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

Capacidade da Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) de receber lipídeos em diferentes faixas etárias: um estudo *in vitro* utilizando uma lipoproteína artificial

Carolina Heitmann Mares Azevedo

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Tit. Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo
2007

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

Azevedo, Carolina Heitmann Mares
A994c Capacidade da lipoproteína de alta densidade (HDL) de
receber lipídeos em diferentes faixas etárias: um estudo *in vitro*
utilizando uma lipoproteína artificial / Carolina Heitmann
Mares Azevedo . -- São Paulo, 2007.
94p.

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

Orientador: Maranhão, Raul Cavalcante

I. Metabolismo lipídico I. T. II. Maranhão, Raul
Cavalcante, orientador.

612.397 CDD

Carolina Heitmann Mares Azevedo

Capacidade da Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) de receber lipídeos em diferentes faixas etárias: um estudo *in vitro* utilizando uma lipoproteína artificial

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
orientador/presidente

Prof.^a Dr.^a Adelaide José Vaz
1º. examinador

Prof.^a Dr.^a Carmen Guilherme Christone de Moraes
2º. examinador *Vingue*

Prof.^a Dr.^a Ana Paula Monte Chacra
3º. examinador

Prof.^a Dr.^a Janis Leme da Rocha Martinez
4º. examinador

São Paulo, 26 de 09 de 2007.

*Aos meus amados pais, **Celestino** e **Elza**, pelo amor e cumplicidade passados ao longo desses anos que me fizeram atingir o final desse Doutorado com consciência crítica e desejo de conhecimento. O meu obrigada por tudo que me transmitiram e por todos os valores que só se adquirem com uma boa educação.*

*A minha irmã **Kika**, por todos esses anos de companhia, de força e de diálogo. Por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida.*

Ao **Flávio**, por todo carinho, apoio
e compreensão durante minha ausência
necessária para realização deste
trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Meu orientador, Prof. Tit. Raul Cavalcante Maranhão, pelas várias oportunidades e apoio na minha formação científica com seu exemplo profissional. Meus sinceros e eternos agradecimentos.

A sua disponibilidade irrestrita, sua forma exigente, crítica e criativa de argüir as idéias apresentadas, creio que deram norte a este trabalho, facilitando o alcance de seus objetivos. Ao Dr. Jaime Diamant, meus irrestritos agradecimentos.

Ao Dr. Maurício Wajngaten, meu agradecimento pela oportunidade de colaboração, além de se mostrar sempre solícito no decorrer de minhas necessidades.

À Dra. Claudete Valduga, pela importante participação na minha formação profissional e pessoal com seus ensinamentos, pela seriedade com que conduz sua atividade científica, pela maravilhosa amizade e por todos esses anos de convívio no trabalho.

Em especial à Ana Cristina Lo Prete, pela inestimável amizade e grandiosa ajuda científica no decorrer deste trabalho e pelo apoio constante. Meu eterno agradecimento.

À Dra Carmen Vinagre, pelo auxílio e disposição em ajudar-me na realização desta Tese.

As amigas Iara Kretzer e Débora Deus, meu agradecimento especial por todos os momentos terapêuticos concedidos durante esses anos e pela valiosa amizade.

Aos amigos do laboratório de Metabolismo de Lípidos, Adriana Bulgarelli, Amanda Padoveze, Ana Carolina Gagliardi, Camila Puk, Cristina Almeida, Fabiola Filippin, Fernanda Maniero, Juliana Ayello, Talita Seydell, Tatiane Vanessa Oliveira, Renato Barbosa, Sheila Vasconcelos, meus eternos agradecimentos pela amizade e pelo apoio constante.

À toda equipe do Laboratório de Metabolismo de Lípidos.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq – pelo apoio financeiro permitindo a realização deste trabalho.

Enfim, com respeito e admiração, meu agradecimento a todos os pacientes que aceitaram participar deste estudo, em particular pelo sacrifício pessoal.

Minha profunda Gratidão

“ É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias mesmo expondo-se a derrotas, que formar fila com os pobres de espírito, que nem gozam muito, nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta, que não conhecem vitórias, nem derrotas”

Rui Barbosa

RESUMO

Azevedo, C.H.M. **Capacidade da Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) de receber lipídeos em diferentes faixas etárias: um estudo *in vitro* utilizando uma lipoproteína artificial.** 2007. 94p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

A relação entre transferência de lipídeos, idade e aterogênese são complexas e ainda não estão claras. É possível que a troca de lipídeos esteja alterada com a avançar da idade e relacionada com a Doença Arterial Coronariana (DAC). O objetivo deste trabalho foi verificar a hipótese se em indivíduos mais jovens a habilidade da HDL de receber lipídeos é diferente de indivíduos mais velhos com e sem a evidência clínica da DAC. Dentro desses aspectos, foram determinados o diâmetro da partícula desta lipoproteína, a atividade da Paraoxonase (PON1) e sua capacidade de receber lipídeos. Para tanto, foram estudados 86 indivíduos divididos em quatro grupos: adulto jovem (25 ± 4), meia-idade (42 ± 8), idosos sem evidência clínica de DAC (75 ± 6) e idosos com DAC (74 ± 5). Uma nanoemulsão artificial rica em colesterol (LDE) marcada com ^3H -TG e ^{14}C -CL ou ^3H -CE e ^{14}C -FL foi incubada com plasma. Após a precipitação de outras lipoproteínas, o sobrenadante contendo HDL foi separado e em seguida, medida a radioatividade. O diâmetro da HDL foi medido por laser scattering (nm).

Foram constatadas diferenças significativas entre as taxas de transferência de ^3H -éster de colesterol (CE) entre os grupos: adulto jovem ($3.7 \pm 1.0\%$); meia idade ($4.1 \pm 0.7\%$) e idosos ($5.3 \pm 1.8\%$); $p = 0.024$. Também ocorreu diferença entre as taxas de transferência do ^{14}C -fosfolipídeo (FL): adulto jovem ($18.7 \pm 4.6\%$), meia idade ($18.3 \pm 4.0\%$) e idosos (20.6 ± 5.3); $p = 0.0368$. Com relação ao tamanho das partículas de HDL, foi encontrada diferença entre os grupos: os grupos adulto jovem ($8.9 \pm 0.3\text{nm}$) e meia idade ($8.9 \pm 0.3\text{nm}$) apresentaram menores diâmetros de HDL quando comparados ao do grupo de idosos sem evidência clínica da DAC (9.7 ± 1.6); $p = 0,0444$.

As transferências de lipídeos foram expressas em % de radioatividade. A idade correlacionou-se positivamente com a taxa de transferência do ^3H -éster de colesterol ($r = 0.3365$; $p = 0.0036$), com a concentração de colesterol total ($r = 0.4965$; $p = 0.0001$) e com a concentração de HDL colesterol ($r = 0.3559$; $p = 0.0023$). Também houve correlação positiva com o tamanho de HDL ($r = 0.3695$; $p = 0.0013$). Em princípio, os indivíduos idosos sem evidência clínica da DAC, aparentemente têm alguma proteção contra a mesma. Desse modo, com o intuito de saber se os resultados encontrados no presente trabalho sustentam a afirmação acima, foi realizada a comparação desse grupo com um grupo de idosos que apresentavam a DAC. O grupo com DAC apresentou menor tamanho de partícula de HDL ($8,7 \pm 0,7$). As taxas de transferência de ^3H -CE e de ^{14}C -FL também foram menores neste grupo (^3H -CE = $3,1 \pm 2,3$ e ^3H -TG = $5,1 \pm 1,6$). Devido ao importante papel antiaterogênico da HDL, esses resultados podem ser relevantes para estabelecer novos mecanismos existentes entre os aspectos qualitativos dessa lipoproteína, o avanço da idade e a presença da DAC.

Palavras-chave: Lipídeos, HDL, LDE, DAC e envelhecimento.

ABSTRACT

Azevedo, C.H.M. **Capacity of the High Density Lipoprotein (HDL) to receive lipids in different age: a study *in vitro* using an artificial nanoemulsion.** 2007. 94p. Thesis (Doctoral) - Faculty of Pharmaceutical Sciences of University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2007.

