechanism.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviaturas

ABC-1	ATP-binding cassette transporter - 1
ACAT	acil coenzima A: colesterol acil transferase
ANOVA	análise de variância
apo	apolipoproteína
BFGF	fator de crescimento básico de fibroblastos
β -VLDL	remanescentes de VLDL
CCD	cromatografia em camada delgada
CD36	família de <i>scavenger</i> receptors
CD68	marcador de superfície para macrófagos
CETP	proteína de transferência de éster de colesterol
CL	colesterol livre
CL- ³ H	colesterol livre marcado com trício
CPM	contagens por minuto
CT	colesterol total
DAC	doença arterial coronária
DNA	ácido desoxiribonucléico
DPM	desintegrações por minuto
DPS	desintegrações por segundo
HDL	lipoproteína de alta densidade
HDL-C	colesterol de HDL
HMEC	célula de microendotélio vascular humano
HMGCoA-redutase	3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase
IDL	lipoproteína de densidade intermediária
(<i>k</i>)	taxa fracional de transferência
KBq	quilobequerel

KBr	brometo de potássio
LCAT	lecitina colesterol acil transferase
LDE	microemulsão lipídica rica em colesterol
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	colesterol de LDL
LDL-r	receptor de LDL
LH	lípase hepática
LP(a)	lipoproteína (a)
LPL	lipase lipoprotéica
LRP	proteína relacionada ao receptor de LDL
LRTG	lipoproteína rica em TG
mSv	miliSievert – unidade de dose equivalente
NCI-H292	células de microcarcinoma de epitélio brônquico
N.S	não significativa
OC	oleato de colesterol ou colesterol esterificado
OC- ¹⁴ C	oleato de colesterol marcado com ¹⁴ C
OC- ³ H	oleato colesterol- ³ H
Ox-LDL	LDL oxidada
PCR	reação da polimerase em cadeia
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PE	fosfatidiletanolamina
PL	fosfolípide
PLTP	proteína de transferência de fosfolípidies
QM	quilomícrons
RCT	transporte reverso do colesterol
RMN	ressonância magnética nuclear
RT-PCR	PCR com transcriptase reversa
Sm	esfingomieline
SMC	<i>smooth muscle cells</i> (células musculares lisas)
SR-B1	receptores scavenger classe B tipo 1
TFR	taxa fracional de remoção

TG	triglicérides
TPL-II	proteína transportadora de lipídios II
VHDL	HDL com densidade muito alta
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa
VLDL-C	colesterol de VLDL
VWf	fator de Von Willebrand

1. INTRODUÇÃO

O conceito de transporte reverso de colesterol (RCT), primeiramente formulado por Glomset (GLOMSET, 1968), propôs que o excesso de colesterol nos tecidos periféricos seria transportado pela lipoproteína de alta densidade (HDL), ou subclasses da mesma, de volta ao fígado para eliminação. Atualmente, entretanto, este fenômeno é aceito como uma grande variedade de transformações e reações utilizando enzimas e proteínas de transferência que ocorrem no compartimento plasmático antes de encaminhar as moléculas de colesterol ao fígado (FIELDING, 1991; FRANCESCHINI *et al.*, 1991; VON ECKARDSTEIN *et al.*, 2001). Tanto fatores intra quanto extravasculares afetam o movimento do colesterol entre plasma e tecidos (ROTHBLAT *et al.*, 1999; ORAM & YOKOYAMA, 1996). A presença de receptores para as lipoproteínas, como LDL-r, LRP, SR-B1, nos tecidos (FOGELMAN *et al.*, 1988; IKEDA *et al.*, 1994; ACTON *et al.*, 1996; RIGOTTI *et al.*, 1997), de proteínas de transferência, como CETP e PLTP, nas lipoproteínas (ROTHBLAT *et al.*, 2002), e a utilização de lipoproteínas artificiais (MARANHÃO *et al.*, 1993) são aspectos bastante úteis a serem explorados durante o estudo *in vivo* do fluxo de colesterol. Estes fatores tanto teciduais quanto plasmáticos podem ser associados a modelos celulares espécie-específicos como as células de endotélio microvascular humano para a realização de estudos *in vitro* (ADES *et al.*, 1993). Recentemente (2003) foi demonstrado que a remoção plasmática do colesterol livre de uma microemulsão lipídica artificial foi mais rápida do que a remoção do colesterol esterificado em pacientes com doença arterial coronária (SANTOS *et al.*, 2003). O trabalho de Santos *et al.* (2003), gerou

evidências suficientes para o desenvolvimento de um estudo mais aprofundado sobre os possíveis fatores que influenciam o influxo da microemulsão LDE no endotélio vascular humano.

1.1 Histórico dos Estudos de Influxo e Efluxo de Lipoproteínas Contendo apoB e seus Lipídios Constitutivos no Endotélio da Íntima Vascular

A lesão aterosclerótica é caracterizada pela deposição de quantidades consideráveis tanto de colesterol livre quanto do éster de colesterol na túnica íntima (NEWMAN *et al.*, 1961). Este achado criou a necessidade de determinar os mecanismos de deposição destas duas frações lipídicas na parede vascular (NEWMAN *et al.*, 1961; DAYTON *et al.*, 1959). Embora Siperstein *et al.* (1951) e Azarnoff *et al.* (1958) tenham demonstrado sucessivamente a capacidade do endotélio vascular de sintetizar colesterol, as observações de Dayton *et al.* (1959) e Newman *et al.* (1961) indicaram que o colesterol presente nas placas ateroscleróticas é de origem plasmática, sendo esta uma via muito mais relevante do que a síntese *in situ* do colesterol per se. Modelos animais de influxo de lipoproteínas na íntima vascular demonstraram que a entrada de colesterol radioisotopicamente marcado é relativamente maior do que a entrada do éster de colesterol mesmo considerando a sua maior concentração plasmática (DAY *et al.*, 1970). Uma explicação proposta para o momento foi que o colesterol livre poderia se movimentar muito mais livremente entre as frações lipídicas quando comparado

ao colesterol esterificado. Outro achado demonstrou que o acúmulo de colesterol livre em relação ao éster de colesterol nas placas ateroscleróticas estava relacionado à hidrólise parcial do éster de colesterol seguido do seu influxo na íntima vascular (PATELSKI *et al.*, 1968; DAY & GOULD-HURST, 1966). Clark *et al.* (1962) sugeriram que o colesterol em excesso pode ser transportado pelo sangue sem o aumento concomitante de lipoproteínas carreadoras. Após todos esses achados, já quase na década de 1980, Stender *et al.* (1978) foram motivados pelas discrepâncias observadas entre as razões de colesterol livre (CL) e éster de colesterol (OC), CL/OC, na íntima e no plasma, na qual a razão na parede vascular era muitas vezes maior do que a razão dos lípides no plasma, ou seja, mais CL na parede vascular em relação ao plasma, porém mais éster de colesterol no plasma durante os estudos de captação. Esta motivação incentivou o desenvolvimento de estudos de captação em diferentes espécies animais, considerando-se: os efeitos da hiperlipemia induzida e os tipos de padrões de aterogênese nos tecidos vasculares.

Em relação ao influxo e efluxo do colesterol livre na parede vascular, a captação preferencial do CL, em modelo animal, foi explicada como uma troca entre o CL-marcado das lipoproteínas contra o CL-não marcado das membranas celulares da parede vascular, sem haver um equilíbrio de troca proporcional para o OC (DAY *et al.*, 1970; DAYTON *et al.*, 1970; ADAMS *et al.*, 1975). Hagerman *et al.* (1951) explicaram este mecanismo em modelo eritrocitário. Em relação aos experimentos de influxo e hidrólise do OC na íntima vascular, as áreas sob a curva (AUC) do CL e OC foram calculadas, pois havia uma dúvida quanto a hidrólise do OC, ou seja, se a marcação fosse feita no ácido graxo que estava esterificado ao

anel do colesterol, quanto de OC hidrolisado poderia contribuir para o aumento da concentração de CL na parede vascular, principalmente se não permanecesse a marcação do lípido de origem após hidrólise. Neste experimento, após a utilização da marcação isotópica no anel, tanto para o colesterol livre quanto para o éster de colesterol, foi possível associar a AUC do colesterol tecidual com o grau de influxo arterial, considerando que o colesterol tecidual permaneceria não modificável durante o período de captação em relação à hidrólise e/ou esterificação do OC. Estes resultados em modelo suíno demonstraram a grande quantidade relativa de CL em relação ao OC na íntima, sendo a concentração do OC plasmático maior do que o OC vascular. Porém, ficaram ainda pontos a se verificar desses estudos primordiais, ou seja, a relação entre a atividade da hidrolase de éster de colesterol e a transferência do colesterol livre entre plasma e tecidos (STENDER *et al.*, 1978).

Presumivelmente, o transporte do colesterol para dentro da íntima vascular é realizado pela lipoproteína de baixa densidade (LDL) quando o LDL colesterol (LDL-C) está em altas concentrações. Entretanto, até então a origem do OC da lesão aterosclerótica permanecia obscura (SMITH & SLATER, 1973). Vários experimentos de captação celular sugeriram que o OC da partícula de LDL é primeiro hidrolisado, após entrar na parede arterial, e só depois novas moléculas de OC são sintetizadas (GOLDSTEIN *et al.*, 1975). Porém, este mecanismo não deve ser adotado para todos os tecidos, principalmente os ateroscleróticos, pois a saturação ou a deficiência de algumas enzimas lisossomais, como a éster hidrolase, situações freqüentes neste tecido, comprometeria o mesmo (ALAM *et al.*, 1980). ALAM *et al.* (1980) demonstraram, em estudos de captação utilizando

células da musculatura lisa e da túnica adventícia incubadas com LDL CL-¹⁴C, que após 24h de incubação cerca de 70-80% do éster de colesterol presente provinha da LDL e que apenas 20-30% do mesmo era sintetizado pelas células. Demonstraram, ainda, de forma conclusiva, que as células vasculares aumentavam sua massa de OC após incubação com a LDL. Bondjers & Björkerud (1972) sugeriram que a hidrólise do éster de colesterol pode ser o pré-requisito para a eliminação dos depósitos de colesterol das lesões ateroscleróticas. Nicoll *et al.* (1981) observaram que o influxo de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), densidade intermediária (IDL) e LDL são significativamente mais altos em íntimas vasculares ateromatosas do que em íntimas normais. Não foi conclusivo se o aumento do influxo das lipoproteínas foi devido ao grande número de lesões ateromatosas por área de vaso ou se a taxa de influxo das lipoproteínas através do endotélio da íntima estava acelerada em função do ateroma. Embora até o momento o mecanismo de transporte trans-endotelial das lipoproteínas não tenha sido completamente elucidado, Stein & Stein (1973), por analogia ao transporte trans-capilar da lactoperoxidase, propuseram que macromoléculas do tamanho das lipoproteínas devem ultrapassar as células endoteliais obrigatoriamente através das membranas, do que através das junções celulares; por outro lado, Vlodavsky *et al.* (1978) delinearam a ligação, captação e degradação das lipoproteínas via receptor *in vitro* em células endoteliais. O aumento do transporte trans-endotelial de macromoléculas está relacionado a áreas de alta proliferação celular (CAPLAN & SCHWARTZ, 1973) e aumento da permeabilidade para o influxo de lipídios (HOFF *et al.*, 1983). Estas áreas focais correspondem a regiões de baixo *shear stress* (NEREM *et al.*, 1981). Embora haja uma atenção enorme

em relação à entrada do éster de colesterol no endotélio da íntima vascular, o acúmulo subendotelial de colesterol não esterificado, colesterol livre, tem sido sugerido como o evento inicial mais precoce na aterogênese (KRUTH, 1985).

Vários estudos de ultraestrutura celular demonstraram a presença de lipossomas extracelulares ricos em colesterol não esterificado, colesterol livre, na íntima vascular no estágio pré-lesional, antes da presença de infiltrado monocítico e formação de células espumosas, de coelhos sob dietas ricas em lipídios (SIMIONESCU *et al.*, 1986; KRUTH, 1985). Lin *et al.* (1989) verificaram que junções comunicantes ao redor das células endoteliais em proliferação criam espaços através dos quais a LDL entra no espaço subendotelial, resultando em acúmulo lipídico. A análise de auto-radiografias de regiões com permeabilidade aumentada para a LDL sugerem que a ^{125}I -LDL liga-se à matriz extracelular em regiões de alta proliferação (TRUSKEY *et al.*, 1992). Um achado histórico importante é que os vasos de animais com dietas ricas em colesterol tendem a captar maior quantidade de lipoproteínas do que os vasos de animais com dieta normal. Virag *et al.* (1970) observaram que a captação vascular em artérias (aorta) é maior do que em veias, (femoral) de coelhos utilizando ^{125}I - β -lipoproteínas. Barnes & Weiberg (1999) observaram dois padrões de deposição lipídica espontânea em aortas de coelhos. Eles observaram que nos vasos de animais jovens o padrão de deposição apresenta-se após as ramificações enquanto que nos vasos de animais com idade avançada este padrão de deposição acontece em região anterior as ramificações. Estes achados sugerem que as variações regionais entre a interação de lipoproteínas com a parede vascular representam

aspectos importantes para o desenvolvimento da aterosclerose (NIELSEN *et al.*, 1992).

Thubrikar *et al.* (1992) observaram que existe uma tendência para acúmulo de grandes quantidades de LDL em regiões ramificadas da aorta, explicando a susceptibilidade destas regiões ao desenvolvimento da aterosclerose. Atenção deve ser dada as diferenças entre lesão-resistência e lesão-propensão arteriais que podem ser causadas por diferenças de influxo, retenção, degradação ou efluxo de lipoproteínas da parede arterial (NIELSEN *et al.*, 1992). SCHWENKE & CAREW (1989) sugeriam que o aumento focal da concentração de LDL em regiões susceptíveis a formação de lesões ateroscleróticas em coelhos com dieta rica em lipídios, antes da formação das estrias gordurosas, são oriundas de diferenças locais de retenção e diminuição da taxa fraccional de degradação da LDL, e não devido ao aumento da permeabilidade vascular como relatado em outros estudos (SCHWENKE & CAREW, 1989). Outra sugestão para essas diferenças de efluxo e tempo médio de residência das partículas de LDL pode estar relacionada a diferentes tipos de interação ou ligação com os glicosaminoglicanos (GAG), colágeno e elastina que são componentes da matriz extracelular (WALTON & MORRIS, 1977). NIEVELSTEIN *et al.* (1991), especificamente, fizeram as seguintes perguntas: existe um tipo de configuração predominante das lipoproteínas depositadas no espaço íntima-subendotélio; a LDL é retida pelos filamentos de GAG e fibrilas de colágeno da matriz extracelular; existem diferenças de influxo em relação ao tempo de administração e ao tamanho das partículas de LDL? No mesmo estudo, 2h após a administração da LDL, tanto de origem humana quanto de coelhos hipercolesterolêmicos, observou-

se aumento entre 5 a 20 vezes na concentração plasmática de LDL, sendo em seguida observadas predominantemente partículas com diâmetro de 23nm, formando uma topografia bastante heterogênea na íntima vascular. As partículas maiores encontradas são, na verdade, aglomerados dessas partículas com 23nm formando grandes estruturas lipídicas com cerca de 161nm e topografia delicada. Alguns eventos geneticamente determinados causam aterosclerose prematura, como, por exemplo, a hiperlipidemia combinada familiar, que afeta indivíduos através da síntese elevada de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), IDL e/ou LDL. Lipoproteínas que contêm apoB.