The relationship between transfer of lipids, age and atherogenesis are complex and yet unclear and is possible that the shift of lipids to HDL may be altered by the aging process and related with coronary artery disease (CAD). We tested the hypothesis whether in younger patients the ability of HDL to receive lipids is different from that of elderly patients with or without CAD. Inside of these aspects, the HDL size, the activity of Paraoxonase (PON1) and its capacity to receive lipids was determined. It was studied, 25 younger, 25 middle age, 36 elderly patients with a coronariography and/or a perfusion scintilography on the last 6 months (11 with CAD, 74 ± 5 yo; and 25 patients without proved CAD, 75 ± 6 yo). An artificial cholesterol-rich nanoemulsion labeled with ^3H -TG and ^{14}C -FC or ^3H -CE and ^{14}C -PL was incubated, per 1 hour, with plasma. After chemical precipitation of apoB-containing lipoproteins and the nanoemulsion, the supernatant containing HDL was counted for radioactivity. The HDL diameter was measured by laser-light-scattering. Transfer of CE and PL to HDL was smaller in young patients than in the elderly patients without CAD, but the transfer of the other lipids are equal (CE: young= $3.7 \pm 1.0\%$; middle age= $4.1 \pm 0.7\%$; elderly without CAD= $5.3 \pm 1.8\%$; $p=0.024$ and PL: young= $18.7 \pm 4.6\%$; middle age= $18.3 \pm 4.0\%$; elderly without CAD= 20.6 ± 5.3 ; $p=0.0368$). The HDL size was greater in elderly group without CAD ($9.7 \pm 1.6\text{nm}$) than in younger ($8.9 \pm 0.3\text{nm}$) and middle age patients ($8.9 \pm 0.3\text{nm}$); $p=0.0444$. Transfer of lipids to HDL was expressed as % of total incubated radioactivity. The age positively correlated with the transfer of CE ($r=0.3365$; $p=0.0036$), with the total cholesterol concentration ($r=0.4965$; $p=0.0001$) and with the HDL concentration cholesterol ($r=0.3559$; $p=0.0023$). Also had positive correlation with the size of HDL (; $p=0.0013$). In principle, the aged patients without CAD, have some protection against the same one. In this aspect, with intention to know if the results found in the present work support the affirmation above, was compared this group with a group of aged that presented the CAD. Comparing elderly patients without CAD with elderly patients with CAD, the transfer of CE and FL as well as HDL size was smaller in the CAD group (CE= 3.1 ± 2.3 and TG= 5.1 ± 1.6 ; $8.7 \pm 0.7\text{nm}$). Due to HDL important antiatherogenic roles, this result can be relevant to establish new mechanisms and risk factors in aging and in CAD.

Key-words: Lipids, HDL, LDE, CAD and aging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da Lipoproteína de Alta Densidade.....	19
Figura 2: Metabolismo da Lipoproteína de Alta Densidade.....	24
Figura 3: Correlações entre idade e HDL-C, Colesterol Total, Tamanho de HDL e taxa de transferência de éster de colesterol ($^3\text{H-CE}$).....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações plasmáticas dos lipídeos, apolipoproteínas e glicose dos grupos estudados.....57

Tabela 2: Tamanho das partículas de HDL e a medida da atividade da PON1 nos grupos estudados.....59

Tabela 3: Taxa de transferência (%) do colesterol livre, éster de colesterol, triglicerídeo e fosfolípídeo da LDE para a HDL nos grupos estudados.....62

Tabela 4: Correlação entre a idade e taxa de transferência do colesterol livre (^{14}C -CL), éster de colesterol (^3H -CE), triglicerídeo (^3H -TG) e fosfolípídeo (^{14}C -PL) radioativos, tamanho da HDL, a atividade da PON1, o perfil lipídico, concentração das apolipoproteínas.....64

Tabela 5: Correlação entre a taxa de transferência do colesterol livre (^{14}C -CL) e do éster de colesterol (^3H -CE) radioativos e o tamanho da HDL, a atividade da PON1, o perfil lipídico, concentração das apolipoproteínas e idade.....69

Tabela 6: Correlação entre a taxa de transferência do triglicerídeos (^3H -TG) e do fosfolípídeo (^{14}C -PL) radioativos e o tamanho da HDL, a atividade da PON1, o perfil lipídico, concentração das apolipoproteínas e idade.....70

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA1	“ATP-binding cassette transporter A1”
ACAT	Acetil Coenzima A: Colesterol Acil Transferase
APO	Apolipoproteína
CETP	Proteína de transferência de éster de colesterol
DAC	Doença Arterial Coronariana
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
LCAT	Lecitina Colesterol Acil Transferase
LDE	Emulsão rica em colesterol
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LE	Lipase endotelial
LH	Lipase hepática
LLP	Lipase Lipoprotéica
NO	Óxido Nítrico
PLTP	Proteína de transferência de fosfolípídeo
PON1	Paraoxonase
SR-B1	Receptor <i>scavenger</i> classe B tipo I
TRC	Transporte Reverso de Colesterol
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
	Metabolismo Lipídico	16
	Lipoproteína de Alta Densidade – HDL.....	19
	<i>Transporte Reverso do Colesterol</i>	21
	<i>HDL e Aterogênese</i>	26
	<i>Estabilidade do colesterol na HDL</i>	30
	Dislipidemias, Idade e DAC.....	32
	Nanoemulsão Lipídica Artificial (LDE).....	36
1.2	JUSTIFICATIVA.....	40
1.3	OBJETIVOS.....	43
2.	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1	Casuística.....	46
2.2	Determinações Bioquímicas séricas.....	47
2.3	Determinação da atividade da Paraoxonase.....	48
2.4	Determinação do Tamanho de Partícula da HDL.....	50
2.5	Preparo da Nanoemulsão rica em colesterol-LDE.....	50
2.6	Transferência de éster de colesterol (CE), fosfolipídeos (PL), colesterol livre (CL) e triglicerídeos da LDE para a HDL.....	52
2.7	Análise estatística.....	53
3.0	RESULTADOS.....	54
3.1	Determinações Bioquímicas.....	55
3.2	Determinação do diâmetro da Partícula da HDL e da atividade da PON1.....	58
3.3	Taxas de transferência de éster de colesterol, fosfolipídeos, colesterol livre e triglicerídeos da LDE para HDL.....	60
4.0	DISCUSSÃO.....	71
5.0	CONCLUSÕES.....	80
	REFERÊNCIAS.....	82

De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NBR 14724: normas para apresentação de trabalhos científicos, teses, dissertações e monografias, Rio de Janeiro, 2006.

1. INTRODUÇÃO

Metabolismo Lipídico

As lipoproteínas são macromoléculas constituídas de uma fração lipídica (triglicerídeos, fosfolipídeos, colesterol livre e esterificado) e outra protéica (apolipoproteína). Como os lipídeos são insolúveis em água e o plasma, meio onde se encontram é aquoso, organizam-se naturalmente na forma de partículas, na qual os hidrofóbicos ficam no centro e os hidrofílicos, na parte externa da partícula. Com a finalidade primordial de tornarem-se solúveis na corrente circulatória, esses lipídeos são associados a apolipoproteínas, conferindo solubilidade ao macrocomplexo.

A diferença básica entre cada lipoproteína diz respeito à quantidade de lipídeos e proteínas da partícula, sendo mais densa quanto maior for a quantidade de proteínas presente em sua composição. Desta forma, serão formados quilomícrons, lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL) e alta densidade (HDL) (LEE; ALAUPOVIC, 1970; CHAPMAN et al., 1981).

Os quilomícrons são as primeiras lipoproteínas do metabolismo lipídico a serem formadas, sendo sintetizadas na mucosa intestinal, transportando os lipídeos oriundos da dieta, notadamente os triglicerídeos. Os quilomícrons chegam à circulação pelo duto linfático abdominal, sendo liberados ao nível da veia jugular (PATSCHE, 1998). São primeiramente apresentados ao tecido de armazenamento lipídico (adiposo), onde deixam grande quantidade de seu conteúdo de tri-acil-gliceróis, retornando como quilomícrons remanescentes. Em seguida, são absorvidos pelos hepatócitos para metabolização dos lipídeos que

restam em sua partícula, principalmente o colesterol, que é excretado como ácido biliar ou como colesterol livre na bile.

A apolipoproteína CII é responsável pela identificação dos quilomícrons pelos adipócitos, induzindo a ação da enzima lipase-lipoprotéica presente nessas células, favorecendo a captação dos ácidos graxos dos triglicerídeos (CHENG et al., 1981; VILARO et al., 1988). Esta apolipoproteína é adicionada à molécula de quilomícron pela lipoproteína HDL, durante o transporte plasmático. A apo B48, apolipoproteína integral dos quilomícrons, é responsável pela sua identificação e captação pelo hepatócito para o processo de degradação. A apoE também tem esta função e é adicionada a molécula dos quilomícrons pelo contato com a HDL, da mesma forma que a apoCII.

No fígado, há síntese constante de lipídeos endógenos, colesterol e triacilgliceróis, a partir do excesso de acetil-CoA produzida durante o metabolismo energético (BROWN; KOVANEN; GOLDSTEIN, 1981). Esses lipídeos são transportados pela lipoproteína VLDL que possui a apo-B100 como principal apoproteína. Após ser liberada para a corrente sanguínea, a HDL transfere apoCII e apoE para a molécula de VLDL, da mesma maneira como faz com os quilomícrons. Desta forma, a VLDL pode ser reconhecida pelos adipócitos e ter o seu conteúdo de triacilgliceróis retirado para o armazenamento no tecido adiposo.

Após a retirada dos triacilgliceróis, a VLDL torna-se bastante densa e de menor tamanho, sendo denominada VLDL remanescente (ou IDL). As apolipoproteínas CII e E são transferidas de volta para HDL, bem como moléculas

de triglicerídeos e de fosfolípidos restantes em sua composição. A HDL, por sua vez, transfere ésteres de colesterol para VLDL. Ao final desse processo de recombinação molecular entre as partículas de HDL e VLDL remanescentes, há a formação de uma nova lipoproteína, denominada de LDL.

A LDL possui em sua composição a apo-B100 e grande quantidade de colesterol, que será transferido as células do tecido periférico (BACHORIK; RIFKIND, 1999). Todas as células têm a capacidade de captar LDL, mas a captação ocorre, preferencialmente, nas células das gônadas, supra-renais e fígado (GOLDSTEIN; BROWN, 1985). Sua captação se dá pela presença do receptor celular para apo-B100, o qual promove a internalização do complexo receptor/lipoproteína. Isso possibilita o controle da entrada de LDL na célula, uma vez que todas estas células são capazes de sintetizar colesterol. Com a retirada do receptor celular de LDL, há um acúmulo fisiológico de LDL plasmática, induzindo fixação desta lipoproteína nas paredes dos vasos. Esta LDL se oxida e, ao atravessar o endotélio, é endocitada por macrófagos no processo denominado de *retirada do LDL varredura*. Esta endocitose, entretanto, ao contrário de constituir importante processo para retirada do colesterol plasmático, torna-se um desencadeador do enrijecimento do vaso sanguíneo. Após a endocitose da LDL, o macrófago se torna células grandes (células espumosas) que perdem sua função de fagocitose e se acumulam na parede dos vasos. Este processo leva à liberação de fatores que promovem a proliferação do músculo liso, lesão do vaso e calcificação do local. Em consequência, é criada a placa ateromatosa, a qual diminui a circulação sanguínea na área afetada, induzindo a necrose do tecido irrigado pelo músculo. A artéria coronária é o principal vaso atingido por esse

processo ateromatoso, originando a aterosclerose coronariana, uma das principais causas do enfarto do miocárdio.

Lipoproteína de Alta Densidade – HDL

Figura 1- Estrutura da Lipoproteína de Alta Densidade

Fonte: Laboratório Sabin de Análises Clínicas

CL- colesterol livre; FL- fosfolípidos; CE- éster de colesterol;
TG- triglicerídeos; apo- apolipoproteína

A HDL é um grupo de partículas heterogêneas, produzida pelo fígado e intestino, com densidade entre 1,063 e 1,21 g/mL, migração eletroforética alfa e composta por 45 a 55% de proteínas, 26 a 32% de fosfolípidos, 3 a 5% de colesterol, 15 a 20% de éster de colesterol e 2 a 7% de triglicerídeos (Figura 1). A meia-vida da HDL é de aproximadamente cinco dias, a

mais longa de todas as lipoproteínas (BACHORIK; RIFKIND; KWITEROVICH, 1999; KWITEROVICH Jr, 2000). Dependendo do seu conteúdo lipídico, da quantidade de proteínas e, conseqüentemente, do seu tamanho, a HDL pode ser dividida em quatro subclasses: HDL₁, HDL₂, HDL₃ e HDL₄, sendo que, as populações de HDL₂ e a HDL₃ estão presentes em maior concentração no plasma (EISENBERG, 1984). A apolipoproteína A-I (apo AI) está entre cerca de 60% do conteúdo protéico da HDL. Outras espécies de apolipoproteínas são encontradas nessa partícula incluindo, apo AII, apo AIV, apo CI, apo CIII e apo E (DUCHATEAU et al., 1997). As diferenças no tamanho da partícula da HDL são atribuídas principalmente pelo número de apoproteínas encontradas na sua superfície e pela quantidade de éster de colesterol presente no seu interior (BARTER, 2004). Além disso, essas evidências sugerem que a maioria das propriedades cardioprotetoras da HDL são associadas com a fração da HDL₂ (partículas maiores), mas do que a fração HDL₃ (partículas menores) em pacientes com Doença Arterial Coronariana (DAC), diabetes, em mulheres no período posmenopausa e em pacientes com hipercolesterolemia (WILSGAARD; ARNESEN, 2004).

O efeito anti-aterogênico da HDL se dá, sobretudo devido sua propriedade de transportar lipídeos, principalmente ésteres de colesterol, dos tecidos periféricos para o fígado, efeito conhecido como transporte reverso do colesterol (TRC). Nesse transporte reverso é envolvida uma variedade de tecidos e moléculas que impedem que o colesterol se acumule nas células. Sendo bastante complexo, esse transporte envolve, a nível celular, enzimas que hidrolisam a ligação éster do colesterol e o sistema ABCA1, que

possibilitam a captação do colesterol livre pela HDL (YANCEI et al, 2003). No compartimento plasmático, há o envolvimento das proteínas de transferência, a ação da Lecitina Colesterol Acil Transferase (LCAT) e finalmente, os receptores celulares de lipoproteínas no fígado.

Transporte Reverso de Colesterol

O transporte reverso de colesterol é a via pela qual o colesterol presente nos tecidos periféricos é transferido para o fígado e para os tecidos que produzem hormônios esteróides, onde o colesterol é utilizado para síntese de lipoproteínas, sais biliares, vitamina D e hormônios (ECKARDSTEIN; NOFER; ASSMANN, 2001). O transporte de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado é uma das importantes funções da HDL.

A HDL é uma lipoproteína que está em constante remodelamento no plasma. Apolipoproteínas na forma livre ou complexada com pequenas quantidades de lipídeos são os precursores da HDL. A apo A-I produzida pelo fígado e pelo intestino ou ainda, proveniente do catabolismo das lipoproteínas ricas em triglicerídeos, uma vez presente no plasma é lipídada. A lipidação ocorre pela remoção de fosfolipídeos e colesterol de tecidos hepáticos e extra-hepáticos, num processo facilitado pelo transportador de membrana “ATP-binding cassette transporter A1” (ABCA1) que tem como resultado a formação da HDL discóide (pré β -HDL), que consiste em apolipoproteína, fosfolipídeo e uma menor quantidade de colesterol na forma livre (BARTER et al., 2003;

WANG; BRIGGS, 2004). Outras apolipoproteínas, como a apo A-II, A-IV e apo E, quando presentes no plasma, também sofrem lipidação por serem capazes de causar efluxo celular de fosfolípidos e colesterol e podem dar origem a pré- β -HDL via proteínas transportadoras (ECKARDSTEIN; NOFER; ASSMANN, 2001; BARTER et al., 2003). Para que o efluxo celular de lipídeos ocorra é necessário que haja interação física entre a partícula aceptora e a membrana celular, onde o transportador ABCA1 tem um papel importante: o de modificar a distribuição lipídica da membrana celular e consequentemente, facilitar a interação entre a apolipoproteína, principalmente a apo A-I, e a superfície celular (WANG; BRIGGS, 2004). O transportador ABCA1 tem alta afinidade pela apo A-I e existem fortes indícios de que o efluxo celular de fosfolípidos preceda o efluxo de colesterol, pois o complexo apo A-I-fosfolípido é um melhorceptor de colesterol, quando comparado a apo A-I livre (WANG; BRIGGS, 2004). A HDL na forma discoidal também pode ser gerada a partir dos constituintes de superfície das lipoproteínas ricas em triglicerídeos que, ao sofrer ação da LLP, liberam vesículas contendo apolipoproteína e fosfolípidos acrescidos ou não de quantidades pequenas de colesterol livre (BARTER et al., 2003).