Na espécie de coelhos geneticamente hiperlipidêmicos St. Thomas a patogênese se assemelha bastante a hiperlipidemia combinada familiar humana (LA VILLE *et al.*, 1987). Esta semelhança cria um ótimo modelo animal para o estudo do influxo de lipoproteínas na íntima vascular, pois esses coelhos, quando alimentados com dieta comum, desenvolvem lesões ateroscleróticas muito semelhantes às lesões em humanos (SEDDON *et al.*, 1987). O resultado desse estudo após análise de regressão linear múltipla evidenciou que, quantitativamente, o mecanismo mais importante de transferência de lipoproteínas para dentro da íntima arterial está relacionado tanto à permeabilidade não específica de moléculas quanto à concentração plasmática das lipoproteínas, VLDL e IDL, que compartilham com a LDL a característica potencial de causar aterosclerose (NORDESTGAARD *et al.*, 1991). Embora todos esses estudos estabeleçam o papel das células endoteliais na regulação da entrada das proteínas plasmáticas na íntima vascular, pouco se sabe sobre as características da barreira intimal, lâmina elástica interna (IEL), em tecidos normais ou durante o

processo aterosclerótico. A resistência da IEL ao movimento (transporte) de macromoléculas tem sido bastante ignorada, fato parcialmente atribuído às dificuldades de se medir adequadamente suas características de transporte *in vivo*. A baixa resolução espacial das técnicas disponíveis para quantificar a concentração e os tipos de perfis macromoleculares e os resultados dos estudos das fenestrações celulares da IEL levam à conclusão de que a IEL é apenas uma membrana porosa (WASANO *et al.*, 1983). A importância da IEL na aterosclerose foi sugerida por FRY (1993), que desenvolveu um modelo matemático (FRY, 1985) de *steady-state* (estado estacionário), descrevendo o transporte de macromoléculas através das túnicas íntima e média. Simulações desse modelo matemático demonstraram que as concentrações macromoleculares da íntima podem ultrapassar as concentrações plasmáticas, através apenas da avaliação dos coeficientes de permeabilidade do endotélio e da IEL. Esses resultados são consistentes com as observações de SMITH & STAPLES (1980), que encontraram em regiões da íntima, oriunda de necropsia humana, concentrações de LDL bem superiores às encontradas no plasma. PENN *et al.* (1999), utilizando recurso de imagem que oferecem alta resolução espacial, desenvolvido para medir a concentração de macromoléculas através das túnicas íntima e média, observaram que a IEL tem um papel importantíssimo (influência paracrina) sobre a comunicação entre as células das túnicas íntima e média. Em outro estudo, avaliando o influxo local de macromoléculas através das túnicas íntima e média de tecido endotelial intacto da superfície de aortas de suínos adultos em função do tempo (t), pressão (p), espécie molecular (i) e localização (z), observou-se que a captação das macromoléculas, ^{125}I -Albumina, ^{125}I -LDL e o complexo *Evans Blue*

Dye (EBD)-Albumina, varia bastante em função de (t), (z) e (i), mas não de (p) (FRY *et al.*, 1993).

1.2 Diferenças Entre as Vias de Efluxo para a Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) e para a LDL

1.2.1 Descrição da Partícula de HDL

A fração lipoprotéica conhecida como HDL é, na verdade, constituída por um grupo de partículas originalmente obtidas por ultracentrifugação do plasma com densidade entre 1,063 e 1,25 g/mL. Assim, as HDL são as menores (7-17nm) e as mais densas ($1,063 < d < 1,25$ g/mL) das frações lipoprotéicas plasmáticas (LUND-KATZ *et al.*, 2004; KOPPAKA, 2001; SEGREST *et al.*, 2000). Sua estrutura constitui-se de um núcleo lipídico hidrofóbico, contendo principalmente ésteres de colesterol, uma pequena quantidade de triacilglicerol e colesterol não esterificado. Este núcleo é circundado por uma camada monofásica de fosfolipídios, colesterol não esterificado e apolipoproteínas (LUND-KATZ *et al.*, 2004). As principais apolipoproteínas da HDL são apoA-I e apoA-II, embora outras, como apoA-IV, apoA-V, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoD e apoE, possam estar presentes (LUND-KATZ *et al.*, 2004). A HDL também serve de transportador plasmático eficaz de proteínas envolvidas com o metabolismo lipídico, como a proteína transportadora de éster de colesterol (*cholesterol-ester-transfer-protein* - CETP), a lecitina:colesterol-aciltransferase (LCAT) e a proteína transportadora de

fosfolípidios (*phospholipid transfer protein* – PLTP), que participam ativamente das vias metabólicas da HDL (WANG & BRIGGS, 2004). Estas e outras moléculas de origem protéica, presentes na HDL, estão descritas no ANEXO I (Tabela A).

A HDL engloba uma família heterogênea de partículas com forma, tamanho, densidade, composição e cargas de superfícies diferentes. Por exemplo, quando separada por ultracentrifugação, pode-se observar duas frações principais de HDL. Uma subfração principal chamada de HDL2, isolada na zona de densidade entre 1,063 e 1,125g/mL, e outra chamada de HDL3, obtida entre 1,125 e 1,21g/mL. Uma terceira fração obtida em menor quantidade, conhecida como V-HDL, isolada entre as densidades 1,21 e 1,25g/mL, pode também ser isolada (YUNG *et al.*, 2004). Quando separada por eletroforese, sistema gel de poliacrilamida não-desnaturante, que usa o tamanho e a carga da partícula como base para a separação, a fração da HDL previamente separada por ultracentrifugação pode ser dividida em cinco subfrações distintas (RAINWATER, 1998; RAINWATER *et al.*, 1997; WARNICK *et al.*, 2001). Estas subfrações separadas por ordem decrescente de tamanho são a HDL2b (diâmetro médio 10,6nm), a HDL2a (9,2nm), a HDL3a (8,4nm), a HDL3b (8,0nm) e a HDL3c (7,6nm). Estas também podem ser identificadas por ressonância magnética nuclear, que tem sido mais recentemente utilizada na identificação de subfrações da HDL baseando-se no tamanho das partículas (BARTER *et al.*, 2003; RARDER, 2002).

As HDL também podem ser divididas em duas subpopulações tendo como base a sua composição de apolipoproteínas, ou seja, uma subpopulação compreendendo as partículas contendo apoA-I, mas não apoA-II (HDL A-I), e

outra que contém as duas apolipoproteínas (HDL A-I/A-II). Enquanto que a proporção de apoA-I é de aproximadamente 50% nas HDL A-I e HDL A-I/A-II, na maioria dos indivíduos, quase toda a apoA-II está na fração das HDL A-I/A-II. A maior parte das HDL A-I/A-II está na fração de densidade HDL3. As HDL A-I são as partículas principais das frações HDL3 e HDL2 (WANG & BRIGGS, 2004; LUND-KATZ *et al.*, 2004).

Quando as partículas de HDL são separadas por eletroforese em gel de agarose ocorrem quatro bandas de migração denominadas alfa, pré-alfa, pré-beta e gama. As partículas que migram na posição alfa são esféricas e constituem a maior porção. Estas incluem as frações HDL3 e HDL2, assim como HDL A-I e HDL A-I/A-II. As partículas conhecidas como pré- β 1 HDL são, na verdade, moléculas de apoA-I ou partículas discóides formadas por uma ou duas moléculas de apoA-I complexada(s) com fosfolípidios e possivelmente uma pequena quantidade de colesterol não esterificado. A fração gama é constituída de partículas que contêm apenas apoE e não apoA-I (BARTER *et al.*, 2003; WARNICK *et al.*, 2001).

1.2.2 Vias de Efluxo para a HDL e para a LDL

Tanto em função das suas características próprias quanto em função dos aspectos acima mencionados, ambas partículas de HDL e LDL entram na íntima arterial humana a partir do plasma (SCOTT & HURLEY, 1970; NIEHAUS *et al.*, 1977; NICOLL *et al.*, 1981; STENDER & HJELMS, 1988). Reconhecidamente o

clearance da HDL que entra na íntima arterial é maior do que o da LDL (STENDER & HJELMS, 1988). A maior parte do colesterol que entra na parede vascular precisa sair, pois a molécula do colesterol não é degradada pelo tecido arterial vascular (NORDESTGAARD *et al.*, 1990). Não se sabe precisamente em que quantidade o colesterol sai da íntima arterial como componente de partículas de LDL e HDL. Remanesce também a dúvida de qual é a quantidade de partículas de LDL e HDL que sai da íntima arterial via lumem ou via passagem através da *vasa vasorum* e/ou vasos linfáticos da túnica média externa e adventícia.

NORDESTGAARD *et al.* (1990) observaram que, quantitativamente, a rota mais importante para o efluxo da HDL da parede vascular é através da *vasa vasorum* e/ou vasos linfáticos presentes na túnica média externa e adventícia, enquanto que as partículas de LDL têm efluxo, possivelmente, via lumem arterial. Desde que a IEL não oferece alta resistência a passagem das partículas de HDL, como o faz para as partículas de LDL, facilita o fluxo de partículas de HDL através da íntima vascular podendo a HDL mobilizar mais facilmente o colesterol derivado da LDL na íntima. Evento este que, possivelmente, pode explicar o efeito protetor das altas concentrações plasmáticas de HDL observado durante a evolução da aterosclerose.

1.2.3 Receptores para Remoção da LDL

A LDL é normalmente removida pela interação entre a apoB-100 e os receptores B/E, localizados em vários órgãos e tecidos corpóreos, principalmente no fígado. Porém, se for oxidada, a LDL pode ser removida por vários receptores,

como a família do CD36, o SR-A, o SR-B1, o CD68 e o LOX-1 (RICCIARELLI *et al.*, 2000) presente nas lesões ateroscleróticas em macrófagos e células SMC (formadores das células espumosas), que normalmente (na ausência de estímulos) além destes, expressam o receptor B/E e o LRP (LLORENTE-CORTÉS *et al.*, 2000).

1.2.4 Compartimentalização do Colesterol Celular

Em células normais, ambos, o colesterol sintetizado endogenamente e o colesterol derivado por via exógena, são redistribuídos nas células para enriquecer os depósitos existentes nas membranas celulares, principalmente a membrana plasmática. A maior parte do conhecimento sobre o tráfego do colesterol intracelular derivado da LDL vem de estudos sobre doenças metabólicas hereditárias, como os clássicos estudos da hipercolesterolemia familiar (BROWN & GOLDSTEIN, 1986), que esclareceram a remoção da LDL mediada por receptor e degradada via lisossomos, a regulação fisiológica destes receptores, o papel da enzima limite para a síntese do colesterol celular, 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase e a ação da enzima responsável pela esterificação do colesterol celular, a acil-coenzima A:colesterol aciltransferase (ACAT). O papel dos lisossomos e da éster hidrolase no processamento do conteúdo de éster de colesterol do core lipídico da LDL foram acessados após estudos sobre a síndrome de WOLMANS (GOLDSTEIN *et al.*, 1975). Estudos semelhantes, como a doença de Niemann-Pick tipo C, uma doença do metabolismo do colesterol e neurodegeneração (PENTCHEV *et al.*, 1987),

mostram que o transporte pós-lisossomal do colesterol derivado exogenamente é mediado por proteínas e revela as organelas envolvidas no tráfego celular do colesterol (BLANCHETTE-MACKIE *et al.*, 1988).

A distribuição heterogênea do colesterol entre as organelas celulares resulta da modulação interativa entre as moléculas de esterol derivadas tanto do meio exógeno quanto do endógeno que regulam a concentração do colesterol celular a partir de diversos estímulos. Nas células normais, a maior concentração de colesterol é encontrada nas membranas plasmáticas e o restante está contido, em menor quantidade, entre as membranas dos lisossomos, do complexo de Golgi e dos retículos endoplasmáticos (WATTENBERG *et al.*, 1983). Durante a compartimentalização do colesterol celular, duas enzimas possuem papel muito importante, a ACAT e a éster hidrolase. Enquanto a ACAT remove e esterifica o CL oriundo do plasma e outros compartimentos intracelulares, que precisam ser esterificados na forma de OC, a éster hidrolase transforma o OC em CL, tornando-o mobilizável; desta forma o CL pode difundir-se das organelas de origem para a membrana celular e logo em seguida para o plasma ou ser novamente compartimentalizado no *pool* de OC por uma ACAT oriunda de outra organela intracelular. Este é um processo extremamente dinâmico. Vários fatores tanto teciduais quanto solúveis estão intimamente relacionados à transferência do colesterol, como proteínas de transferência LCAT, PLTP e CETP, o ABCA-1, a caveolina-1 e também várias proteínas capazes de mobilizar o colesterol livre das membranas, como albumina, apolipoproteínas e partículas de pré- β -HDL (YOKOYAMA *et al.*, 2000).

1.2.5 Transporte Reverso do Colesterol (RCT)

O evento pelo qual o colesterol nos tecidos periféricos é transportado via plasma de volta para o fígado e órgãos esteroidogênicos, com a finalidade de ser excretado, tem sido intitulado de transporte reverso do colesterol (RCT). Para isso, são necessários (1) a transferência de fosfolípidios e colesterol de membranas celulares para partículas lipoprotéicas (FREDENRICH *et al.*, 2003; ASSMANN *et al.*, 2003; HUUSKONEN *et al.*, 2001; VON ECKARDSTEIN *et al.*, 2001), partículas estas ricas em proteínas e pobres em lipídios, através do espaço extracelular por processo dependente de ABCA-1 que resulta na formação das HDL discoidais (ORAM *et al.*, 2002); (2) a esterificação do colesterol mediada pela LCAT da HDL discoidal, transformando-a em partícula esférica; (3) a interação das HDL esféricas com a proteína transportadora do éster de colesterol (CETP) que transfere o conteúdo de ésteres de colesterol, ou parte dele, para VLDL e seus remanescentes e (4) a recirculação do OC para o fígado, tanto pela remoção de β -VLDL por meio dos receptores da lipoproteína de baixa densidade (LDL-r) quanto pela remoção de partículas de HDL pelos receptores da família SR-B1, que removem seletivamente os OC das partículas de HDL e também de LDL para os hepatócitos e células produtoras de hormônios esteroidais, sem internalizar as proteínas da HDL, os fosfolípidos e as apolipoproteínas (FREDENRICH *et al.*, 2003).

Embora os mecanismos nos quais ocorrem as dissociações dos lipídios das lipoproteínas e incorporação dos OC nas membranas plasmáticas não estejam ainda totalmente elucidados, acredita-se que exista a formação de um canal hidrofóbico por onde o colesterol da HDL se difunde para a membrana plasmática. O processo realizado pelos receptores da família do LDL-r ou receptores *scavengers* classe A é diferente, ou seja, acontece a internalização das lipoproteínas via endossomos, seguido da fusão com lisossomos para degradação das partículas lipoprotéicas. É importante enfatizar que o transporte reverso do colesterol é realizado por um conjunto de partículas efetoras como apoproteínas, lipídios, proteínas de transferência e enzimas, entre outras, associadas ou não a HDL e suas subclasses (HUUSKONEN *et al.*, 2001). O papel da HDL no RCT está exemplificado na figura 1.

O efluxo do colesterol celular também tem sido bastante estudado, principalmente devido a sua fundamental importância como passo inicial do RCT. Este pode ocorrer de duas maneiras distintas (YOUNG *et al.*, 2004). Uma forma inespecífica que se reflete na difusão aquosa do colesterol para fora da membrana celular na direção de moléculas aceptoras em função do gradiente de concentração celular, não havendo necessidade de uma ligação do aceptor a um receptor específico (BARTER *et al.*, 2003). Esta forma de efluxo de colesterol tem pouco efeito sobre a mobilização do colesterol estocado intracelularmente na forma esterificada. Entretanto, a segunda forma, a interação da HDL com os receptores SR-B1, pode promover o efluxo de colesterol se houver um gradiente de concentração favorável. Esta forma de efluxo pode ser induzida por partículas de α -HDL, por outras lipoproteínas e até pela albumina (RADER *et al.*, 2002).

Contudo, este efluxo não é induzido por apolipoproteínas livres ou pré- β -HDL. Por esta razão, o efluxo de colesterol celular inespecífico contribui muito pouco para o transporte reverso do colesterol (ASSMANN *et al.*, 2003).

Apolipoproteínas livres A-I, A-II, A-IV, C e E induzem o efluxo de colesterol que, em contraste com a forma inespecífica, é rápido e unidirecional. Neste caso, o efluxo de fosfolípides parece preceder o de colesterol. Como resultado, o efluxo de colesterol mediado por apolipoproteínas livres produz lipoproteínas como HDL com mobilidade pré- β . Este efluxo envolve interações específicas com proteínas de membrana plasmática e desta maneira ocorre de forma dependente de receptores de apolipoproteínas. Esta forma de efluxo é também eficiente na mobilização do colesterol esterificado intracelular (ASSMANN *et al.*, 2003). LLERA-MOYA *et al.* (1994) observaram que o efluxo do colesterol correlaciona-se melhor com o HDL total do que com qualquer uma das suas subfrações, este resultado indica que o efluxo se dá em função do HDL total e não apenas de uma subfração específica. Outro estudo, avaliando a capacidade de fatores plasmáticos, seqüestradores de colesterol, de influenciarem a capacidade da partícula de HDL no RCT, comparou o plasma de dois grupos de indivíduos, um grupo com HDL-C entre 1,10mmol/L – 1,50mmol/L, HDL-C normal, e outro com HDL-C > 1,75mmol/L, HDL-C alto, utilizando células de hepatoma Fu5AH de ratos. Em seguida, analisando a HDL para seu conteúdo em fosfolípido (PL), fosfatidiletanolamina (PE) e esfingomielina (Sm), demonstraram evidências, em função da correlação positiva obtida em ambos os grupos, de que a concentração de HDL-PL pode ser utilizada para predizer a capacidade do plasma de receber

colesterol, enquanto que o HDL-PE, no grupo HDL alto, correlacionou-se negativamente com efluxo celular do colesterol. A variação entre a razão de PE e Sm pode refletir mudanças na capacidade dos fatores plasmáticos de aceitar colesterol oriundo dos tecidos, visto a correlação positiva do fator Sm com o efluxo celular do colesterol, modulando assim os eventos iniciais do RCT (FOURNIER *et al.*, 1997).