A pré- β -HDL continua a receber lipídeos via ABCA1, mas adquire também quantidades extras de colesterol livre de outras lipoproteínas que contêm apoB (VLDL, IDL e LDL) e de membranas celulares através de um processo de difusão passiva que parece não ser dependente do transportador ABCA1 (BARTER et al., 2003). A HDL na forma discoidal é um excelente substrato para a Lecitina Colesterol Acil Transferase, uma enzima sintetizada e secretada

principalmente pelo fígado, presente na circulação e que se liga a superfície das lipoproteínas, inclusive a da HDL, cuja função é converter colesterol e lecitinas (fosfatidilcolinas) em éster de colesterol (SCHAEFER et al., 1982; EISENBERG, 1984; WANG; BRIGGS, 2004). A esterificação do colesterol pela LCAT ocorre com a transferência de um ácido graxo da posição -2 da lecitina para o grupo hidroxila da molécula de colesterol (LEWIS; RADER; 2006). A LCAT é ativada pelas apolipoproteínas apo A-I, A-IV apo E, e apo C-I, e uma vez ativada, a LCAT esterifica o colesterol recebido pela pré- β -HDL (WANG; BRIGGS, 2004). O resultado da ação da LCAT é a formação de um núcleo hidrofóbico na pré- β -HDL, constituído de éster de colesterol, que transforma a HDL discóide em uma forma esférica, madura, a HDL₃ (WANG; BRIGGS, 2004).

A HDL₃ continua a receber colesterol e fosfolípidos de membranas celulares, mas agora num processo mediado pelo receptor scavenger classe B tipo I (SR-BI), presente principalmente na glândula adrenal, no fígado e nos monócitos, ou por difusão, ambos os processos distintos daquele mediado pelo ABCA1 (WANG; BRIGGS, 2004). Neste processo existe uma interação dos componentes lipídicos da HDL, principalmente fosfolípidos, com a superfície celular, favorecendo a difusão de colesterol através do receptor SR-BI, que facilita a transferência de colesterol livre da membrana plasmática para a partícula aceptora (SCARTEZINI et al., 2003). A HDL₃ também recebe colesterol livre e fosfolípidos provenientes da lipólise dos quilomícrons e da VLDL pela LLP, num processo facilitado pela proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP). Assim como ocorre com a pré- β -HDL, o colesterol recebido sofre ação da LCAT, é transformado em éster de colesterol e, devido a sua hidrofobicidade,

deixa a superfície da lipoproteína e passa a ocupar o núcleo, transformando a HDL₃ em uma partícula maior, a HDL₂ (ECKARDSTEIN; NOFER; ASSMANN, 2001) (Figura 2).

Figura 2- Metabolismo da Lipoproteína de Alta Densidade
Fonte: Arquivo Brasileiro de Cardiologia
LCAT-lecitina-colesterol-acil-transferase; LH-lipase hepática;
CE-éster de colesterol; TG-triglicerídeos; HDL-lipoproteína de alta densidade.

A HDL₂ realiza trocas de éster de colesterol e triglicerídeos, com as demais lipoproteínas (quilomícron, VLDL, IDL e LDL), num processo mediado pela proteína de transferência de éster de colesterol (CETP), uma glicoproteína hidrofóbica, produzida pelo fígado e que está presente no plasma em associação

com as lipoproteínas (LEWIS; RADER, 2006). O colesterol esterificado é transferido, por meio da CETP, da HDL₂ para as demais lipoproteínas ricas em triglicerídeos. As lipoproteínas ricas em triglicerídeos, por sua vez transferem triglicerídeos para a HDL₂. A extensão da transferência depende da concentração de cada componente lipídico na lipoproteína doadora (GLOMSET; NORUM; KING, 1970; MARCEL et al., 1980; EISEMBERG, 1984). O triglicerídeos recebido pela HDL₂ é o substrato para a enzima LH, presente nos hepatócitos e nas células endoteliais hepáticas. Diferentemente da LLP, responsável pela lipólise de triglicerídeos principalmente, a LH tem atividade semelhante de hidrólise tanto de triglicerídeos quanto de fosfolípidos. A LH é modulada pelas apolipoproteínas, sendo a apo E a ativadora desta enzima (WANG; BRIGGS, 2004). Uma outra enzima lipolítica, a lipase endotelial (LE), sintetizada pelo endotélio e presente na sua superfície também regula o remodelamento da HDL₂, mas com atividade de hidrólise principalmente de fosfolípidos (WANG; BRIGGS, 2004; LEWIS; RADER, 2006). A ação da LH resulta na conversão da HDL₂ em HDL₃, que retoma o ciclo de remoção tecidual do colesterol ou continua a sofrer degradação dos seus constituintes. A magnitude do efeito da lipase depende da composição da HDL (LEWIS; RADER, 2006). Após a lipólise da HDL₂ pelas LH e LE o colesterol dessa partícula é removido pelos receptores SR-BI, responsáveis pela captação seletiva do colesterol da HDL no fígado. A HDL₂ se liga ao SR-BI com alta afinidade, resultando na transferência seletiva do éster de colesterol do núcleo da HDL para compartimentos intracelulares, sem que ocorra a degradação das apolipoproteínas (WANG; BRIGGS, 2004). A ligação da HDL com o receptor SR-BI parece ser facilitada pela ação da LH (ECKARDSTEIN; NOFER; ASSMANN,

2001). Esse conjunto de ações das lipases e do receptor SR-BI resulta no remodelamento da HDL₂ que origina partículas menores, como a pré-β-HDL ou ainda a apo A-I na forma livre ou a apo A-I pobre em lipídeos, que servem como aceptores de lipídeos e novamente iniciam a formação de novas partículas de HDL. A apo A-I pode ainda ser filtrada pelos rins e removida do plasma e é recapturada nas células dos túbulos proximais, por meio de endocitose mediada pela cubilina, sugerida como o mediador da captação da apo A-I (EISENBERG, 1984; ECKARDSTEIN; NOFER; ASSMANN, 2001; LEWIS; RADER, 2006).

A depuração plasmática da HDL pode ocorrer por duas vias: por meio da captação seletiva do seu conteúdo lipídico, como exposto anteriormente ou via endocitose com a captação e subsequente degradação da partícula inteira. Neste caso o enriquecimento da HDL com éster de colesterol leva a formação de partículas maiores com alto conteúdo de colesterol e apo E, HDL₁, que podem ser captadas pelo fígado por meio de receptores celulares específicos que reconhecem a apoE (receptor B/E). Desta forma, direta ou indiretamente, o colesterol é retirado dos tecidos periféricos e levado para o fígado, onde pode ser reaproveitado, interagindo com outras vias metabólicas, pode ser utilizado para produção de sais biliares ou ainda ser excretado (SCARTEZINI et al., 2003).

HDL e Aterogênese

A doença arterial coronariana é um problema de crescente prevalência, principalmente nos grandes centros e nas populações de faixa etária

mais elevada, ocorrendo aumento de mortalidade em função da mesma. A doença aterosclerótica é considerada multifatorial e sua prevenção passa pela identificação do conjunto de fatores de risco. Estes fatores incluem a idade, o sexo, a história familiar positiva para DAC precoce assim como diabetes, hipertensão arterial, tabagismo e sedentarismo. A percepção entre relação de riscos à saúde e estresse também tem sido relatada (HESLOP et al., 2002).