1.3 Proteínas de Transferência de OC, CL e PL

Como abordado acima, o RCT consiste basicamente de três passos importantes como: efluxo de colesterol, maturação e modificação das partículas de HDL e transferência de OC pela CETP (ZHANG *et al.*, 2001). Estudos relacionados à proteína de transferência de PL (PLTP) tiveram maior atenção a partir, provavelmente, da sua importância no metabolismo da HDL. A PLTP desempenha duas funções básicas mais importantes, como atividade de transferência de PL e modular o tamanho e composição da HDL por um processo conhecido como conversão da HDL (HUUSKONEN *et al.*, 2001).

A regulação do metabolismo da HDL é realizada a partir da interação entre um grande número de fatores tanto plasmáticos quanto teciduais. Estes incluem os receptores celulares classe B *scavenger* tipo 1 (SR-B1) e o *ATP-binding cassette transporter* – 1 (ABC-1), proteínas plasmáticas como a CETP, a LCAT, enzimas ligadas ao endotélio como a lipase lipoprotéica (LPL) e a lipase hepática (HL). A PLTP, previamente conhecida como proteína transportadora de lipídios II (TPL-II),

foi originalmente caracterizada no plasma humano como um fator capaz de transferir fosfolipídios entre vesículas de PL e partículas de HDL e outras lipoproteínas (TALL *et al.*, 1983). A figura 2 mostra o papel fisiológico, até o momento conhecido, das proteínas de transferência PLTP e CETP no metabolismo da HDL (HUUSKONEN *et al.*, 2001).

Figura 1 – Principais vias do transporte reverso do colesterol e metabolização da HDL. LRTG: lipoproteína rica em triglicérides; LLP: lipase lipoprotéica (HUUSKONEN *et al.*, 2001).

1.4 Microemulsão Lipídica Rica em Colesterol (LDE)

A partir do conhecimento adquirido com os estudos das características físico-químicas das lipoproteínas plasmáticas, foram desenvolvidos modelos de emulsões, tanto semelhantes a LDL quanto aos QM, que são utilizados no estudo do metabolismo das lipoproteínas (GISBURG *et al.*, 1982; MILLER & SMALL, 1983A; MILLER & SMALL, 1983B).

Em 1993, Raul Maranhão e colaboradores, da Universidade de São Paulo, demonstraram em ratos e seres humanos que a utilização de uma microemulsão artificial (LDE), semelhante à porção lipídica da LDL, mas desprovida de apolipoproteínas, apresentava cinética plasmática semelhante à da lipoproteína natural. Quando injetada no compartimento plasmático dos indivíduos, a LDE adquire as apolipoproteínas das lipoproteínas naturais, sendo a mais importante a apoE, que lhe confere a capacidade de ligar-se aos receptores B/E principalmente hepáticos, porém, existentes também em outras células, como vasculares, de órgãos esteroideogênicos e pancreáticas (CNOP *et al.*, 2000). Além disso, experimentos mostraram aumento da captação da LDE marcada com radioisótopos em ratos quando tratados com 17 α -etinilestradiol, hormônio que reconhecidamente aumenta a expressão dos receptores B/E (MARANHÃO *et al.*, 1993).

Em seres humanos portadores de patologias em que a expressão dos receptores B/E está aumentada, como a leucemia mieloide aguda (LMA) (HO *et al.*, 1978), ou diminuída, como na hipercolesterolemia familiar de forma

heterozigótica (GOLDSTEIN & BROWN, 1983), a cinética plasmática da LDE está alterada (ROLAND, 1992; MARANHÃO *et al.*, 1994). Em seu doutoramento, Roland (1992) demonstrou que a cinética plasmática da LDE encontrava-se retardada em indivíduos portadores de hipercolesterolemia familiar, quando comparada a indivíduos normais. Por outro lado, Maranhão e colaboradores (1994) encontraram que em indivíduos portadores de LMA, com a doença ativa, a remoção plasmática da LDE foi significativamente mais rápida quando comparada a indivíduos portadores de leucemia linfóide aguda (LLA). As células da LLA, reconhecidamente, não têm expressão aumentada para os receptores B/E (CHAIT *et al.*, 1982). Após a remissão da LMA induzida por quimioterapia, as características cinéticas (remoção) da LDE voltaram aos valores normais.

Desta maneira, a análise cinética da remoção da LDE pode servir tanto como ferramenta para se avaliar o metabolismo da LDL natural quanto ser utilizada como veículo para o transporte de quimioterápicos (MARANHÃO *et al.*, 1994).

A LDE é produzida em laboratório, de forma prática, em condições estéreis e apirogênicas a partir de materiais fornecidos pela indústria químico-farmacêutica. A LDE não apresenta os inconvenientes das lipoproteínas naturais que são isoladas e marcadas por metodologias trabalhosas e que só podem ser utilizadas de maneira autóloga, devido ao risco da transmissão de doenças por via parenteral.

Outra característica importante da microemulsão é que pode ser alterada a sua composição (MARANHÃO *et al.*, 1986) e, desta forma, se estudar outros aspectos do metabolismo lipídico, como a esterificação do colesterol livre, a

atividade de proteínas de transferência, o efeito de fármacos hipolipemiantes e também os mecanismos de captação vascular.

1.5 Estudos Cinéticos: modelos compartimentais

1.5.1 Bases Matemáticas da Farmacocinética Clínica: cinética de eliminação de primeira ordem

Para a maioria das moléculas, a quantidade destas eliminadas do corpo por intervalo de tempo é proporcional a quantidade total das moléculas presentes no corpo. Em termos farmacocinéticos, este fenômeno é chamado de cinética de eliminação de primeira ordem, que pode ser descrito pela seguinte equação:

$$dX/dt = - kX \quad (1.0)$$

Onde (X) representa a quantidade total da molécula no corpo em um intervalo de tempo qualquer (t), e (k) representa a(s) taxa(s) de eliminação destas moléculas. Esta equação pode ser desenvolvida por manipulação algébrica, ou seja, separação de variáveis e integração direta para cálculo das moléculas remanescentes no corpo em qualquer tempo após injeção inicial:

Separação de variáveis (a) e (b) integração a partir do tempo ZERO ao tempo (t):

$$(a) \frac{dX}{X} = -k dt$$

$$(b) \int_{x_0-x}^{x_0} \frac{dx}{x} = -k \int_0^t dt$$

$$\ln x_0 - \ln x = -kt$$

$$\ln \frac{x}{x_0} = -kt \quad (1.1)$$

$$X = X_0 e^{-kt} \quad (1.2)$$

Embora estas equações lidem com a quantidade total de moléculas presentes no corpo, a equação $C = X/V_d$ fornece uma relação geral entre (X) e a concentração das moléculas (C) em qualquer tempo após administração inicial. Pode-se também substituir (X) por (C) nas equações (1.0) e (1.1) para obtenção de:

$$\ln C / C_0 = -kt \quad (1.3)$$

&

$$C = C_0 e^{-kt} \quad (1.4)$$

A equação (1.3) tem interesse especial, pois pode ser escrita na forma de uma equação do primeiro grau ($y = mx + b$) dando $\ln C = -kt + \ln C_0$ (2.1). Na prática, a concentração inicial das moléculas não é diretamente determinada, pois algum tempo é requerido para que as moléculas injetadas se distribuam nos fluidos corpóreos. Sendo assim, pode-se estimar a (C_0), a partir da extrapolação da linha reta (2.1) até o eixo das ordenadas, construindo um gráfico em papel semilogarítmico (ATKINSON & KUSHNER, 1979).

1.5.2 Conceito de Meia-Vida de Eliminação ($t_{1/2}$)

Se a taxa de distribuição das moléculas é rápida quando comparada à taxa de eliminação, a exponencial da fase terminal da concentração destas moléculas plotadas em função do tempo em gráfico de papel semilogarítmico pode ser utilizada para estimar a $t_{1/2}$ de eliminação das moléculas, como na equação (1.2).

O fato da equação (1.3) poder ser utilizada para estimar (k) a partir de duas concentrações que estão separadas por um intervalo de tempo (t) qualquer, pode ser demonstrado a partir de $\ln 1/2 = -kt_{1/2}$ ou $\ln 2 = kt_{1/2}$, quando $C_2 = \frac{1}{2} C_1$

então:

$$\begin{aligned} T_{1/2} &= 0,69 / k \\ &\& \\ k &= 0,693 / t_{1/2} \quad (3.0) \end{aligned}$$

tanto a $t_{1/2}$ quanto o(s) k de eliminação das moléculas são susceptíveis às alterações tanto da função renal quanto hepática dos pacientes. As constantes (k) podem ser alteradas por mudanças tanto do volume de distribuição (V_d) quanto do *clearance* de eliminação (CL_E). Como ponto prático, é fácil estimar a $t_{1/2}$ de uma molécula em gráfico de papel semilogarítmico e então os (k) podem ser calculados a partir da equação (3.0) ou diretamente a partir do ângulo da reta da fase de eliminação (ATKINSON & KUSHNER, 1979).

Após injeção endovenosa, medidas sequenciais das concentrações plasmáticas são necessárias para estabelecer os parâmetros cinéticos de

decaimento plasmático que vão representar as fases de distribuição e eliminação. Nestes casos, as curvas obtidas possuem normalmente duas exponenciais que são somadas formando a seguinte equação bi-exponencial:

$$C = A' e^{-\alpha t} + B' e^{-\beta t},$$

Onde α e β representam as fases de distribuição e eliminação das curvas, respectivamente.

2. JUSTIFICATIVA

O papel dos lípides colesterol livre e sua fração esterificada na patogênese da aterosclerose não foi ainda totalmente elucidado, principalmente em relação aos mecanismos de deposição destas duas frações lipídicas na parede vascular. Vários estudos vêm indicando que a maior parte do colesterol presente nas placas ateroscleróticas é de origem plasmática, sendo esta uma via muito mais relevante do que a síntese *in situ* do colesterol per se. Desta forma, visou-se avaliar cuidadosamente algumas variáveis importantes relacionadas à captação destes lípides pela parede vascular e pelo pericárdio de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica, pela utilização de uma microemulsão lipídica rica em colesterol (LDE) marcada com isótopos radioativos. Emulsões lipídicas semelhantes a LDL vêm sendo utilizadas para estudo do metabolismo lipídico e do mecanismo da aterosclerose, assim como, veículos promissores para fármacos utilizados no tratamento de doenças (MARANHÃO *et al.*, 1994; GRAZIANI *et al.*, 1999; VITOLS *et al.*, 1991; LESTAVEL-DELATTRE *et al.*, 1992).

3. OBJETIVOS

Com a finalidade de avaliar a cinética de remoção plasmática e captação tecidual dos lípidos CL-³H e OC-¹⁴C da LDE por fragmentos de aorta, de artéria torácica interna, de artéria radial, de veia safena e de pericárdio que normalmente são retirados durante a cirurgia de revascularização miocárdica, estudou-se tanto os aspectos relacionados com as características físico-químicas da LDE quanto os eventos biológicos que norteiam a captação desta partícula. Para isso foi necessário:

- I. Determinar a cinética de remoção plasmática dos lípides marcados da LDE, seus padrões de captação e deposição tecidual,
- II. Avaliar os estudos de transferência de CL, PL e OC da LDE para a HDL, segundo o método do substrato exógeno, para verificar se há relação entre transferência e a captação dos lípides pelos tecidos.
- III. Realizar e avaliar os estudos de captação *in vitro* com células de microendotélio vascular humano (HMEC) modificadas com SV-40, para verificar o comportamento da captação da LDE, CL *versus* OC, em relação aos resultados de captação vascular.
- IV. Realizar e avaliar os estudos de captação e bloqueio *in vitro* com células de carcinoma mucoepidermoide de epitélio brônquico humano (NCI-H292), para verificar a captação da LDE por outros receptores.

-
- V. Realizar e avaliar os ensaios imunohistoquímicos, convencional e dupla marcação, para identificação do LDL-r, CD36, CD68 e marcadores para os tipos celulares de interesse nos fragmentos de tecido vascular e de pericárdio humanos estudados.
-

4. CASUÍSTICA

4.1 Pacientes

O Protocolo de estudo foi realizado, após consentimento pós-informação, em 20 pacientes com idade entre 41-70 anos (59 ± 9 , média e desvio-padrão), portadores de DAC (tabelas 1 e 2), submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica, selecionados no Ambulatório da Unidade Coronária do Instituto do Coração – InCor-HCFMUSP. Este protocolo foi autorizado por adendo ao projeto “Lipoproteínas Artificiais na Investigação das Dislipidemias e no Tratamento do Câncer” apreciado e aprovado pela Comissão Científica e de Ética do Instituto do Coração na sessão 345/99/09, de 10/06/99, sob o Protocolo de Pesquisa SDC 1517/99/72.

4.2 Critérios de Inclusão

1. Pacientes de ambos os sexos,
 2. Idade entre 40 e 70 anos,
 3. Consentimento pós-informação para realizar o estudo,
 4. Doença arterial coronária confirmada por angiocoronariografia,
 5. Perfil lipídico entre os valores normais de referência adotados pela Sociedade Brasileira de Cardiologia, mesmo em pacientes usando ou não medicação hipolipemiante, por exemplo estatinas,
-

6. Realizar cirurgia de revascularização miocárdica 24h após administração da LDE.

4.3 Critérios de Exclusão

1. Indivíduos portadores de disfunção hepática (atividade de protrombina < 50%, ALT e AST > 2x o valor de referência),
2. Indivíduos portadores de disfunção renal (creatinina sérica > 2,0 mg/dL) e ou síndrome nefrótica (proteinúria > 3,0 g/L e albumina sérica < 3,0 g/L),
3. Indivíduos com disfunção tireoideana,
4. Procedimento de revascularização miocárdica sem obtenção de fragmentos, por exemplo cirurgia a laser,
5. Desistência de participação do protocolo, a qualquer momento, antes, durante ou após a injeção da LDE.

TABELA 1 - Idade e características gerais dos pacientes, Média $\pm$ desvio-padrão

Paciente	Nome	Sexo	Idade	I.M.C
1	IMDJ	M	41	31
2	JB	M	58	26
3	LCB	M	59	32
4	CAMS	M	62	26
5	EPG	M	58	28
6	TMR	M	50	23
7	CAB	M	51	27
8	ACSG	M	60	30
9	OS	M	65	25
10	JDL	M	64	29
11	DRG	M	63	22
12	EDS	F	73	26
13	LMMS	M	45	26
14	ICS	F	58	36
15	JLA	M	45	26
16	ODS	M	69	26
17	ACR	M	54	31
18	JRO	M	67	24
19	LMS	M	58	22
20	DAS	F	64	23
Média $\pm$ D.P.	-----	-----	59 $\pm$ 9	27 $\pm$ 4

I.M.C - índice de massa corpórea; D.P. – desvio-padrão, M – masculino, F - feminino.

TABELA 2 - Antecedentes pessoais, familiares e medicação concomitante dos pacientes

Paciente	Antecedentes Pessoais	Antecedentes Familiares	Medicação Concomitante*
JMDT	HAS+FUMO+DISL+AVC+PCR	IAM	Atorvastatina 10mg
JB	HAS+FUMO+DISL+ANG.INST	IAM	Atorvastatina 10mg
LCB	HAS+FUMO+DISL+OBESID	IAM	Atorvastatina 20mg
CAMS	FUMO+DM+IAM com 40 ^a	Pai e Tio falecidos por IAM	Atorvastatina 10mg
EPG	ANG+HAS+DISL+ANG+ICC	HAS	Atorvastatina 10mg
TMR	REOP+HAS+IAM 34 ^a	HAS	Atorvastatina 10mg
CAB	HAS+ANG+DISL	-----	Atorvastatina 10mg
ACSG	HAS+ANG+DISL	-----	Atorvastatina 10mg
OS	DM+HAS	DM	-----
JDL	ROP+HAS+DLP+AVC+IAM	-----	Sinvastatina 20 mg
DRG	HAS+ANG	-----	Sinvastatina 20 mg
EDS	HAS+ANG	-----	Sinvastatina 20 mg
LMMS	HAS+ANG+ICC	-----	Sinvastatina 20 mg
ICS	HAS+DLP+OBSID+ANG	DM	Sinvastatina 20 mg
JLA	HAS+DLP+ANG	-----	Sinvastatina 20 mg
ODS	HAS+ANG+FUMO	-----	-----
ACR	HAS+ANG+DLP+HF(?)	-----	Sinvastatina 20 mg
JRO	HAS+ANG	-----	Sinvastatina 20 mg
LMS	HAS+ANG+AVC+FUMO	-----	Sinvastatina 20 mg
DAS	HAS+ANG	-----	Sinvastatina 20 mg

DAC - doença arterial coronária, AVC - acidente vascular cerebral; DM - diabetes melito; ROP - reoperação de revascularização do miocárdio; HAS - hipertensão arterial sistêmica; DISL - Dislipidemia; IAM - Infarto agudo do miocárdio; OBSID - Obesidade; ANG - Angina; ANG.INST - Angina Instável; ICC - insuficiência cardíaca congestiva, PCR - parada cardio-respiratória, FUMO - ex-tabagista, *Obs.: Atorvastatina 10-20 mg ou sinvastatina 20 mg, V.O. 1 Cp/dia, entre 3 e 4 semanas anteriores à internação.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Materiais Utilizados

Os isótopos radioativos oleato de colesterol-[1- ^{14}C] (OC- ^{14}C) e o colesterol-[7(n)- ^3H] (CL- ^3H) foram obtidos da Amersham International (Little Chalfont, Inglaterra), ambos com marcação no anel esteroidal. Os lípides trioleína, oleato de colesterol, colesterol e fosfatidilcolina, utilizados para o preparo da emulsão, foram adquiridos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, USA). A pureza dos lípides foi avaliada pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) (0,5mm de espessura), utilizando sílica gel 60 H e sistema solvente de hexano: éter etílico: ácido acético (70: 30: 1) v/v.

Os demais reativos e solventes foram adquiridos da Merck (Rio de Janeiro, Brasil). Os materiais utilizados para realização das técnicas imunohistoquímicas, histoquímicas e para a preparação de cultura celular foram adquiridos na indústria químico-farmacêutica local (Biogen, São Paulo – Brasil) ou por meio de importação direta.

5.2 Esterilização do Material

Toda vidraria utilizada neste estudo foi submetida à esterilização e despirogenização a seco (estufa 180°C, por 90 min.) e a vapor (autoclavagem a

120°C, 1,5atm., 30min.). Todo material plástico e de borracha utilizado foi de uso descartável. Todo o procedimento de preparo das emulsões foi realizado em capela de fluxo laminar vertical. Alíquotas das emulsões artificiais foram submetidas a teste de presença de pirogênios e esterilidade, no Laboratório de Metabolismo de Lípides do InCor e no setor de Bacteriologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, respectivamente.

5.3 Preparação da LDE Marcada com OC-¹⁴C e CL-³H

A LDE foi preparada segundo a técnica descrita por GISNBURG *et al.* (1982). Em um frasco. foram pipetados 40mg de fosfatidilcolina, 20mg de oleato de colesterol, 1mg de trioleína e 0,5mg de colesterol, a partir de estoques preparados em clorofórmio / metanol (2:1). Foram adicionados 130kBq de OC-¹⁴C e 158kBq de CL-³H. A seguir, a mistura foi seca sob fluxo de nitrogênio e mantida em dessecador a vácuo, por 16h, a 4°C, para a remoção dos solventes residuais. Após a adição de 10mL de tampão tris-HCl 0,01M, pH 8, a mistura de lípides foi então emulsificada por irradiação ultra-sônica, utilizando-se equipamento Branson, modelo 450A (Arruda Ultra-som, São Paulo, Brasil) potência 125 watts, durante 3 horas, sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura entre 51 e 55°C. Em seguida, a emulsão foi centrifugada a 200.000 x g por 30 minutos, a 4°C (ultracentrífuga Sorval, rotor Beckman SW-51). Cerca de 10% da parte superior do tubo contendo partículas maiores do que o desejado foram desprezados. Foi

adicionado brometo de potássio (KBr) ao restante do material, para ajustar sua densidade para 1,21g/mL, sendo o material submetido a uma nova centrifugação, por 2 horas, a 4°C, 200.000 x g, com o mesmo rotor. Nestas condições, a LDE foi recuperada no topo do tubo (cerca de 20% do total). O excesso de KBr foi removido por diálise, contra 2 trocas de 1.000 volumes tampão tris-HCl 0,01M, pH 8, e finalmente esterilizado, por filtração em membrana Millipore (0,22µ de porosidade), sendo então armazenado a 4° C por até trinta dias.

5.4 Determinações Laboratoriais

As determinações laboratoriais foram realizadas em amostras de soro obtidas após 8 – 14 horas de jejum, antes da administração da LDE nos pacientes. As concentrações de colesterol total (CT), suas frações e triglicérides (TG) foram determinadas pelos métodos de SIEDEL *et al.* (1981). O HDL colesterol (HDL-C) foi determinado pelo mesmo método usado para o CT, após a precipitação das VLDL e LDL pelo método de BURNSTEIN *et al.* (1970). As concentrações do colesterol de VLDL e LDL foram calculadas pela fórmula de FRIEDEWALD (1972), para valores de TG até 400mg/dL.

5.5 Determinação da Cinética de Remoção da LDE

Os estudos do comportamento cinético da LDE foram realizados em tempos pré-determinados durante 24h. Inicialmente, os pacientes encontravam-se em

dieta leve, pré-operatório, mas no decorrer do protocolo de estudo foram permitidas refeições, a critério médico.

Antes do procedimento foram canuladas duas veias, de membros superiores direito e esquerdo, com cateter *butterfly* tamanho 21, e mantidas com fluxo contínuo de solução fisiológica. Foram então injetados cerca de 200 μ L de LDE num dos braços, com radioatividade de 130kBq de OC-¹⁴C e 158kBq de CL-³H, correspondente a uma dose equivalente de 0,03 miliSievert (mSv). A dose anual permitida para seres humanos pelo Conselho Nacional de Energia Nuclear (CNEN) é < 2,0mSv.

A primeira amostra de sangue foi colhida da veia do membro superior contralateral 5 minutos após a administração da LDE. Posteriormente, foi utilizado o acesso venoso de maior facilidade para a realização das coletas subseqüentes, nos períodos: 0,08, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas. As amostras foram colhidas em tubos de ensaio contendo heparina (50 U.I./mL). Após a coleta, o plasma foi separado por centrifugação e processado imediatamente. Para avaliação da remoção plasmática da LDE foi medida a radioatividade presente em alíquotas de 1,0mL de plasma em cada um dos tempos de coleta, por cintilação líquida. Foram traçadas as curvas de remoção plasmática dos lípides radioativos e calculadas as respectivas taxas fracionais de remoção (TFR) (MATTHEWS, 1957), pela análise compartimental, com a utilização do programa computacional desenvolvido para análise de cinética de emulsões artificiais (MESQUITA, 1994).

A cinética de remoção plasmática da LDE foi determinada por avaliações isoladas das remoções plasmáticas de seus componentes lipídicos radioativos, devido aos mesmos apresentarem cinéticas diferentes.

Cumprе ressaltar que os parâmetros cinéticos de todos os pacientes participantes foram normalizados para superfície corpórea média ($1,73\text{m}^2$) e volume sangüíneo (ANEXO II).

5.6 Análise da Cinética de Remoção Plasmática dos Lípides OC- ^{14}C e CL- ^3H da LDE

A curva de remoção plasmática do OC- ^{14}C reflete a cinética de remoção da LDE, apresentando uma curva bi-exponencial com rápido decaimento na sua porção inicial seguido de decaimento mais lento. Esta curva característica levou à adoção do modelo com dois compartimentos (figura 3), no qual cada compartimento corresponde a uma exponencial, sendo dois *pools* (A1 e A2) no compartimento plasmático, compartimento 1, e um *pool* no compartimento extraplasmático (*pool* A3), compartimento 2, assumindo um sistema em constante equilíbrio (MARANHÃO *et al.*, 1993). A LDE no espaço intravascular, tal como foi injetada (compartimento 1), sofre transformação dentro do compartimento plasmático obedecendo a uma cinética de primeira ordem. A sua concentração em função do tempo foi representada pelo *pool* A2 do compartimento plasmático. Os conteúdos dos *pools* A1 e A2 são levados para o compartimento 2, *pool* A3, também por processo cinético de primeira ordem.

Os compartimentos e as taxas fracionais de transferência (k) adotados neste estudo foram definidos como:

- t = tempo em horas,
- A1(t) = conteúdo da componente A1 (*pool* A1) no tempo t,
- A2 (t) = conteúdo da componente A2 (*pool* A2) no tempo t,
- A3 (t) = conteúdo da componente A3 (*pool* A3) no tempo t,
- K1.2 = constante de transferência da componente A1 para A2,
- K1.0 = constante de transferência de A1 para A3,
- K2.0 = constante de transferência da componente A2 para A3 = função de incorporação da partícula.

A partir do método dos mínimos quadrados não lineares (MATTHEWS, 1957), foram calculadas as constantes de transferência (k) entre os compartimentos para se poder representar a remoção das partículas pelo parâmetro denominado de taxa fracional de remoção (TFR) em h⁻¹. Este parâmetro faz uma ponderação das constantes de transferência (k) entre os diferentes compartimentos considerando tanto a meia-vida de distribuição quanto a meia-vida de eliminação das partículas em estudo.

As taxas fracionais de remoção (TFR) do OC-¹⁴C e do CL-³H foram determinadas por análise compartimental, utilizando-se o programa Anacomp versão 3.11 (MESQUITA, 1994), pela seguinte equação (MATTHEWS, 1957):

$$TFR = \left(\frac{a_1}{b_1} + \frac{a_2}{b_2} \right)^{-1}$$

Onde a_1 , b_1 , a_2 , b_2 foram estimados a partir de curvas bi-exponenciais, obtidas da radioatividade restante no plasma após injeção endovenosa e ajustadas pelo procedimento dos mínimos quadrados como:

$$y = (a_1 \times e^{-b_1 t}) + (a_2 \times e^{-b_2 t})$$

Onde (y) representa o decaimento da radioatividade plasmática e (t) o tempo.

Figura 3. Modelo compartimental utilizado na análise dos dados experimentais. A injeção da LDE no compartimento plasmático, componentes A1 e A2, e o círculo 3 o componente A3 do compartimento extraplasmático. As flechas representam a transferência dos lipídios marcados da LDE entre as componentes dos compartimentos e os “k”, as constantes de transferência entre as componentes: $k_{1,0} = A1 \rightarrow A3$; $k_{1,2} = A1 \rightarrow A2$; $k_{2,0} = A2 \rightarrow A3$.

5.7 Procedimento Cirúrgico e Obtenção dos Fragmentos

Os pacientes foram submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica de acordo com procedimentos de rotina. Foi avaliada a captação da LDE nos fragmentos que habitualmente são retirados sempre que indicado.

A tática cirúrgica foi a de rotina no Instituto do Coração – InCor, ou seja: preparo do paciente com monitorização contínua de sua pressão arterial média, pressão venosa central, diurese e eletrocardiograma. Após anestesia geral, os enxertos foram obtidos, quando necessário, pela retirada de segmentos da veia safena magna de um ou ambos membros inferiores, pela dissecação de uma ou ambas artérias torácicas internas, quando indicado, pela dissecação das artérias: gastroepiplóica direita, radial e epigástrica inferior.

A cirurgia habitualmente é realizada com o auxílio da circulação extracorpórea e parada cardíaca.

Após a realização dos enxertos e recuperação dos batimentos cardíacos, a circulação extracorpórea é interrompida e inicia-se o processo de fechamento torácico e dos demais locais incisados para obtenção dos enxertos. Ao final do procedimento, o paciente é enviado, ainda sob assistência ventilatória, à unidade de recuperação pós-operatória onde deverá permanecer até que tenha condições hemodinâmicas e gerais para que retorne ao leito de origem.

Os pacientes receberam alta hospitalar após 7 ou 8 dias, de acordo com sua condição geral.

Os fragmentos recuperados após remoção habitual foram utilizados tanto para verificação da captação da LDE através da extração de lípides quanto para a identificação dos receptores para lipoproteínas presentes nas túnicas íntima, média e adventícia por imunohistoquímica seguida de análise histológica.

5.8 Extração de Lípides

Após a obtenção dos fragmentos, estes foram colocados imediatamente em solução fisiológica gelada e limpos em condições adequadas sobre placa de gelo. Em seguida os fragmentos foram pesados, anotados seus pesos exatos em miligramas (mg) e então, parte dos fragmentos, foram picotados até atingir aspecto pastoso.

Os fragmentos, já com aspecto pastoso, foram submetidos à extração de lípides pelo método de FOLCH (1957); ou seja, transferidos para tubos grandes (20X160), adicionados 10mL de metanol e 20mL de clorofórmio e deixados em repouso *overnight* (cerca de 18 horas) a 4° C. As amostras foram filtradas em papel de filtro (Whatman número 1) por gravidade, em seguida o filtrado foi lavado com 2,5mL de clorofórmio por duas vezes, adicionados 7mL de água bidestilada aos tubos e deixados mais uma vez em repouso, *overnight*. Após o repouso, a fase sobrenadante foi aspirada a vácuo e então descartada. Foram adicionados 4mL de *Clear folch* (CHCl_3 / meOH / H_2O) na proporção de 3:48:47; deixados mais uma vez em repouso *overnight* à temperatura ambiente. Após o repouso, foram aspiradas e descartadas as fases sobrenadantes. Em seguida, as amostras foram

secas sob fluxo de nitrogênio (N_2), dissolvidas em solução de FOLCH e transferidas para tubos menores, após várias lavagens, agitando-se bem o tubo de extração e então, mais uma vez, seca sob fluxo de nitrogênio e reconstituídas em 150 μ L de solução de FOLCH em gelo. Foram aplicados 100 μ L em placa de sílicagel 60H (Sigma S - 6628) para desenvolvimento da cromatografia em camada delgada (CCD). As aplicações foram feitas em bandas com cerca de 0,5cm de largura. As placas foram eluídas usando-se como fase móvel: hexano/éter etílico/ácido acético na proporção de 70:30:1. As placas foram secas à temperatura ambiente e reveladas com iodo sublimado, mostrando as áreas das bandas referentes às frações lipídicas a serem removidas, sendo então raspadas as bandas da placa para *counting vials* e adicionados 7mL de solução cintiladora PPO/POPOP/ Triton X-100/ tolueno (5,0g/ 0,5g/ 333mL/ 667mL). Foi então medida a radioatividade em contador Beta (*Liquid Scintillation Analyzer*, 1600^{TR} Tri-Carb, PACKARD), sob utilização do *software* SpeedSTAR Plus Vers. 5.01, da Diamond Computers, para determinação das contagens de CL-³H e OC-¹⁴C das amostras.

5.9 Tamanho das Partículas de HDL

O tamanho das partículas de HDL foi determinado por espalhamento de luz (*light scattering*) utilizando o equipamento *Laser Light Scattering* (ZetaPALMS, Brookhaven Instr. Corp.), após separação por precipitação química das partículas lipoprotéicas e seus remanescentes que contêm apoB por adição da solução de polietilenoglicol 8000 (200g/L). O sobrenadante contendo HDL foi diluído em

solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,15M contendo EDTA 0,01% (pH 7,5). A solução resultante foi filtrada por membrana Millipore® com 0,22 μ de porosidade. O diâmetro (nm) das partículas da HDL em solução foi determinado por coleta das leituras obtidas do espalhamento de luz em ângulo de 90°, sendo os resultados expressos pela média obtida de 5 leituras (1 leitura por corrida).