Além desses fatores, a dislipidemia é outro fator de risco para doença aterosclerótica, em que sua extensão é diretamente proporcional aos níveis séricos de colesterol (STEINBERG; WITZTUM, 1990).

Dentre as anormalidades lipídicas clássicas, os níveis elevados de LDL-C, bem como os níveis reduzidos de HDL-C estão relacionados com importante aumento da incidência de doença cardiovascular aterosclerótica. Objetivando a diminuição desse risco, o principal foco da terapêutica hipolipemiante tem sido a redução dos níveis de LDL-C com o uso de estatinas. No entanto, apesar de grandes reduções de LDL-C com tratamento hipolipemiante intensivo, um número significativo de eventos ainda não pode ser evitado.

Desse modo, há um grande interesse em identificar terapias capazes de reduzir ainda mais o risco de eventos cardiovasculares. Um alvo terapêutico que tem despertado muito interesse é o aumento nos níveis de HDL-C, já que os níveis reduzidos desse colesterol constituem a anormalidade lipídica mais freqüentemente encontrada em pacientes com doença arterial coronariana estabelecida. Alguns estudos têm demonstrado que um aumento nos níveis séricos de HDL-C, da ordem de 1 mg/dl, produz redução de 2-3% na incidência

de DAC (BROWN et al., 2001, FRICK et al., 1997). Também foi demonstrado que níveis elevados de HDL-C podem impedir a progressão da placa aterosclerótica, promovendo sua regressão (JOHNSEN et al., 2005). Contudo, a HDL é a lipoproteína de maior importância na prevenção da aterosclerose. Além de ser a lipoproteína responsável pelo transporte de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, a HDL tem outras funções ateroprotetoras não relacionadas ao transporte de lipídeos. Essa lipoproteína, além de modular a função endotelial, desempenha atividades antioxidantes, antiinflamatórias e antitrombóticas (KWITEROVICH Jr, 2000; SVIRIDOV; NESTEL, 2002; RADER, 2002; BATER et al., 2003; MEYERS; KASHYAP, 2004).

É sabido que a LDL é a partícula lipoprotéica mais aterogênica (ASSMANN; FUNKE; SCHMITZ, 1989), sendo mais susceptível a modificações, como a oxidação, e sua posterior captação pelos macrófagos e a conseqüente transformação destes em células espumosas (STEINBERG; WITZTUM, 1990). Assim, segundo Barter e colaboradores, a HDL poderia anular o efeito da LDL através da remoção do colesterol presente nas células da íntima arterial, via receptor ABCA1 (BATER et al, 2003). A subpopulação de HDL, menos densa e mais rica em éster de colesterol (HDL₂), parece ser mais protetora que a subpopulação menor e mais densa (HDL₃). Isso se deve, provavelmente, ao fato de a subpopulação de HDL₂ ser composta principalmente por HDLs que contém somente apo A-I, que são mais eficientes em receber colesterol de tecidos periféricos, via ABCA1, e também são melhores doadores hepáticos de éster de colesterol, via SR-B1, quando comparadas as HDLs que contém apo A-I e A-II (SVIRIDOV; NESTEL, 2002; RADER, 2002; MEYERS; KASHYAP, 2004). Além

de retirar o excesso de colesterol celular, a HDL também atua no processo anterior a esse, inibindo que modificações oxidativas ocorram na LDL e, consequentemente, inibindo a captação da LDL pelos macrófagos. Ao prevenir a oxidação da LDL, a HDL também previne o endotélio dos efeitos citotóxicos da LDL-oxidada e da migração e adesão de monócitos, ambos induzidos pela LDL-oxidada (BARTER et al., 2003). O principal mecanismo pelo qual a HDL diminui o acúmulo de peróxidos lipídicos é pela hidrólise enzimática dos hidroperóxidos dos fosfolídeos (DURRINGTON; MACKNESS; MACKNESS, 2001). Vários componentes da HDL contribuem para o efeito antioxidante, incluindo sua apo A1 (maior) e algumas enzimas sendo a mais importante, a Paraoxonase1. A Paraoxonase é sintetizada primeiramente no fígado e uma porção é secretada no plasma onde é associada com a HDL. Ela é a responsável pela metabolização dos lipídeos oxidados de ambas LDL e HDL. Mackness e colaboradores, foram os primeiros a demonstrar que a PON1 humana poderia inibir a oxidação da LDL *in vitro* (MACKNESS; DURRINGTON, 2001). Para exercer seu efeito antioxidante, é necessário que haja interação entre a PON1 e os lipídeos oxidados, o que pode ocorrer de duas formas: uma das possibilidades é que a atividade antioxidante da PON1 seja mediada por difusão durante a interação entre LDL e HDL, a outra e mais provável consiste na transferência dos lipídeos oxidados da LDL para a HDL e posterior ação da PON1 (JAMES; DEAKIN, 2004). Importante destacar, que vários fatores estão envolvidos na modulação e nos níveis dessa enzima, como fatores ambientais, fármacos, fumo, álcool e dieta (COSTA et al., 2005) e, em virtude disso, numa dada população a atividade da PON1 pode variar em até 40 vezes (BROPHY et al., 2001). Outra função da HDL

envolvida no processo aterosclerótico é sua capacidade de reduzir a expressão das moléculas de adesão, induzidas pelas citocinas nos processos inflamatórios. A HDL modifica a célula de alguma maneira que as tornam resistentes em expressar essas moléculas induzidas por citocinas (COCKERILL GW et al., 1994; CALABRESI L et al., 1997; PARK SH et al., 2003). Importante destacar que essa inibição não é afetada pela variação no tamanho da HDL ou pela composição das apolipoproteínas, éster de colesterol e triglicerídeos. Em contraste essa propriedade antiinflamatória da HDL é bastante influenciada pela composição de fosfolípidos da partícula (BARTER et al., 2004).

A disfunção endotelial é iniciada com uma cascata de eventos, levando facilmente o sangue à coagulação, a perda de óxido nítrico, a qual causa a constrição dos vasos sanguíneos, migração e adesão dos leucócitos a qual acelera a formação da placa aterosclerótica. HDL também modula a função endotelial por promover um aumento na produção de NO através da ativação da enzima NO sintetase, além de desempenhar função antitrombogênica a qual pode ajudar a prevenir oclusão do vaso e o infarto do miocárdio como resultado (WANG; BRIGGS, 2004; SVIRIDOV; NESTEL, 2002; RARDER, 2002; BARTER et al., 2003).

Estabilidade do colesterol na HDL

Basicamente, o colesterol é encontrado no organismo na forma livre e na forma esterificada. A forma livre do colesterol que se situa na camada

superficial da partícula da lipoproteína é mais instável na estrutura da partícula do que a forma esterificada. Sendo esta, situada no centro da lipoproteína dependente das chamadas proteínas de transferência, como a CETP para deslocar-se da partícula de LDL, indo daí para outra partícula de lipoproteína (GARRET; GRISHAM, 1995). Já o colesterol livre pode se dissociar com facilidade da partícula de LDL e difundir-se no meio aquoso plasmático, onde a sua baixa polaridade pode resultar em precipitação e depósito na parede arterial. Em função dessas características físico-químicas, o organismo exige um eficiente mecanismo de esterificação do colesterol, mediado pela LCAT que age no meio plasmático, estimulada pela apo A1 presente em lipoproteínas como as VLDL, quilomícrons e principalmente nas lipoproteínas de alta densidade, e a ACAT, que age no meio intracelular. Desta forma, seja na partícula da lipoproteína ou dentro da célula, o colesterol é preferencialmente mantido na forma mais estável, a esterificada. Uma outra visão da função protetora, antiaterogênica da HDL é a de, como grande reservatório de apo A1, promover a esterificação do colesterol no compartimento plasmático.

Contudo, a esterificação do colesterol pela HDL recebido de outras classes de lipoproteínas ou de membranas celulares, faz com que o colesterol se transforme em uma forma química mais apolar. Essas moléculas de colesterol passam da superfície para o centro das partículas de lipoproteínas, tornando-se mais estáveis e evitando sua difusão para o meio plasmático de onde pode precipitar-se na parede arterial, devido à baixa solubilidade em meio aquoso.

Assim sendo, observamos que após a injeção de uma nanoemulsão, LDE, rica em colesterol parecida com a estrutura da LDL em pacientes com DAC

e em indivíduos-controle sem a doença, o colesterol livre da LDE era removido mais rapidamente do plasma nos pacientes com DAC do que nos controles. Já o colesterol esterificado não apresentava diferenças de remoção plasmática entre os indivíduos com DAC e os sem DAC. Esses resultados sugerem que, na DAC, o colesterol livre possa estar se dissociando da lipoproteína e se depositando na parede arterial. De fato, em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização e nos quais havíamos previamente injetado a LDE marcada com H^3 colesterol livre e C^{14} éster de colesterol, mostramos que nos fragmentos arteriais e venosos obtidos durante a cirurgia, havia mais colesterol livre do que a forma esterificada, o que confirma a hipótese acima (COUTO, R et al., 2007). Uma possível causa deste mecanismo pode ser a diminuição da capacidade da HDL de receber o colesterol livre da LDL e esterificá-lo, ou seja, de transferir o colesterol para sua forma mais estável.

Dislipidemias, Idade e DAC

A idade é um dos principais fatores de risco para a DAC. Calcula-se que a mortalidade para doença cardiovascular, incluindo as por DAC e doença arterial periférica, aumente em 2,5 vezes a cada dez anos. O risco de eventos cardiovasculares não fatais, também aumenta progressivamente com a idade, mesmo em indivíduos considerados de baixo risco. No entanto, em qualquer que seja a faixa etária, a presença de outros fatores de risco determina maior suscetibilidade para esses eventos (NCEP, 2001). Apesar de as lesões

ateroscleróticas evoluírem, com a idade, em extensão, número e gravidade, em ambos os sexos, o aumento na magnitude dos fatores de risco cardiovasculares e a ocorrência dos subseqüentes eventos clínicos são mais tardios em mulheres que em homens. Em conjunto, estudos enfatizam o conceito da aterosclerose como problema pediátrico, uma vez que estrias gordurosas na aorta se desenvolvem extensamente na infância; estrias gordurosas nas coronárias têm início na adolescência e placas fibrosas podem ser observadas antes dos 20 anos, progredindo significativamente na terceira década (TRACY, 1995; MCGILL; McMAHAN, 1998).

O aumento da idade é associado com o aumento dos níveis de VLDL e LDL (JOHN et al., 1995). Elevados níveis de colesterol da VLDL são associados com a diminuição dos níveis da lipoproteína de alta densidade (HDL) (FREEDMAN et al., 2001; WILSGAARD et al., 2004). Esse aumento é ocasionado pela transferência de éster de colesterol da HDL para a VLDL, o que é mediado pela CETP.

A diminuição da concentração da HDL do plasma é um fator de risco independente para o desenvolvimento de DAC. (MILLER et al., 1975; JOHN et al., 1995). Nos últimos anos, com o aumento da expectativa de vida da população houve também aumento na incidência destes fatores de risco. Desta forma, de acordo com a saúde pública, é importante se determinar mecanismos envolvidos com as mudanças no metabolismo lipídico relacionadas à idade, minimizando ou prevenindo a ocorrência de DAC.

Níveis elevados de LDL também são considerados um importante fator de risco. A correlação entre níveis elevados de LDL e DAC em idosos tem

sido descrita na literatura (JOHN et al.,1995; ROCTERS et al.,2002; TOMAS et al., 2003). Recentemente em nosso laboratório, foi demonstrado que a cinética plasmática da LDL se apresentou mais lenta em pacientes idosos, caracterizando desta forma, importante alteração no metabolismo lipídico associado com a idade. Isso pode ser atribuído não somente pela diminuição dos receptores da lipoproteína que a removem do plasma, como também pela mudança na sua composição (PINTO et al., 2001).

Reações metabólicas responsáveis pelo aumento da concentração de partículas mais densas de LDL produzem anormalidades na VLDL e HDL que podem contribuir para o risco da DAC. Estudos farmacológicos e bioquímicos indicam que as diferentes subclasses de HDL, mais precisamente as subfrações de tamanhos maiores, possuem várias atividades, que podem ser responsáveis pelos efeitos cardioprotetores (FREEDMAN et al.,1998; RESERSEN; FREEDMAN, 2002; DECOSSIN et al.,1997; ASZTALOS et al., 2000; BARTER et al.,2003). Comparados com grupos controle, indivíduos com DAC tem freqüentemente menor concentração de subclasses de HDL maiores (HDL_{2b}) junto com altas concentrações de partículas menores dessa lipoproteína (WILLIAMS et al.,1993). No que diz respeito as diferenças entre os sexos, por exemplo, as mulheres apresentam partículas maiores de HDL do que em homens, diferença esta que é diminuída com o aumento da idade (WILLIAMS et al.,1993).

Vários estudos observacionais suportam o propósito de que a HDL pode representar um fator de longevidade (BARTER, 2004a; ARAI; HIROSE, 2004; HEIJMANS et al., 2006; TERRY et al., 2007). Estudos têm encontrado que indivíduos mais velhos saudáveis têm maiores níveis de HDL-C que indivíduos

mais jovens com e sem DAC. Em outros estudos observacionais comparando indivíduos saudáveis entre 85 e 89 anos com indivíduos mais jovens, o nível de HDL-C foi maior que 40mg/dl em 92% dos mais velhos comparados com 69% de indivíduos saudáveis com idade entre 38 e 69 anos e 46% de indivíduos coronários de idade entre 32 e 69 anos (BARTER, 2004a). Pesquisas sugerem que maiores níveis de HDL-C podem ser genéticos, com níveis significativamente maiores em centenários. Em recente estudo, foi notado que centenários e seus descendentes tem maiores e mais largas HDL e LDL que os controles. Esses resultados foram independentes dos níveis de HDL-C e apolipoproteína A1, sugerindo que esses achados indicam que o tamanho da partícula de lipoproteína são hereditários e promovem longevidade (CELLINI et al., 2005).

Importante destacar que, ainda nesse trabalho, os efeitos da HDL coincidiram com o aumento da homozigose para variante VV do polimorfismo I405V no gene da CETP, variante associada com a atividade reduzida de CETP. Em adição, esses centenários com o genótipo VV e tamanho de HDL aumentada têm menor concentração de CETP sérica (CELLINI et al., 2005).

O mecanismo pelo qual esse polimorfismo da CETP e sua associação com a mudança na HDL, podendo contribuir para longevidade, ainda não é conhecido, mas pode ser secundário para a atividade reduzida da CETP. Interessantemente, outros polimorfismos da CETP (como o Taq1) são associados com uma concentração aumentada de HDL-C e reduzidos eventos coronarianos (CELLINI et al., 2005).

Nanoemulsão Lipídica Artificial (LDE)

Em 1987, foram iniciados estudos visando reproduzir o metabolismo da LDL por meio de uma nanoemulsão com composição lipídica semelhante à da LDL natural (LDE), mas sem a parte protéica da lipoproteína (MARANHÃO et al., 1993). O objetivo do estudo seria o uso da LDE na investigação da hipercolesterolemia relacionada à aterosclerose.

Os resultados em rato mostraram que a LDE apresentava cinética plasmática semelhante à da LDL natural, sugerindo que estivesse sendo captada pelos mesmos receptores que retiram a LDL da circulação. A LDE não tem proteína, mas, ao ser injetada na circulação plasmática, em contato com as lipoproteínas naturais, adquire apo E, que pode ser reconhecida pelo receptor da LDL. A apo E serve então de ponte para a LDE ligar-se ao receptor, sendo assim captada pela célula (MARANHÃO et al., 1993).

É importante ressaltar que a LDL natural não possui apo E, ligando-se ao receptor através da sua única proteína, a apo B100. Estudos de competição em linfócitos mostraram que a LDL natural compete com LDE pela captação celular, comprovando que a remoção de ambas se dá pelo mesmo receptor específico (MARANHÃO et al., 1997).