5.10 Transferência de Éster de Colesterol (OC), Fosfolípides (PL) e Colesterol Livre (CL) para a HDL

A transferência de OC, PL e CL foi determinada pelo método de substrato exógeno (STOKKE & NORURN, 1971; CHANNON *et al.*, 1990). Emulsões lipídicas marcadas radioativamente com oleato de colesterol (OC-³H) e fosfolípides (PL-¹⁴C) ou colesterol livre (CL-³H) foram incubadas com plasma por 1 hora. Decorrido o tempo, a emulsão foi precipitada juntamente com as partículas contendo apoB presentes na alíquota de plasma utilizado, seguido de ultracentrifugação e coleta do sobrenadante para determinação da radioatividade por cintilação líquida. As transferências de OC, PL e CL foram expressas como porcentagem de OC-³H, PL-¹⁴C e CL-³H, transferidas por hora, para a HDL (% CPM transferido/h).

5.11 Modelo Celular de Captação da LDE

A linhagem celular de endotélio microvascular humano modificado com o vírus SV-40 (PRUCKLER *et al.*, 1993) foi utilizada para verificar a captação da LDE. A linhagem celular foi cedida (em colaboração) pelo Prof. Dr. Antônio Ricardo Gagliardi da Unidade de Dislipidemias do Incor-HCFMUSP, em placas de 24 poços que foram mantidas em estufa umedecidas (5% de CO₂, 95% de ar), a 37°C, em meio de cultura MCDB131 (Sigma ®) enriquecido com L-glutamina (2mM), EGF (30ng/mL) e 10% de soro fetal bovino sem antibiótico. O meio foi trocado a cada dois dias antes do ensaio. Os ensaios foram realizados com 80% de confluência celular.

Vinte e quatro horas antes do ensaio, o meio foi substituído por MCDB131, porém suplementado com soro deficiente em lipoproteínas (LPDS) (GOLDSTEIN *et al.*, 1976). No dia seguinte, as células foram submetidas à incubação em triplicata com alíquotas da LDE marcada com 250.000 CPM de CL-³H e OC-¹⁴C a 37°C, por 4h.

Alíquotas de 5,0μL da LDE foram incubadas em placas com a linhagem celular a 37°C, por 4h. Após este período, as células foram lavadas 3 vezes com solução PBS a 4°C e duas vezes com PBS a 37°C. Em seguida, foi adicionado 0,3mL de solução de tripsina-versene (0,2%) e incubadas a 37°C em estufa com agitação mecânica por 15 minutos. Após esse processo, a suspensão celular foi transferida para tubos Eppendorf com adição direta de 1,0mL de FOLCH e

agitadas sob vórtex para ruptura das membranas celulares. A radioatividade presente nas amostras foi medida por cintilação líquida.

5.12 Cultura de Células NCI-H292 para Realização dos Estudos de Bloqueio de Captação da LDE

Para os ensaios de bloqueio de captação foram utilizadas as células de carcinoma mucoepidermoide de epitélio brônquico humano da linhagem NCI-H292, adquiridas do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo-Brasil). As células foram mantidas em estufas umedecidas (5% de CO₂, 95% de ar), a 37°C, em meio de cultura RPMI-1640, sem glutamina, enriquecido com bicarbonato de sódio (2g/L), 10% de soro fetal bovino, 50µg/mL de estreptomicina e 50UI/mL de penicilina. As células foram mantidas em cultura de monocamada em garrafas de 75cm² e repicadas a cada dois dias.

Para realização dos estudos de bloqueio do LDL-r, as placas foram incubadas com anticorpo primário monoclonal anti-receptor humano de LDL (Amershan®, isotipo IgG2b, clone C7, camundongo) na concentração de 6,25, 3,125 e 2,085µg/mL em triplicata por 18h, *overnight*, a 4°C. Após incubação os poços foram lavados com TRIS-HCL (pH 7,6) por 5 minutos.

Alíquotas de 19µL LDE com aproximadamente 250.000 CPM de marcação para oleato de colesterol-¹⁴C foram incubadas com a linhagem celular H292 em

placas de 24 poços a 37°C, por 4h. Após este período as células foram lavadas 3 vezes com solução PBS a 4°C e duas vezes com PBS a 37°C. As células foram submetidas à ação da solução de tripsina-versene (0,2%) e mantidas entre 2 a 3 minutos em estufa umedecida. As células foram destacadas da parede da garrafa com adição de 10mL de meio RPMI 1640 enriquecido. A suspensão celular foi centrifugada a 1.500 rpm por 3 minutos. O botão celular foi lavado por 3 vezes com tampão PBS (pH 7,4) para remoção do meio. Após esse processo a suspensão celular foi transferida para tubos Eppendorf com adição direta de 1,0mL de FOLCH e agitadas sob vórtex para ruptura das membranas celulares. A radioatividade presente nas amostras foi medida por cintilação líquida.

5.13 Análise Histológica, Imunohistoquímica Convencional e

Dupla Marcação

Os fragmentos de tecido coletados foram limpos sob placa de gelo orientados para proporcionar a visualização das túnicas íntima, média e adventícia. Após orientação, os fragmentos foram incluídos em resina para congelamento *tissue freezing medium* (JUNG, Leica instruments GmbH – Germany), imersos em becker contendo isopentano para evitar congelamento brusco e então este becker foi parcialmente imerso em *container* contendo nitrogênio líquido. Após a inclusão do material, este foi seqüencialmente cortado em criostato (Reichert-Jung) para confecção dos cortes histológicos com 5µm de espessura que foram aderidos a lâminas de vidro silanizado (2 cortes/lâmina para 05 lâminas/fragmento). Os cortes aderidos nas lâminas foram fixados em acetona por 10 minutos e devidamente armazenados a –20°C para posterior realização das análises histopatológica e imunohistoquímica.

A análise histopatológica foi feita sob cortes congelados submetidos à coloração usual pela hematoxilina e eosina.

A presença de receptores para LDL, CD36, CD68 e von Willebrand factor (vWf) foi investigada em células da túnica íntima, túnica média e túnica adventícia de fragmentos vasculares e em tecido pericárdico proveniente de pacientes com doença aterosclerótica coronária pela reação da fosfatase alcalina ou imunoperoxidase, utilizando como cromógenos o *FAST RED* e a *NEW FUCHSIN substrate system* ou diaminobenzidina (DAB) (DAKO®, USA), respectivamente.

Para verificar a presença dos LDL-r, após fixação, seguida da reação de bloqueio com albumina bovina a 1% por 30 minutos, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário monoclonal anti-receptor humano de LDL (OncogeneTM, classe e subclasse IgG2_{ak}, clone 15C8, camundongo) na concentração de 3mg/ml por 18h, *overnight*, a 4°C, seguida de incubação com anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina (Calbiochem-Novabiochem Corporation, San Diego - USA, cat. no. 401252), com título 1:500 por 1h a 37°C. Após cada incubação, os cortes foram lavados com TRIS-HCL (pH 7,6) por 5 minutos.

Para verificar a presença do CD68, após fixação, seguida da reação de bloqueio com albumina bovina a 1% por 30 minutos, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário monoclonal anti CD68 humano (DAKO ®, isotipo IgG, clone kp1, camundongo), com título 1:100 por 1h a 37°C, em estufa, seguida de incubação com anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina (Calbiochem-Novabiochem Corporation, San Diego - USA, cat. no. 401252), com título 1:500 por 1h a 37°C. Após cada incubação, os cortes foram lavados com TRIS-HCL (pH 7,6) por 5 minutos.

Quanto à presença do vWf, após fixação, seguida da reação de bloqueio com albumina bovina a 1% por 30 minutos, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário monoclonal antifator de von Willebrand humano (DAKO ®, isotipo IgG, cod. A 0082, coelho), com título 1:1200 por 1h a 37°C, em estufa, seguida de incubação com o sistema DAKO LSAB ®, peroxidase, pronto para uso. Este sistema consiste de duas etapas: na primeira adiciona-se ao corte o anticorpo *link* (ligação) polivalente, ou seja, *anti-rabbit*, *anti-mouse* e *anti-goat*, por aproximadamente 1h a 37°C; na segunda etapa, adiciona-se a peroxidase

conjugada a estrepto-avidina, também por aproximadamente 1h a 37°C. Após cada incubação a 37°C em câmara úmida, dentro da estufa, os cortes foram lavados com TRIS-HCL (pH 7,6) por aproximadamente 5 minutos.

Para a marcação do CD36, após fixação, seguida da reação de bloqueio com albumina bovina a 1% por 30 minutos, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário monoclonal anti CD36 humano (Serotec Product®, isotipo IgM, clone SM0, camundongo), com título 1:20 por uma 1h a 37°C, em estufa; em seguida, foi feita a incubação com anticorpo secundário IgG biotinilado (coelho) anti IgM de camundongo (DAKO® Corporation, Carpinteria, USA, CA-93013), com título 1:150, finalizando com a segunda etapa do sistema DAKO LSAB®, peroxidase, pronto para uso (acima descrito).

O controle positivo para as marcações imunohistoquímicas acima descritas foi obtido utilizando-se cortes histológicos de fígado humano (5µm de espessura), tecido positivo para as marcações estudadas. O controle negativo foi obtido utilizando-se os mesmos cortes histológicos incubados com anticorpo primário irrelevante. As lâminas foram montadas em meio aquoso Aquatex (MERK® KGAA, 64271, Darmstadt, Alemanha) e então analisadas em microscopia de luz para 100, 400 vezes e imersão.

A revelação das marcações com peroxidase foi determinada utilizando-se DAB (40mg) em 100mL de TRIS-HCL pH 7,6 acrescido de 6µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) concentrado por 5 a 10 min. O corte foi em seguida contracorado com solução de hematoxilina de Harris por 30 segundos.

Toda a vidraria exposta ao DAB foi cuidadosamente lavada com hipoclorito de sódio a 1%, assim como, utilizado material de proteção adequado para o seu manuseio devido ao seu caráter carcinogênico.

As lâminas dos controles positivos foram montadas após desidratação em álcool a 70, 95 e 100%, por aproximadamente dois minutos cada, seguida de duas passagens por xileno (a primeira por um minuto e a segunda por tempo suficiente para montagem) ou, quando necessário, em meio aquoso (acima descrito). Finalmente, as lâminas foram montadas utilizando-se Entellan (MERCK ®, Alemanha) ou Aquatex ®, quando necessário, e lamínula. Para a dupla marcação foram utilizados os mesmos procedimentos descritos acima, porém efetuando-se cada marcação isoladamente até o fim do procedimento com suas respectivas revelações. Quando uma das marcações era feita com DAB, este era utilizado primeiro devido a sua reação alterar ou diminuir a coloração dos cromógenos solúveis em solventes orgânicos.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

6.1 Teste de Kolmogorov-Smirnov

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a normalidade da distribuição dos dados, ou seja, quando a distribuição for normal, tem-se evidência para utilizar testes paramétricos, quando não, utilizar testes não-paramétricos relacionados. Este é um teste de aderência, ou seja, verifica o grau de concordância entre a distribuição de um conjunto de valores amostrais observados e outra distribuição teórica. Este teste foi utilizado após estatística descritiva para decidir qual tipo de teste, em função da distribuição dos dados, melhor se aplicava à análise dos dados das determinações bioquímicas, dos estudos cinéticos, da captação de colesterol livre e éster de colesterol nos fragmentos de enxerto vascular e pericárdio e dos estudos de transferência de CL, PL e OC.

Este teste é considerado como tendo um bom poder, mesmo em amostras pequenas, pois trata dos valores individuais.

6.2 Teste de Mann-Whitney

O teste de Mann-Whitney serve para testar a hipótese de que duas populações têm a mesma distribuição. Este teste é, portanto, uma alternativa para o teste t no caso de amostras independentes. Esse teste foi utilizado quando as pressuposições, exigidas para o teste t , estavam seriamente comprometidas ou a

amostragem era pequena. Esse teste foi utilizado para a análise parcial ponto a ponto das curvas de decaimento plasmático da LDE, após análise estatística do comportamento geral das curvas por Kruskal-Wallis, se e somente se, as pressuposições para o teste paramétrico relacionado (ANOVA) estivessem comprometidas.

6.3 Teste de Kruskal-Wallis

O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para testar a hipótese de que 3 ou mais medidas (populações) estudadas tinham a mesma distribuição. Foi portanto uma alternativa a análise de variância (ANOVA) quando a amostra analisada era pequena e/ou as pressuposições para proceder com a ANOVA estivessem comprometidas. Esse teste foi utilizado para analisar cada fase da cinética de remoção plasmática dos lípidos marcados.

6.4 Teste de Correlação Linear

O coeficiente de correlação linear de Spearman foi aplicado para avaliar a correlação entre as determinações bioquímicas, por exemplo glicemia e perfil lipídico, tamanho das partículas de HDL, LDE e subfrações, resultados dos estudos de transferência e entre cinética plasmática dos lipídios com a captação vascular.

Os *softwares* utilizados foram GraphPad InStat TM, SigmaStat versão 2.03, Grafit Data Analysis and Graphics Program versão 3.01 e Microcal TM Origin TM versão 4.10.

Em todas as análises efetuadas, os parâmetros analisados foram considerados significativamente diferentes quando obtive-se P bicaudal $< 0,05$ para um intervalo de confiança de 95%.

7. RESULTADOS

7.1 Lípidos Plasmáticos

Na tabela 4 observa-se os valores de caracterização da concentração dos lípidos e glicose no plasma dos pacientes. Não houve associação entre os dados dos lípidos e glicose plasmáticos dos pacientes com o dados oriundos dos estudos cinéticos e de captação.

TABELA 4 - Concentração de lípidos e glicose no plasma dos pacientes estudados (Média $\pm$ EPM).

^a Determinações Laboratoriais	Concentrações
<u>N=20</u>	<u>mg/dL</u>
<i>Colesterol</i>	
Total	204 $\pm$ 12
LDL	129 $\pm$ 11
HDL	41 $\pm$ 3
VLDL	34 $\pm$ 5
<i>Triglicérides</i>	170 $\pm$ 23
Glicose	114 $\pm$ 9

LDL = Lipoproteína de baixa densidade, HDL = Lipoproteína de alta densidade, VLDL = lipoproteína de densidade muito baixa. ^a No momento da coleta sanguínea os pacientes estavam utilizando estatinas há pelo menos três semanas.

7.2 Remoção Plasmática da LDE

A figura 4 mostra as curvas médias de decaimento plasmático dos lípidos CL-³H e OC-¹⁴C da LDE após injeção em 20 pacientes. Nota-se que a primeira fase da exponencial da curva do colesterol livre decai mais rapidamente do que a do éster de colesterol ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis). Por outro lado, a segunda fase da exponencial das curvas dos lípidos CL-³H e OC-¹⁴C da LDE não diferiu ($p > 0,05$, Mann-Whitney). A análise das TFR é mostrada na tabela 5.

7.3 Parâmetros de Transferência da LDE

As constantes de transferência $k_{1,2}$ e $k_{2,0}$ dos lípidos CL e OC da LDE diferiram significativamente ($p < 0,05$, Mann-Whitney). Embora não se observe diferença entre as constantes de transferência $k_{1,0}$ dos lípidos CL e OC da LDE ($p > 0,05$, Mann-Whitney), existe uma tendência para a remoção mais rápida do CL em relação ao OC durante a 1ª fase da curva de remoção plasmática da LDE.

A análise comparativa entre as constantes de transferência é mostrada na tabela 6.

Figura 4. Curvas de decaimento plasmático dos lipídios OC-14C e CL-3H da LDE. Após injeção endovenosa da LDE foram feitas coletas sangüíneas em tempos pré-determinados para determinação da radioatividade presente no plasma.

TABELA 5 – Taxa fracional de remoção plasmática dos lípidos CL-³H e OC-¹⁴C da LDE

LDE	TFR h ⁻¹	Valor de p*
CL- ³ H	0,0526 ± 0,0123	0,564
OC- ¹⁴ C	0,0635 ± 0,0087	

* Teste de Mann-Whitney.

TABELA 6 – Análise das constantes de transferência (k) dos lípidos CL-³H e OC-¹⁴C da LDE

K	Mediana e percentil (25 - 75%)	Valor de p*
K1,0 CL	0,5970 (0,405 – 0,799)	0,058
K1,0 OC	0,340 (0,0525 – 0,704)	
K1,2 CL	0,6550 (0,195 – 1,158)	0,007
K1,2 OC	2,0140 (0,638 – 4,000)	
K2,0 CL	0,0287 (0,0236 - 0,00572)	0,006
k2,0 OC	0,0558 (0,0297 - 0,00721)	

* Teste de Mann-Whitney.

7.4 Medida de Radioatividade Plasmática e Captação Tecidual da LDE

A figura 5.A mostra a radioatividade residual dos lípidos CL-³H e OC-¹⁴C da LDE medidos no plasma após 0,08, 1, 4, 8 e 24 h da injeção da LDE. No plasma, a quantidade de OC-¹⁴C foi aproximadamente duas vezes maior do que a quantidade de CL-³H em todos os tempos de coleta.

A figura 5.B mostra os valores de captação dos lípidos CL-³H e OC-¹⁴C da LDE expressa em % da radioatividade injetada por grama de tecido. A quantidade de CL-³H da LDE captado foi (em todos os fragmentos de tecido) maior do que a do OC-¹⁴C da LDE. A relação entre a captação do CL-³H e do OC-¹⁴C da LDE foi de aproximadamente cinco vezes na aorta ($p = 0,0379$, Mann-Whitney), quatro vezes na artéria torácica interna ($p = 0,033$, Mann-Whitney), 10 vezes na veia safena ($p = 0,006$, Mann-Whitney) e quatro vezes no pericárdio ($p = 0,010$, Mann-Whitney). Apenas na artéria radial os valores dos lípides radioativos CL-³H e OC-¹⁴C da LDE não atenderam significância estatística ($p = 0,053$, Mann-Whitney).

Figura 5. Radioatividade medida dos lípidos OC-¹⁴C e CL-³H no plasma (A) e nos fragmentos das artérias aorta, torácica interna e radial, da veia safena e do pericárdio (B). Aorta n=7; torácica interna n=14; artéria radial n= 7; veia safena n= 10; pericárdio n= 8.

7.5 Cálculo da Proporção entre Massa, Mol e Moléculas de CL e OC na LDE

A partir das informações contidas nos prospectos dos lípides marcados CL- ^3H e OC- ^{14}C , foi realizado o cálculo da proporção destes lípides na LDE. Ou seja, cada 85,5 μCi de OC correspondem a 1mg de massa de OC, e cada 12,9mCi de CL corresponde a 1mg de massa de CL; sendo assim, calculou-se o valor de 1 μCi por regra de três simples, ($1\mu\text{Ci} = 2,22 \times 10^6 \text{ DPM}$) para cálculo das proporções. Desta forma, foi possível calcular a proporção para massa, número de moléculas e número de moles entre OC e CL para cada LDE utilizada. A relação média obtida para a proporção entre os radioisótopos (OC/CL) presentes na LDE foi de 110,78 $\pm$ 6,66, para massa; de 65,59 $\pm$ 3,98, para número de moléculas, e de 66,09 $\pm$ 3,85, para número de moles (Média $\pm$ SD).

7.6 Estudos de Captação *In Vitro* da LDE Utilizando Células de Microendotélio Vascular Humano (HMEC)

A figura 6 mostra o resultado do estudo de captação da LDE utilizando a linhagem celular de endotélio microvascular humano modificado com o *Simiam* vírus 40 (SV-40). Após a extração dos lípides marcados foi medida a radioatividade presente nas amostras por cintilação líquida. A razão de captação entre os lípidos CL e OC da LDE obtida foi igual a 1,09, ou seja, não há diferença entre a captação dos lípidos da LDE. Os estudos de captação foram realizados após 80% de confluência celular.

Figura 6. Captação da LDE utilizando a linhagem celular de endotélio microvascular humano (HMEC). A razão de captação entre os lípidos CL e OC da LDE foi igual a 1,09.

7.7 Estudos de Bloqueio de Captação da LDE em Células de Microcarcinoma Pulmonar (epitélio brônquico) NCI-H292

A figura 7 mostra o resultado dos estudos de bloqueio da captação da LDE marcada com OC-C¹⁴ pela linhagem celular NCI-H292. O estudo de bloqueio revelou alguns aspectos importantes como: a remoção da LDE pode estar sendo feita por outros receptores para lipoproteínas além do LDL-r; o bloqueio com o clone de anticorpo utilizado (clone C7) pode não ser 100% eficiente, bloqueando apenas pouco mais de 40% da captação das partículas após a concentração de 2,085µg/mL e efeito de prozona, ou seja, há excesso de anticorpos competindo pelo mesmo determinante antigênico. Verificou-se, ainda, que a saturação do sistema se dá com o dobro da concentração de anticorpos utilizados no bloqueio, ou seja, 6,25µg/mL, pois não houve (com esta concentração) nenhuma alteração observada na captação da LDE.

Figura 7. Bloqueio da captação da LDE marcada com OC-C¹⁴, na linhagem celular NCI-H292. Foram utilizadas três concentrações diferentes para estabelecer a concentração de bloqueio e saturação do sistema, ou seja, 2,085, 3,125 e 6,25µg/mL. A concentração de 3,125µg/mL mostra o fenômeno de prozona. O controle representa a captação sem anti-LDLr.

7.8 Estudo do Tamanho das Partículas da HDL dos Pacientes

A tabela 7 mostra o diâmetro e polidispersidade das partículas de HDL dos pacientes. Não foi encontrada associação entre os parâmetros analisados (captação tecidual, TFR, transferência e concentração de lípides plasmáticos) e o tamanho da HDL dos pacientes do estudo ($p > 0,05$, Speman).

TABELA 7 - Diâmetro e polidispersidade por *Laser Light Scattering* (ZetaPALMS, Brookhaven Instr. Corp.) da lipoproteína HDL dos pacientes (diâmetro efetivo / metade do diâmetro efetivo).

Características	HDL	Valor de Referência
Diâmetro	9,98 / 2,48 nm	7 - 17 nm
Polidispersidade	0,078	*

*De 0,00 a 0,020 (monodispersa); 0,020 a 0,080 (pouco dispersa); e $> 0,080$ (polidispersa).

7.9 Estudos de Transferência de Éster de Colesterol (OC), Fosfolípides (PL) e Colesterol Livre (CL) para a HDL

A figura 8 mostra a transferência de OC-³H, PL-¹⁴C e CL-³H para a partícula de HDL dos pacientes. As transferências de OC, PL e CL foram expressas como porcentagem de OC-³H, PL-¹⁴C e CL-³H transferidas por hora para a HDL (% CPM transferido/h). Embora o resultado seja prematuro, não foi observada associação entre os estudos de transferência dos lípides da LDE com a captação vascular de CL e OC, com a TFR e com os lípides plasmáticos ($p > 0,05$, Sperman).

Figura 8. Transferências de OC-³H, PL-¹⁴C e CL-³H por hora para a HDL (% CPM transferido/h) (Média ± SD).

7.10 Estudos Histológicos e Imunohistoquímicos

O painel 1 mostra as marcações imunohistoquímicas para a identificação do LDL-r em fragmentos de tecido vascular coletados após descarte. Os fragmentos foram seqüencialmente cortados para confecção dos cortes histológicos com 5µm de espessura e orientados para proporcionar a visualização das tûnicas íntima, média e adventícia.

Painel 1. Marcação para LDL-r usando fosfatase alcalina. **1.A.** reação negativa para aorta, **2.A.** para veia safena, **3.A.** t. interna. As reações positivas são demonstradas por **1.B.**, **2.B.**, **3.B.**, respectivamente. **End** = célula endotelial, **Fb** = fibroblastos, **SMC** = células musculares lisas, **N**= neutrófilos, **T. Int**= túnica interna, **T. Méd**= túnica média, **T.Ad**= túnica adventícia e **LB**= lâmina basal. Microscopia de luz, aumento 400 vezes.

Este tipo de marcação específica observada nos cortes positivos (1.B., 2.B. e 3.B.) mostra a presença dos LDL-r nas células endoteliais, fibroblastos, neutrófilos (98%) e linfócitos (2%) presentes nos cortes histológicos analisados. As células marcadas foram identificadas a partir de suas características morfológicas e tipo de localização tecidual. No painel 2, a seguir, observa-se os cortes de pericárdio.

Painel 2. Marcação para LDL-r usando fosfatase alcalina. O corte 4.A. mostra a reação negativa e o corte 4.B mostra a reação positiva para pericárdio. **N**= neutrófilos (98%) e **Linf** = linfócitos (2%). Microscopia de luz, aumento 400 vezes.

Um ponto importante destes resultados imunohistoquímicos foi o tipo de marcação observada para o LDL-r, ou seja, uma marcação difusa pouco convencional (1.B., 2.B. e 4.B.).

A tabela 8 demonstra o tipo de tecido, célula, intensidade de marcação e técnica utilizada para localização do LDL-r.

TABELA 8 - Tipo de tecido, célula e intensidade de marcação mais prevalente para o LDL-r.

Tecido	Intensidade da Marcação	Marcação e Técnica Imunohistoquímica Utilizada
Aorta	+++/ Infiltrado Mielomonocítico*	LDL-r/ Fosfatase Alcalina/ <i>FAST RED</i>
T. Interna	+/Cél. Endoteliais, fibroblastos	LDL-r/ Fosfatase Alcalina/ <i>FAST RED</i>
V. Safena	+/ **Fibroblastos	LDL-r/ Fosfatase Alcalina/ <i>FAST RED</i>
Pericárdio	+++/ Fibroblastos, Infiltrado Mielomonocítico*	LDL-r/ Fosfatase Alcalina/ <i>FAST RED</i>

* Neutrófilos (98%) e linfócitos (2%), ** túnica adventícia. + = marcação focal, ++ = marcação intensa, +++ = marcação intensa difusa.

O painel 3 mostra as marcações para CD36, CD68 e LDL-r presentes em células da túnica íntima, túnica média e túnica adventícia dos fragmentos vasculares de aorta provenientes dos casos estudados.

Painel 3. Túnicas íntima e média dos tecidos vasculares de aorta, cortes 5.A, 5.B, 6.A, 6.B e 7.A. O corte 5.A mostra a marcação positiva para CD36 em células endoteliais, fibroblastos e SMC, técnica de imunoperoxidase - cromógeno DAB. Os cortes 5.B e 6.A mostram o controle negativo e o corte positivo, respectivamente, para CD68, por fosfatase alcalina – cromógeno FAST RED. Os cortes 6.B e 7.A, corte positivo e controle negativo, mostram infiltrado mielomonocítico com marcação positiva para LDL-r, por fosfatase alcalina – cromógeno FAST RED. Todos os cortes foram contracolorados com hematoxilina não alcoólica. **T.Int.** = túnica íntima; **T. Méd.** = túnica média. Microscópio de luz com aumento de 400 vezes.

7.11 Dupla Marcação Imunoenzimática para Constituintes

Celulares: von Willebrand factor (vWf) e LDL-r

A dupla marcação foi utilizada para, além das evidências morfológicas, confirmar por imunohistoquímica a presença do LDL-r nas células endoteliais. A marcação positiva para o fator de von Willebrand humano (vWf) identifica a célula como de origem epitelial. Este resultado conjunto à marcação positiva para o LDL-r confirma a presença do LDL-r nas células do endotélio vascular humano, túnica íntima. No painel 4 pode-se verificar a marcação positiva para vWf na túnica íntima por imunoperoxidase. Utilizou-se a diaminobenzidina – DAB como cromógeno. A marcação positiva para o LDL-r presente tanto em células endoteliais mais internas, próximas à lâmina basal, quanto em fibroblastos e polimorfonucleares neutrófilos presentes à túnica média, foi realizada com fosfatase alcalina utilizando o cromógeno FAST RED. A figura 3.B. no painel 1 evidencia, isoladamente, a presença do LDL-r nas células do endotélio vascular humano.

Painel 4. Dupla Marcação para vWf e LDL-r usando fosfatase alcalina e imunoperoxidase, respectivamente. O corte 8.A. mostra a reação positiva para vwf (túnica íntima, seta preta) e LDL-r próximo à lâmina basal (seta branca); o corte 8.B mostra a reação positiva para vwf (túnicas íntima e adventícia) e LDL-r em fibroblastos e PMN próximo à lâmina basal em cortes de torácica interna. Microscopia de luz, aumento 400 vezes.

8. DISCUSSÃO

Recentemente foi demonstrado que a remoção plasmática do colesterol livre é mais rápida do que a do éster de colesterol (SANTOS *et al.*, 2003). Neste estudo, comparando a remoção plasmática dos lípides radioativos da LDE entre pacientes com e sem DAC, verificou-se também que embora exista diferença na remoção plasmática do colesterol livre, não existe diferença na remoção plasmática do éster de colesterol entre os grupos estudados. Este resultado, quando analisado conjuntamente aos achados de captação vascular e pericárdio da LDE obtidos neste estudo, mostrou que existe uma relação entre o colesterol livre que é removido do plasma e o colesterol livre que é captado pelos tecidos (figura 5). Em 2004, SANTOS *et al.* mostraram que o tempo de residência plasmática dos lípides OC-¹⁴C e CL-³H da LDE e a concentração plasmática de LDL-C em pacientes com hipercolesterolemia familiar diminuiu 49 e 36%, respectivamente, após tratamento com altas doses de sinvastatina (80mg/dia) durante dois meses. Este é um resultado muito importante, pois os pacientes após tratamento apresentaram os mesmos tempos de residência plasmática para os lípides da LDE quando comparado ao grupo controle (pacientes nomolipidêmicos). Em relação aos dados obtidos neste trabalho, no qual aproximadamente 98% dos pacientes estavam sendo tratados com estatinas (atorvastatina e sinvastatina), doses correspondentes a apenas ¼ da dose utilizada por SANTOS *et al.* (2004), provavelmente, nesta dosagem, as estatinas tenham acelerado apenas a remoção do éster de colesterol a partir do final da primeira fase e durante a segunda fase

da curva de remoção plasmática, representada por $K_{1,2}$ e $k_{2,0}$, respectivamente, onde se observa o aumento aparente da remoção do éster de colesterol em relação ao colesterol livre (figura 4). Ao se comparar estes resultados com o trabalho de SANTOS *et al.* (2003), em pacientes com e sem DAC, pode-se verificar que apenas o comportamento cinético do éster de colesterol nos pacientes com DAC foi diferente em relação aos achados aqui encontrados, ou seja, provavelmente as estatinas (mesmo em doses baixas) devam influenciar a remoção do éster de colesterol. O fato do colesterol livre se movimentar mais livremente entre as frações lipídicas, plasma e tecidos, quando comparado ao colesterol esterificado, pode em parte explicar a menor influência das estatinas sob o comportamento cinético do $CL-^3H$ da LDE. O aumento da expressão dos receptores de LDL, principalmente hepáticos, pelo tratamento com estatinas aumenta a remoção das partículas de LDL e (conjuntamente) de LDE, como mostrado por SANTOS *et al.* (2004).

Em relação à cinética de remoção plasmática, a ausência de diferença entre as TFR (figura 4) é explicada pela complementação das áreas das curvas dos lípidos da LDE, ou seja, por definição a TFR é igual a razão $100\%/AUC_{[0-\alpha]}$. A integral destas áreas vai de zero a infinito (α), fenômeno este que proporcionou, por complementaridade das áreas, a não diferença entre as TFR dos lípidos da LDE neste estudo.

Segundo NICOLL *et al.* (1981), o influxo de VLDL, IDL e LDL é significativamente mais alto em íntimas vasculares ateromatosas do que em íntimas normais. Este é um ponto importante para este estudo, pois o aumento do

influxo de colesterol livre na íntima vascular pode também ser justificado pela ateromatose discreta observada após análise histopatológica dos cortes de aorta dos pacientes.