No entanto, a partícula artificial LDE tem mais afinidade pelos receptores da LDL do que a própria LDL natural (HIRATA et al., 1999). Isto acontece porque o meio ligante ao receptor utilizado pela LDE é a apo E, que tem mais afinidade pelo receptor do que a apo B100 da LDL natural.

Em outras experiências, a LDE foi injetada em indivíduos normolipidêmicos e em portadores de hipercolesterolemia (MARANHÃO et al., 1997). Nesta situação, o defeito básico consiste em receptores B e E defeituosos, o que resulta em captação deficiente da LDL e seu acúmulo no plasma. Nestes pacientes a LDE foi removida muito lentamente da circulação, confirmando o comportamento esperado e mostrando o potencial da nanoemulsão como instrumento para investigação das dislipidemias.

Diversos experimentos com a LDE já foram realizados pelo nosso grupo (MARANHÃO, 1994; MARANHÃO et al., 1997; HIRATA et al., 1999; PINTO et al., 2001; ADES et al., 2001; SANTOS et al., 2003; HUNGRIA et al., 2004; NAOUM et al., 2004; PUK et al., 2004; AZEVEDO et al., 2005; MELO et al., 2005; SANTOS et al., 2005; PINHEIRO et al., 2006).

Como exemplo descritivo, foi realizado um estudo com idosos, que apresentavam concentrações aumentadas de LDL, e a remoção da LDE foi mais lenta neste grupo quando comparados aos jovens (PINTO et al., 2001). Na Beta-Talassemia, onde ocorre uma diminuição da concentração de LDL, os estudos demonstraram que estes pacientes removiam a LDE da circulação mais rapidamente quando comparados com indivíduos sem a doença (NAOUM et al., 2004). Em pacientes submetidos a transplante cardíaco, demonstramos que a remoção da LDE da circulação ocorreu mais lentamente quando comparado com controles, sugerindo a presença de um mecanismo deficiente de remoção da LDL, que deve ser uma das causas da hipercolesterolemia, encontrada com frequência nesses pacientes (PUK et al., 2004).

Com os elementos disponíveis sobre o comportamento da LDE, foi levantada a hipótese de que a LDE pudesse substituir a LDL natural como veículo para direcionar os quimioterápicos para os tecidos malignos, evitando órgãos e tecidos normais (MARANHÃO et al., 1993 e MARANHÃO, 1994).

A nova hipótese é utilizar a LDE como modelo de lipoproteína, com o intuito de investigar a capacidade da HDL de receber lipídeos (colesterol-livre, éster de colesterol, triglicerídeos e fosfolipídeos) da LDL e, com isso, avaliar qualitativamente a HDL.

1.2 JUSTIFICATIVA

Alterações químicas e modificações na composição das HDL estão também envolvidas nos mecanismos de envelhecimento assim como na aterosclerose. É importante salientar que essas alterações podem estar relacionadas a alterações da função antiaterogênica da lipoproteína.

Além da determinação dos níveis plasmáticos da HDL é importante determinar a qualidade dessa lipoproteína, que está relacionada as suas funções antiaterogênicas. Embora haja muitos estudos enfocando o transporte de lipídeos da membrana celular para a HDL, o transporte entre as diferentes classes de lipoproteínas é praticamente inexplorado.

Em virtude de o envelhecimento provocar alterações no metabolismo lipídico, esse trabalho propõe estudar os aspectos qualitativos da HDL e sua relação com o avanço da idade. Dentre os aspectos qualitativos da HDL destacamos sua capacidade de receber lipídeos de outras lipoproteínas como um dos mais importantes, pois é o que está mais diretamente relacionado com as suas ações protetoras.

Em nosso laboratório foi desenvolvida uma metodologia para avaliar esta capacidade da HDL, utilizando uma nanoemulsão artificial como partícula doadora de lipídeos radioativos. Esta metodologia tem potencial para estabelecer novos mecanismos e correlações que avancem a compreensão do metabolismo lipídico.

Como a concentração da HDL está diminuída normalmente em idades mais avançadas, é interessante observar se, além disso, aspectos funcionais da lipoproteína possam estar alterados.

Baseado na introdução de metodologias para quantificar esse fenômeno, esse trabalho estabelecerá mecanismos e correlações existentes entre as diferenças qualitativas de níveis lipídicos e o avanço da idade.

1.3 OBJETIVOS

- Investigar, “in vitro”, a influência da idade sob os seguintes aspectos qualitativos da HDL em 3 diferentes faixas etárias: (Adulto Jovem, Meia-idade e Idoso sem evidência clínica de DAC):

- Tamanho de partícula;
- Medida da atividade da enzima PON1;
- Capacidade de receber colesterol livre, éster de colesterol, fosfolipídeos e triglicerídeos da LDE.

- Comparar os aspectos qualitativos analisados da HDL entre os grupos de idosos, com e sem evidência clínica de DAC.

2. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Casuística:

Os participantes desse estudo foram selecionados no Laboratório de Metabolismo de Lipídeos e no ambulatório da Cardiogeriatría do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina do estado de São Paulo. Os pacientes foram avaliados quanto as características clínicas e laboratoriais. Após essas informações, quando de acordo, os pacientes assinaram um termo de consentimento pós-informado e passaram a fazer parte deste estudo, cujo Protocolo de Pesquisa (1023/04) foi analisado e aprovado em 18/11/2004 pela Comissão Científica do Instituto do Coração (SDC 2533/04/153) e em 08/12/2004, pela Comissão de Ética em Pesquisas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FM-USP). Os indivíduos foram alocados em 4 diferentes grupos:

- *Grupo Adulto jovem:* Foram estudados 25 indivíduos adulto-jovens, com média de idade 25 ± 4 sendo 15 do sexo feminino e 10 do sexo masculino, normolipidêmicos, não diabéticos, não hipertensos, sedentários, não tabagistas e que não faziam uso freqüente de bebida alcoólica.

- *Grupo Meia-Idade:* Foram estudados 25 indivíduos de meia- idade, com média de idade de 42 ± 8 , sendo 17 do sexo feminino e 8 do sexo masculino, normolipidêmicos, não diabéticos, não hipertensos, sedentários, não tabagistas e que não faziam uso freqüente de bebida alcoólica.

- *Grupo de Idosos sem evidência clínica de DAC:* Foram estudados 25 indivíduos idosos, com média de idade 75 ± 6 sendo 12 do sexo feminino e 13 do sexo masculino, sem evidência clínica de doença coronariana, não diabéticos, sedentários, não tabagistas e que não faziam uso freqüente de bebida alcoólica. Dezenove pacientes faziam uso de anti-hipertensivos como Enalapril (20 mg/dia) e hidroclorotiazida (50 mg/dia). A ausência da DAC macrovascular foi diagnosticada por cinecoronariografia.

- *Grupo de Idosos com evidência clínica de DAC:* Foram estudados 11 indivíduos idosos que apresentavam evidência clínica da doença arterial coronariana, com média de idade 74 ± 5 , sendo 6 do sexo masculino e 5 do sexo feminino. Todos os pacientes faziam uso freqüente de anti-hipertensivos como enalapril (20 mg/dia), ou hidroclorotiazida (50 mg/dia). A terapia com hipolipemiantes foi suspensa por um período de 30 dias antes da coleta da amostra. A presença da DAC foi diagnosticada por cinecoronariografia prévia de seis meses.

Os pacientes foram pareados por índice de massa corpórea e sexo.

2.2-Determinações Bioquímicas Séricas

Após jejum de 12 horas, foram obtidas nos participantes as seguintes determinações bioquímicas: colesterol total (CT) e frações (VLDL, LDL e HDL), triglicerídeos (TG), apoA-I e apo B e glicose. O colesterol total foi determinado pelo método colorimétrico-enzimático (CHOD / PAP) automatizado,

com kit comercial Labtest (Labtest, Santa Lagoa, MG, Brasil). O HDL-colesterol foi determinado pelo mesmo método usado para o colesterol total, após a precipitação das lipoproteínas que contém apo B (VLDL e LDL) pelo kit comercial Labtest (Labtest, Santa Lagoa, MG, Brasil). O triglicerídeos e a glicose foram determinados por método colorimétrico-enzimático automatizado, com kit comercial Labtest (Labtest, Santa Lagoa, MG, Brasil). As apolipoproteínas, apo A-I e apo B, foram determinadas, por imunoturbidimetria automatizada, com kits comerciais Roche (Roche Diagnostics, Indianápolis, I.N., USA).