Outro aspecto importante dos achados deste estudo foi o comportamento da razão colesterol livre / éster de colesterol entre plasma e tecidos. No plasma observou-se que a razão foi baixa, ou seja, mais éster de colesterol; enquanto que em todos os tecidos analisados a razão foi alta, mais colesterol livre. A análise estatística das razões CL/OC entre os fragmentos de tecido vascular e de pericárdico não mostrou diferença significativa (dados não publicados). Ainda na década de 1970, STENDER *et al.* (1978), estudando a captação de lipoproteínas naturais, observaram discrepâncias entre a razão de colesterol livre e éster de colesterol na íntima vascular e no plasma de três espécies animais. Foi observado que a razão na parede vascular era muitas vezes maior do que a razão dos lípides no plasma. Estes achados em modelo animal corroboram as evidências aqui encontradas. Em relação às características estruturais da LDE, a relação colesterol livre / éster de colesterol na partícula é infimamente baixa, ou seja, a partícula possui muitas vezes mais éster de colesterol do que colesterol livre. Se se considerar os aspectos fisiológicos que influenciam a cinética de remoção dos lípides de lipoproteínas naturais, como influxo e efluxo do colesterol livre para a parede vascular, este pode ser explicado como uma troca entre o colesterol livre das lipoproteínas contra o colesterol livre das células endoteliais da íntima vascular, sem haver, necessariamente, um equilíbrio de troca proporcional para o éster de colesterol (DAY *et al.*, 1970; DAYTON *et al.*, 1970; ADAMS *et al.*, 1975). No estudo de NORDESTGAARD *et al.* (1990) foi verificado que quantitativamente

existem rotas importantes para o efluxo da HDL e da LDL da parede vascular. As rotas mais importantes para remoção do colesterol das partículas de HDL são, provavelmente, através da *vasa vasorum* e/ou vasos linfáticos presentes na túnica média externa e adventícia, enquanto que para as partículas de LDL o efluxo é possivelmente realizado, apenas, via lumen arterial. Tentando correlacionar os achados de captação tecidual dos lípides da LDE com a transferência de lípides plasmáticos, foram realizados os estudos de transferência de lípides radioativamente marcados da LDE para a HDL dos pacientes. Os dados de transferência de éster de colesterol, fosfolípido e colesterol livre da LDE para a HDL demonstraram não haver correlação com as variáveis analisadas neste trabalho, como, por exemplo, o tamanho das partículas de HDL, a concentração de lípides plasmáticos, a cinética de remoção da LDE e a captação tecidual. O resultado dos estudos de transferência pode ser prematuro em função do tamanho da casuística aqui utilizada. Por outro lado, os resultados de transferência de colesterol livre, de éster de colesterol e de fosfolípidios obtidos foram compatíveis com os dados registrados na literatura (TAN *et al.*, 1999; KWONG *et al.*, 2002; KASER *et al.*, 2003).

Os estudos de captação *in vitro* utilizando a linhagem celular de endotélio microvascular humano mostraram que a captação dos lípides da LDE, à mesma atividade específica, é equivalente, ou seja, as células captaram o mesmo conteúdo de colesterol livre e éster de colesterol presentes nas partículas. Este experimento foi realizado para excluir variáveis biológicas que poderiam promover uma captação preferencial do CL em relação ao OC. A razão de captação celular da LDE (CL / OC) neste experimento foi igual a 1,09. Este resultado mostra

claramente que a captação *in vitro* dos lípides da LDE, a mesma atividade específica, é igual. Seguindo ao estudo de captação, foi realizado o estudo de bloqueio de captação que evidenciou três aspectos importantes, como a remoção da LDE que pode estar sendo feita por outros receptores para lipoproteínas além do LDL-r, o bloqueio com o clone C7 do anti-LDL-r que pode não ser 100% eficiente e o efeito de prozona aparente após a concentração inicial do anticorpo utilizado. Excluindo as peculiaridades relacionadas à relação antígeno-anticorpo, em função dos resultados obtidos, é muito provável que a LDE seja removida por outros receptores para lipoproteínas.

Os estudos histológicos e imunohistoquímicos nos fragmentos vasculares e de pericárdio dos pacientes permitiram a identificação (marcação positiva) do LDL-r em células endoteliais, fibroblastos, neutrófilos e linfócitos presentes nos cortes histológicos analisados. Embora cada fragmento analisado tenha apresentado peculiaridades características em relação aos tipos celulares mais prevalentes de cada túnica, vários parâmetros foram utilizados para identificação das células a partir de suas características morfológicas, localização tecidual e dupla marcação imunohistoquímica. Um achado imunohistoquímico importante foi o tipo de marcação observada para o LDL-r, ou seja, uma marcação difusa pouco convencional, como se o receptor estivesse sendo expresso também nas células adjacentes. Não foram ainda descritas outras formas de expressão para o LDL-r diferentes das formas de membrana e citoplasmática. Provavelmente, este padrão difuso represente a expressão do receptor em células não ativadas, porém, sob ação de mediadores solúveis como citocinas, interleucinas e fatores de crescimento secretados em situações de estresse pelas células do infiltrado

celular (GIERENS *et al.*, 2000). Esta marcação localizada nos infiltrados de aorta pode estar evidenciando um papel importante do LDL-r ainda não associado ao mecanismo clássico da aterogênese. As marcações positivas para o LDL-r, CD36 e CD68 presentes nas túnicas íntima, média e adventícia dos cortes de aorta mostram a capacidade de captação de lipoproteínas tanto naturais quanto artificiais. Este resultado é muito importante, pois a presença dos receptores cria a possibilidade para tratamento farmacológico utilizando veículos lipoprotéticos.

Em relação à torácica interna (artéria mamária) que é bastante utilizada como enxerto vascular e tem sido citada como ótimo enxerto a médio e longo prazos, as marcações observadas foram focais e de baixa intensidade para o LDL-r (tabela 8). Em relação à captação de lipoproteínas, este resultado pode em parte, proporcionar um prognóstico favorável aos pacientes que fazem este tipo de enxerto, pois ainda não foi demonstrado nenhum tipo de participação do LDL-r na aterogênese. Ainda no painel 3, pode-se verificar que a marcação para CD36 e CD68 nos cortes de aorta foi bastante intensa. Este resultado pode ser abordado a partir de dois aspectos básicos: O CD36 e CD68 são moléculas de superfície que identificam os receptores *scavengers* e marcação para macrófagos, respectivamente, marcadores estes que estão relacionados à progressão da aterogênese. DESRUMAUX *et al.* (2003) correlacionaram a marcação positiva para o CD68 com o aumento da expressão da PLTP por RT-PCR. A PLTP é uma proteína de transferência importantíssima associada ao metabolismo da HDL e ao RCT, atuando também no efluxo de colesterol celular (HUUSKONEN *et al.*, 2001). A expressão de PLTP por macrófagos presentes na aorta pode não ser importante o suficiente para diminuir a progressão da aterosclerose. Ainda não existem

evidências na literatura que comprovem a funcionalidade desta proteína de transferência secretada por macrófagos. Após a identificação do LDL-r nas células da túnica íntima (endotélio), realizou-se a dupla marcação para confirmar por imunohistoquímica a presença do LDL-r nas células endoteliais. Esta técnica foi necessária, pois as preparações histológicas não são totalmente isentas de erro, ou seja, algumas células podem ser arrancadas e então se posicionarem em outro local diferente da sua localização de origem, além da possibilidade de sofrerem também modificações artefatuais em sua morfologia prejudicando a sua identificação a partir de aspectos histomorfológicos. A marcação positiva para o fator de von Willebrand humano (vWf) identifica a célula como de origem endotelial (DONG *et al.*, 2004). Este achado conjunto confirma a presença do LDL-r nas células do endotélio vascular da túnica íntima humana. Esta pode ser uma via importante para captação da LDE nos vasos, visto que a LDE é removida da circulação via LDL-r (MARANHÃO *et al.*, 1993; MARANHÃO *et al.*, 1994).

Os resultados dos experimentos *in vitro* serviram apenas para dar suporte aos resultados *in vivo* de captação vascular dos lípidos da LDE, que representam o núcleo dos achados deste trabalho, mostrando uma remoção plasmática mais rápida do colesterol livre e em seguida a sua captação e/ou deposição preferencial em relação ao éster de colesterol em fragmentos vasculares e de pericárdio de pacientes com doença arterial coronária.

9. CONCLUSÕES

- I. A remoção plasmática do colesterol livre foi mais rápida do que a remoção do éster de colesterol.
 - II. A captação e/ou deposição do colesterol livre nos fragmentos de vaso e pericárdio foi maior do que a do éster de colesterol.
 - III. A razão entre o colesterol livre e o éster de colesterol obtida foi menor no plasma e maior nos tecidos, ou seja, mais éster de colesterol remanescente no plasma e mais colesterol livre depositado e/ou captado nos tecidos.
 - IV. Os estudos *in vitro* de captação celular com a LDE indicam, indiretamente, que a captação preferencial do CL da LDE é um fenômeno observado na doença arterial coronária.
 - V. Os receptores para a LDL natural e modificada identificados por imunohistoquímica podem ser os principais responsáveis pela remoção tecidual da LDE.
 - VI. Finalizando, os achados do presente trabalho são importantes para a elucidação de mecanismos relacionados à teoria da aterogênese e para mostrar a semelhança entre a LDE e a LDL natural, em relação ao comportamento de remoção plasmática e captação vascular tanto *in vivo* quanto *in vitro* observados na literatura.
-

10. REFERÊNCIAS

ACTON, S., RIGOTTI, A., LANDSCHULZ, K.T., XU, S., HOBBS, H.H., KRIEGER, M. Identification of scavenger receptor SR-B1 as a high-density lipoprotein receptor., *Science*, 271: 518 – 520, 1996.

ADAMS, C.W.M., KNOX, J., MORGAN, R.S. Exchange of plasma radioactive cholesterol with atheroma lipids in situ and implanted subcutaneously., *Atherosclerosis*, 22: 229, 1975.

ADES, E.W., CANDAL, F.J., SWERLICK, R.A., GEORGE, V.G., SUMMERS, S., BOSSE, D.C., LAWLEY, T.J. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line., *J Invest Dermatol*, 99: 6: 683 – 690, 1992.

ALAM, S.S., SOLEN, K.A., LAYMAN, D.L., RIDDLE, M.C., CONNOR, W.E. The mass uptake of cholesterol ester from low density lipoproteins by cultured smooth muscle and adventitial cells of human aortas., *Circ Res*, 47: 374 – 383, 1980.

ASSMANN, G., NOFER, J.R. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins., *Annu Rev Med*, 54: 321 – 341, 2003.

ATKINSON A.J., KUSHNER, W. Clinical Pharmacokinetics., *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 19 : 105 – 127, 1979.

AZARNOFF, D.L. Species differences in cholesterol biosynthesis by arterial tissue., *Proc Soc Exp Biol.*, 98: 680, 1958.

BARNES, S.E., WEINBERG, P.D. Two patterns of lipid deposition in the cholesterol-fed rabbit., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19: 2376 – 2386, 1999.

BARTER, P., KASTELEIN, J., NUNN, A., HOBBS, R. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions., *Atherosclerosis*, 168: 195 – 211, 2003.

BLANCHETTE-MACKIE, E.J., DWYER, N.K., AMENDE, L.M., KRUTH, H.S., et al. Type C Niemann-Pick disease: low density lipoprotein uptake is associated with premature cholesterol accumulation in the Golgi complex and excessive cholesterol storage in lysosomes., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 8022 – 8026, 1988.

BONDJERS, G., BJÖRKERUD, S. Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury. Part 4. Uptake and composition of cholesteryl ester in morphologically defined regions of atherosclerotic lesions., *Atherosclerosis*, 15: 273 -284, 1972.

BURNSTEIN, M., SCOLNICK, H. R., MORFIN, R. Rapid methods for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions., *J Lipid Res*, 11: 583 - 595, 1970.

CAPLAN, B.A., SCHWARTZ, C.J. Increased endothelial cell turnover in areas of in vivo Evans blue uptake in the pig aorta., *Atherosclerosis*, 17: 401-417, 1973.

CHAIT, A., HENZE, K., MAZZONE, T., JENSEN, M., HAMMOND, W. Low density lipoprotein receptor activity in fresh isolated human blood monocytes and lymphocytes., *Metabolism*, 31: 721-727, 1982.

CHANNON, K.M., CLEGG R.J., BHATNAGAR D., ISHOLA M., ARROL S., DURRINGTON, P.N. Investigation of lipid transfer in human serum leading the development of an isotopic method for the determination of endogenous cholesterol esterification and transfer., *Atherosclerosis*, 80: 3: 217 – 226, 1990.

CLARK, D.A., HAVEN, C.B., FRANKS, J.J. Comparison of cholesterol uptake in normal and atherosclerotic individuals., *P.S.E.B.M.*, 110: 764-766, 1962.

CNOP, M., GRUPPING, A., HOORENS, A., BOUWENS, L., PIPELEERS-MARICHAL, M., PIPELEERS, D. Endocytosis of low-density lipoprotein by human pancreatic β cells and uptake in lipide-storing vasicles, which increase with age., *Am J Pathol*, 156: 237-243, 2000.

DAY, A.J., WAHLQVIST, M.L., CAMPBELL, D.J. Defferencial uptake of cholesterol and of different cholesterol esters by atherosclerotic intima in vivo and in vitro., *atherosclerosis*, 11:301-320, 1970.

DAY, A.J., GOULD-HURST, P.R.S. Cholesterol esterase activity of normal and atherosclerotic rabbit aorta., *Biochim. Biophys. Acta*, 116: 169, 1966.

DAYTON, S. Turnover of cholesterol in the artery walls of normal chickens., *Circulat. Res.*, 7:468, 1959.

DELBART, C., SOULA, G., LESIEUR, D. et al. Low-density lipoprotein for delivery of na acrylophenone antineoplastic molecule into malignant cells., *Cancer Res*, 52: 3629 - 3635, 1992.

DESRUMAUX, C.M., MAK, P.A., BOISVERT, W.A., MASSON, D., STUPACK, D., JAUHIAINEN, M., EHNHOLM, C., CURTISS, L.K. Phospholipid Transfer Protein (PLTP) is present in human atherosclerotic lesions and is expressed by macrophages and foam cells., *J Lipid Res*, 44: 8: 1453 – 1461, 2003.

DONG, J.F., WHITELOCK, J., BERNARDO, A., BALL, C., CRUZ, M.A. Variations among normal individuals in the cleavage of endothelial-derived ultra-large von Willebrand factor under flow., *J Thromb Haemost*, 2: 8 :1460 - 1466, 2004.

FIELDING, C.J. Reverse cholesterol transport., *Curr Opin Lipidol*, 2: 376 – 378, 1991.

FOGELMAN, A.M., BERLINER, J.A., VAN LENTEN, B.J., NAVAB, M., TERRITO, M. Lipoprotein receptors and endothelial cells., *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 14: 206 – 209, 1988.

FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues., *J Biol Chem*, 226: 497-509, 1957.

FRANCESCHINI, G., MADERNA, P., SIRTORI, C.R. Reverse Cholesterol Transport: physiology and pharmacology., *Atherosclerosis*, 88: 99 – 107, 1991.

FREDENRICH, A., BAYER, P. Reverse cholesterol transport, high density lipoproteins and HDL cholesterol: recent data., *Diabetes Metab*, 29: 201 - 205 2003.

FRIEDWALD, W. T., LEVY, R. I., FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of the preparative ultracentrifuge., *Clin Chem*, 18: 499-502, 1972.

FOURNIER, N., PAUL, J-L., ATGER, V., COGNY, A., SONI, T., LLERA-MOYA, M., ROTHBLAT, G., MOATTI, N. HDL phospholipid content and composition as a major factor determining cholesterol efflux capacity from Fu5AH cells to human serum., *Artrioscler Thromb Vasc Biol*, 17: 2685 – 2691, 1997.

FRY, D.L. Mathematical models of arterial transmural transport. *Am J Physiol*, 248: H240 – H263, 1985.

FRY, D.L., HERDERICK, E.E., JOHNSON, D.K. Local intimal-medial uptakes of ¹²⁵I-albumin, ¹²⁵I-LDL, and parenteral Evans blue Dye protein complex along the aortas of normocholesterolemic minipigs as predictors of subsequent hypercholesterolemic atherogenesis., *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 13: 1193 – 1204, 1993.

GIERENS, H., NAUCK, M., ROTH, M., SCHINKER, R., SCHURMANN, C., SCHARNAGL, H., NEUHAUS, G., WIELAND, H., MARZ, W. Interleukin-6 stimulates LDL receptor gene expression via activation of sterol-responsive and Sp1 binding elements., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20 :7 :1777 - 83, 2000.

GINSBURG, G.S.; SMALL, D.M.; ATKINSON, D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low-density lipoprotein., *J Biol Chem*, 257: 8216-8227, 1982.

GLOMSET, J.A. The plasma lecithin: cholesterol acyltransferase reaction., *J Lipid Res*, 9:155-67, 1968.

GINSBURG, G. S., SMALL, D. M., ATKINSON, D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low-density lipoprotein., *J Biol Chem*, 257: 8216 - 8227, 1982.

GOLDSTEIN, J.L., DANA, S.E., FAUST, S.E., DEAUDET, A.L., BROWN, M.S. Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesterol ester storage disease. *J Biol Chem*, 250 : 8487 – 8495, 1975.

GRAZIANI, S. Uso de uma Microemulsão Lipídica como Veículo de Quimioterápicos no Tratamento do Câncer de Mama Metastático. São Paulo, 1999. 85p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

HAGERMAN, J.S., GOULD, R.G. The in vitro interchange of cholesterol between plasma and red-cells., *Proc Soc Exp Biol Med.*, 78: 329, 1951.

HO, Y. K., SMITH, R. G., BROWN, M. S., GOLDSTEIN, J. L. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells., *Blood*, 52: 1099-1114, 1978.

HUUSKONEN, J., OLKKONEN, V.M., JAUHAINEN, M., EHNHOLM, C. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism., *Atherosclerosis*, 155: 269 – 281, 2001.

IKEDA, U., OGUCHI, A., OKADA, K., ISHIKAWA, S., SAITO, T., IKEDA, M., KANO, S., TAKAHASHI, M., SHIOMI, M., SHIMADA, K. Involvement of LDL Receptor in Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells., *Atherosclerosis*, 110: 87 – 94, 1994.

KASER, S., SANDHOFER, A., HÖ LZL, B., GANDER, R. C., EBENBICHLER, F., PAULWEBER, B., PATSCH, J. R. Phospholipid and cholesteryl ester transfer are increased in lipoprotein lipase deficiency., *Journal of Internal Medicine*, 253: 208 – 216, 2003.

KOPPAKA, V. Structural studies of discoidal lipoprotein A-I., *Cell Mol Life Sci*, 58: 885 – 893, 2001.

KRUTH, H.S. Subendothelial accumulation of unesterified cholesterol: an early event in the atherosclerotic lesion development., *Atherosclerosis*, 57: 337 – 341, 1985.

KWONG, M., WASAN, K.M. Cholesteryl ester transfer protein facilitates the movement of water-insoluble drugs between lipoproteins: a novel biological function for a well-characterized lipid transfer protein., *Biochemical Pharmacology*, 64: 1669 – 1675, 2002.

LA VILLE, A., TURNER, P.R., PITTILO, R.M., MARTINI, S., MARENAH, C.B., ROWLES, P.M., MORRIS, G., THOMSON, G.A., WOOLF, N., LEWIS, B. Hereditary hyperlipidemia in the rabbit due to overproduction of lipoproteins: I. biochemical studies., *Arteriosclerosis*, 7: 105 – 112, 1987.

LESTAVEL-DELATTRE, S., MARTIN-NIZARD, F., CLAVEY, V., TESTARD, P., FAVRE, G., DOUALIN, G., HOUSSAINI, H.S., BARD, J.M., DURIEZ, P., MARANHÃO, R. C., CESAR, T. B., PEDROSO-MARIANI, S. R., HIRATA, M. H., MESQUITA, C. H. Metabolic behavior in rats of a non-protein microemulsion resembling low density lipoprotein., *Lipids*, 28: 691 - 696, 1993.

LIN, S.J., JAN, K.M., WEINBAUM, S., CHIEN, S. Transendothelial transport of low density lipoprotein in association with cell mitosis in rat aorta., *Artherosclerosis*, 9: 230 – 236, 1989.

LLERA-MOYA, M., ATGER, V., PAUL, J.L., FOURNIER, N., MOATTI, N., GIRAL, P., FRIDAY, K.E., ROTHBLAT, G. A cell culture system for screening human

serum for ability to promote cellular cholesterol efflux: relations between serum components and efflux, esterification, and transfer., *Arterioscler Thromb*, 14: 1056-1065, 1994.

LUND-KATZ, S., LIU, L., THUAHNAI, S.T., PHILLIPS, M.C. High density lipoprotein structure., *Front Biosci*, 8: 1044 – 1054, 2003.

MALESYS, J.J.E., SILVA, E.L. Métodos Laboratoriais para o Estudo de Lípidos. Versão Revisada. Laboratório de Metabolismo de Lípidos - InCor - HC.FMUSP. 150p. São Paulo, 1995.

MARANHÃO, R. C., TERCYAK, A. M., REDGRAVE, T. G. Effects of cholesterol content on the metabolism of protein free emulsion models of lipoproteins., *Biochim Biophys Acta*, 875: 247-255, 1986.

MARANHÃO, R.C., GARICOCHEA, B., SILVA, E.L., DORLHIAC-LLACER, P., CADENA, S.M.S., COELHO, I.J.C., MENEGHETTI, J.C., PILEGGI, F.J.C., CHAMONE, A.F. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia., *Cancer Res*, 54: 4660 - 4666, 1994.

MATTHEWS, C.M.E. The theory of tracer experiments with labelled plasma proteins., *Phys Med Biol*, 2: 36 - 42, 1957.

MESQUITA, C.H. Análise compartimental auxiliar. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), [Publicações IPEN]; 1994.

MILLER, K. W., SMALL, D. M. Surface to core and interparticle equilibrium distribution of triglyceride-rich lipoprotein lipids., J Biol Chem, 258: 13772-13784, 1983a.

MILLER, K. W., SMALL, D. M. Triolein-cholesteryl oleate-cholesterol-lecithin emulsions, structural models of triglyceride-rich lipoproteins., Biochemistry, 22: 443-451, 1983b.

NEREM, R.M., LEVEQUE, M.J., CORNHILL, J.F. Vascular endothelial morphology as an indicator of the pattern of blood flow. ASME J Biomech Eng, 103: 172 – 176, 1981.

NEWMAN, H.A.I., McCANDLESS, E.L., ZILVERSMIT, D.B. The synthesis of C14-lipids in rabbit atheromatous lesions., J Biol Chem, 236: 1264, 1961.

NICOLL, A., DUFFIELD, R., LEWIS, B. Flux of plasma lipoproteins into human arterial intima: comparison between grossly normal and atheromatous intima. Atherosclerosis, 39: 229 – 242, 1981.

NIEHAUS, C.E., NICOLL, A., WOOTTON, R., WILLIAMS, B., LEWIS, J., COLTART, D.J., LEWIS, B. Influence of lipid concentrations and age on transfer of plasma lipoprotein into human arterial intima., Lancet, 469, 1977.

NIELSEN, L.B., NORDESTGAARD, B.G., STENDER, S., KJELDSEN, K. Aortic permeability to LDL as a predictor of aortic cholesterol accumulation in cholesterol-fed rabbits., Arteriosclerosis and Thrombosis, 12: 1402 – 1409, 1992.

NIEVELSTEIN, P.F.E.M., FOGELMAN, A.M., MOTTINO, G., FRANK, J.S. Lipid accumulation in rabbit aortic intima 2 hours after bolus infusion of low density lipoprotein: a deep-etch and immunolocalization study of ultrarapidly frozen tissue., *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 11: 1795 – 1805, 1991.

NORDESTGAARD, B.G., HJELMS, E., STENDER, S., KJELDSEN, K. Different efflux pathways for high and low density lipoproteins from porcine aortic intima., *Arteriosclerosis*, 10: 477 – 485, 1990.

NORDESTGAARD, B.G., LEWIS, B. Intermediate density lipoprotein levels are strong predictors of the extent of aortic atherosclerosis in St. Thomas's Hospital rabbit strain., *Atherosclerosis*, 87: 39 – 46, 1991.

ORAM, J.F. ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking., *Curr Opin Lipidol*, 13: 373 – 381, 2002.

ORAM, J.F., YOKOYAMA, S. Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids., *J Lipid Res*, 37: 2473 – 2491, 1996.

PATELKSKI, J., BOWYER, D.E., HOWARD, A.N., GRESHAM, G.A. Changes in phospholipase A, and cholesterol esterase activity in the aorta in experimental atherosclerosis in the rabbit and rat., *J Atheroscler Res*, 8: 221, 1968.

PENN, M.S., KOELLE, M.R., SCHWARTZ, S.M., CHISOLM, G.M. Visualization and quantification of transmural concentration profiles of macromolecules across the arterial wall., *Circ Res*, 67: 11 – 20, 1990.

PENTCHEV, P.G., COMLY, M.E., KRUTH, H.S., TOKORO, T., BUTLER, J.D., SOKOL, J., et al., Group C Niemann-Pick disease: faulty regulation of low-density lipoprotein uptake and cholesterol storage in cultured fibroblasts., *FASEB J*, 1: 40 – 54, 1987.

PRUCKLER J.M, LAWLEY T.J, ADES, E.W. Use of a human microvascular endothelial cell line as a model system to evaluate cholesterol uptake., *Pathobiology*, 61: 5-6 : 283 –287, 1993.

RADER, D.J. High-density lipoproteins and atherosclerosis., *Am J Cardiol*, 17: 62 – 70, 2002.

RAINWATER, D.L., MOORE, P.H., SHELLDY, W.R., DYER, T.D., SLIFER, S.H. Characterization of a composite gradient gel for the electrophoretic separation of lipoproteins., *J Lipid Res*, 38: 1261 –1266, 1997.

RAINWATER, D.L. Electrophoretic separation of LDL and HDL subclasses., *Methods Mol Biol*, 110: 137 – 151, 1998.

RIGOTTI, A., TRIGATTI, B., BABITT, J., PENMAN, M., XU, S., KRIEGER, M. Scavenger receptor BI-a cell surface receptor for high-density lipoprotein., *Curr Opin Lipidol*, 8: 181 – 181, 1997.

ROLAND, I. Metabolismo de emulsões semelhantes a fase lipídica da LDL em indivíduos normais e hiperlipidêmicos. São Paulo, 1992, 120p. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

ROTHBLAT, G.H., DE LA LLERA-MOYA, M., FAVARI, E., YANCEY, P.G., KELLNER-WEIBEL, G. Cellular cholesterol flux studies: methodological considerations., *Atherosclerosis*, 162: 1-8, 2002.

ROTHBLAT, G.H., DE LA LLERA-MOYA, M., ATGER, V., KELLNER-WEIBEL, G., WILLIAMS, D.L., PHILIPS, M.C. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights., *J Lipid Res*, 40: 781 – 96, 1999.

SANTOS, R.D., HUEB, W., OLIVEIRA, A.A., RAMIRES, J.A., MARANHÃO, R.C. Plasma kinetics of a cholesterol-rich emulsion in subjects with or without coronary artery disease., *J Lipid Res*, 44:3: 464 – 469, 2003.

SANTOS, R.D., CHACRA, A.P., MORIKAWA, M.A. *et al.* Familial hypercholesterolemia patients present defects in the removal from plasma of both free and esterified forms of cholesterol that are improved by Simvastatin: study with artificial emulsions., In: Congress of The European Society of Cardiology, 2004, Munich. *The European Heart Journal* suppl, 27.01, 2004.

SCHWENKE, D.C., CAREW, T.E. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits: I. focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions., *Arteriosclerosis*, 9: 895 – 907, 1989.

SCHWENKE, D.C., CAREW, T.E. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits: II. Selective retention of LDL vs. Selective increase in LDL permeability in susceptible sites of arteries., *Arteriosclerosis*, 9: 908 – 918, 1989.

SCOTT, P.J., HURLEY, P.J. The distribution of serum albumin and low-density lipoprotein in tissues and the arterial wall., *Atherosclerosis*, 11: 77, 1970.

SEDDON, A.M., WOOLF, N., LA VILLE, A., PITTILO, R.M., ROWLES, P.M., TURNER, P.R., LEWIS, B. Hereditary hyperlipidemia in the rabbit due to overproduction of lipoproteins: II. Preliminary report of arterial pathology., *Arteriosclerosis*, 7: 113 – 124, 1987.

SEGREST, J.P., LI, L., ANANTHARAMAIAH, G.M., HARVEY, S.C., LIADAKI, K.N., ZANNIS, V. Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein., *Curr Opin Lipidol*, 11: 105 – 115, 2000.

SIEDEL, J., SCHULUMBERGER, H., KLOSE, S., ZIEGENHORN, J., WAHLFELD, A. W. Improved reagent for the enzymatic determination of serum cholesterol., *J Clin Chem*, 19: 838 - 839, 1981.

SIMIONESCU, N., VASILE, E., LUPU, F., POPESCU, G., SIMIONESCU, M. Prelesional events in atherogenesis: accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the arterial intima and cardiac valves of hyperlipidemic rabbit., *Am J Pathol*, 123: 1109 – 1125, 1986.

SIPERSTEIN, M.D., CHAIKOFF, I.L., CHERNICK, S.S. Significance of endogenous cholesterol in arteriosclerosis. Synthesis in arterial tissue., *Science*, 113: 747, 1951.

SMITH, E.B., SLATER, P.B. Lipids and low density lipoproteins in intima in relation to its morphological characteristics. *Ciba Found Symp*, 12: 39-53, 1973.

SMITH, E.B., STAPLES, E.M. Distribution of plasma proteins across the human aortic wall. *Atherosclerosis*, 37: 579 – 590, 1980.

STENDER, S., CHRISTENSEN, S., NYVAD, O. Uptake of labelled free and esterified cholesterol from plasma by the aortic intima – media tissue measured in vivo in three animal species., *Atherosclerosis*, 31: 279 – 293, 1978.

STENDER, S., HJEIMS, E. In vivo transfer of cholesteryl ester from high and low density plasma lipoproteins into human aortic tissue., *arteriosclerosis*, 8: 252 – 262, 1988.

STOKKE, K.T., NORURN, K.R. Determination of lecithin: cholesterol acytransfer in human blood plasma., *Scand J Clin Lab Invest*, 27: 1: 21 – 27, 1971.

TAN, K.C.B., SHIU, S.W.M., CHU, B.Y.M. Roles of hepatic lipase and cholesteryl ester transfer protein in determining low density lipoprotein subfraction distribution in Chinese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus., *Atherosclerosis* 145: 273 – 278, 1999.

THUBRIKAR, M.J., KELLER, A.C., HOLLOWAY, P.W., NOLAN, S.P. Distribution of low density lipoprotein in the branch and non-branch regions of the aorta., *Atherosclerosis*, 97: 1-9, 1992.

TRUSKEY, G.A., ROBERTS, W.L., HERRMANN, R.A., MALINAUSKAS, R.A. Measurement of endothelial permeability to ¹²⁵I-low density lipoproteins in rabbit arteries by use of en face preparations., *Circulation Research*, 71: 883 – 897, 1992.

WALTON, K.W., MORRIS, C.J. Studies on the passage of plasma proteins across arterial endothelium in relation to atherogenesis., *Progr Biochem Pharmacol*, 13: 138 – 152, 1977.

WANG, M., BRIGGS, M.R. HDL: the metabolism, function, and therapeutic importance., *Chem Rev*, 104: 119 – 137, 2004.

WARNICK, G.R., NAUCK, M., RIFAI, N. Evolution of Methods for Measurement of HDL-Cholesterol: From Ultracentrifugation to Homogeneous Assays., *Clin Chem*, 47: 1579 – 1596, 2001.

WASANO, K., YAMAMOTO, T. Tridimensional architecture of elastic tissue in the rat aorta and femoral artery: a scanning electron microscope study. *J Electron Microsc*, 32: 22 – 44, 1983.

WATTENBERG, B.W., SILBERT, D.F. Sterol partitioning among intracellular membranes., *J Biol Chem*, 258: 2284 – 2289, 1983.

VIRAG, S., DÉNES, R., POZSONYI, T. Uptake of [¹²⁵I]- β -lipoprotein by aortas and veins of normal and cholesterol-fed rabbits., *Atherosclerosis*, 11: 361 – 363, 1970.

VITOLS, S. Uptake of low-density lipoprotein by malignant cells-possible therapeutic applications., *Cancer Cells*, 3:12: 488 - 494, 1991.

VON ECKARDSTEIN, A., NOFER, J-R., ASSMANN, G. High-density lipoproteins and arteriosclerosis: role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21: 13 – 27, 2001.

YOKOYAMA, S. Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body., *Bichimica at Biophysica Acta*, 1529: 231 – 244, 2000.

YOUNG, C.E., KARAS, R.H., KUVIN, J.T. High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease., *Cardiol Rev*, 12: 107 – 119, 2004.

ZHANG, Z., YAMASHITA, S., HIRANO, K-I., NAKAGAWA-TOYAMA, Y., MATSUYAMA, A., NISHIDA, M., NAOHIKO, S., FUKASAWA, M., ARAI, H., MIYAGAWA, J-I., MATSUZAWA, Y. Expression of cholesteryl ester transfer protein in human atherosclerotic lesions and its implication in reverse cholesterol transport., *Atherosclerosis*, 159: 67 – 75, 2001.