O VLDL-colesterol e o LDL-colesterol foram calculados pela fórmula de Friedewald [VLDL = triglicerídeos /5; LDL = colesterol total – (HDL + VLDL)], para valores de triglicerídeos menores que 400mg/dL (FRIEDEWALD, 1972).

2.3- Determinação da atividade da Paraoxonase

Amostras dos participantes foram coletadas, após jejum de 12 horas, em tubo seco e o soro foi obtido após 10 minutos de centrifugação, à 3.000 rpm, em centrífuga Sorval RT7. A atividade da PON1 foi medida pela adição de 500 µl de tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,05 contendo 2 mmol/L de CaCl₂ e 5,5 mmol/L de paraoxon (Sigma Chemical Co.) a 25 µL de soro. A amostra foi, então, distribuída em placa de 96 poços fundo chato, 200 µL por poço [em duplicata]. A leitura é feita com comprimento de onda de 405 nm e temperatura de 37°C utilizando Leitor de

Microplacas (Microplate Reader, Benchmark, Bio-RAD). Para o cálculo da atividade, foram feitas 6 leituras em intervalos de 1 minuto. O resultado foi obtido multiplicando a média da variação das absorbâncias pelo fator = 1163,43 nMol mL⁻¹.

Cálculo do Fator:

$$FATOR = \frac{VTR(mL)}{\varepsilon_{405} \times VA(mL) \times E(cm)}$$

onde,

VTR (volume total da reação) = 525 µL (500 µL solução + 25 µL soro)

ε_{405} = 18050 L M⁻¹ cm⁻¹ (Senti et al. , 2003; Agachan et al., 2004.)

VA (volume da amostra) = 25 µL

E (espessura do poço da placa) = 1 cm

Substituindo-se os valores e ajustando-os para as unidades internacionais temos:

$$Fator = 1163,43 \text{ nmol mL}^{-1}$$

Cálculo da Atividade:

Atividade da Paraoxonase = Fator x $\Delta\text{abs}/\text{min}$ = 1163,43 x Δabs nmol min⁻¹ mL⁻¹,

onde,

Δabs = é média da variação das absorbâncias medidas a cada 1 minuto.

2.4 – Determinação do tamanho de partícula da HDL

13054
O tamanho da HDL foi mensurado por espalhamento de luz (light scattering) utilizando o equipamento Laser Light Scattering (ZetaPALMS, Brookhaven Instr. Corp.) (LIMA; MARANHÃO, 2004). Após separação por precipitação química das frações contendo apoB (VLDL, LDL), utilizando uma solução de polietilenoglicol 8000 (200 g/L), o sobrenadante contendo HDL foi diluído em uma solução de NaCl 0,15M e 0,01% de EDTA (pH 7,5) e filtrada através de um sistema de filtragem (filtro millipore® 0,22µ). O diâmetro das partículas (nm) em solução foi então mensurado pela luz espalhada, coletada em um ângulo de 90° e expressos pelo resultado médio obtido em 5 corridas.

2.5 - Preparo da nanoemulsão rica em colesterol – LDE

A LDE foi preparada segundo a técnica descrita por GISNBURG et al (1982) modificada por Maranhão et al (1993), a partir da mistura de 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1 mg de trioleína, e 0,5 mg de colesterol, dissolvidos em clorofórmio/etanol (2:1 v/v). Os lipídeos foram pipetados em frasco de vidro, onde se adicionaram os isótopos. A mistura foi seca sob fluxo de nitrogênio, em banho de água (37 °C) e mantida em dessecador a vácuo, por 16 h, à 4 °C, para a remoção total dos solventes residuais. Foram adicionados 10 mL de solução tampão TRIS-HCl 0,01 M, pH 8,0. A suspensão dos lipídeos foi emulsificada por irradiação ultrassônica durante 3 h, sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando entre 51 e 55 °C. A irradiação ultrassônica foi realizada a

125 watts de potência, em modo contínuo de operação por um disruptor de Branson, modelo B 450 (Arruda Ultra-som, São Paulo, SP), equipado com ponta de titânio um cm de diâmetro.

As emulsões foram purificadas por ultracentrifugação (Ultracentrífuga Sorvall, modelo OTD Comb, Wilmington) durante 30 min., a 35.000 rpm, à 4 °C. O sobrenadante da solução (1,0 mL), contendo partículas que flutam em densidade 1,006 g/mL, foi retirado e descartado. O volume restante foi submetido à nova ultracentrifugação a 35.000 rpm, durante 2 h, à 4 °C, após adição de brometo de potássio sólido, para ajustar a densidade em 1,21 g/mL. Do sobrenadante foram removidos 2,0mL, os quais contêm a fração das partículas de tamanho e composição desejados.

A nanoemulsão purificada foi dialisada utilizando-se 4,0 mL de solução tampão estéril TRIS-HCl 0,01 M, pH 8,0 , e membrana de diálise Spectrapor 6 (Spectrum Medical Ind., LA), por 16 h, à 4 °C, para a total remoção do brometo de potássio utilizado na etapa final de purificação. A nanoemulsão obtida foi esterilizada por filtração utilizando filtros com poros de 0,2 µ de diâmetro.

Todo o procedimento de preparo das emulsões foi realizado em câmara de fluxo laminar vertical, para evitar a contaminação por microorganismos. Essas emulsões foram submetidas a testes de esterilidade na Seção de Bacteriologia do Laboratório do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pirogenicidade *in vivo* no Instituto de Medicina Nuclear da Universidade de São Paulo.

2.6 - Transferência de éster de colesterol (CE), fosfolipídeos (PL), colesterol livre (CL) e triglicerídeos da LDE para a HDL.

Amostras dos pacientes foram coletadas, após jejum de 12 horas, em EDTA (1,5g/L) e o plasma foi obtido após 10 minutos de centrifugação, a 3.000 rpm, em centrífuga Sorval RT7. Foram incubados 50 μ L da LDE marcada radiativamente com ^3H -éster de colesterol (^3H -CE) e ^{14}C -fosfatidilcolina (^{14}C -FL) ou ^3H -triglicerídeos (^3H -TG) e ^{14}C -colesterol livre (^{14}C -CL) com 200 μ L de plasma por 60 minutos, a 37°C, em agitador orbital Gyromax 706R, sob agitação de 40 rpm. Após incubação, foram adicionados à mistura 250 μ L de reagente de precipitação de lipoproteínas contendo apo B (sulfato de dextran 0,2%/ MgCl_2 3M, v/v). A mistura foi agitada por 30 segundos e posteriormente centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm. A fração HDL foi obtida após precipitação da nanoemulsão juntamente com as lipoproteínas contendo apo B, com 250 μ L de xtran/ MgCl_2 (0,2% Dextran e 0,3mol/L MgCl_2). Aliquotas de 250 μ L do sobrenadante, contendo a HDL, foram pipetadas em frascos de cintilação. Foram acrescentados a esses frascos, 5,0 mL de solução cintiladora Ultima Gold (PerkinElmer, Boston, USA) e, finalmente, a radioatividade presente nas amostras foi quantificada em contador Beta (Liquid Scintillation Analyzer, Packard 1600 TR, Palo Alto, CA) com a utilização do software Plus Vers. 5.01 da Diamond Computers, para determinação das contagens de ^{14}C e ^3H das amostras. O branco para este experimento consiste da mistura de 200 μ L de solução tampão TRIS-HCl e 50 μ L de LDE, incubada e precipitada nas mesmas condições descritas acima. O valor de radioatividade total presente na amostra foi determinado pela incubação de 200 μ L de plasma com

50µL de LDE, seguida de incubação, porém sem adição de reagente de precipitação. A quantificação dos lipídeos transferidos da LDE para HDL plasmática foi expressa como percentagem (%) em relação à radioatividade total incubada.

2.7 - Análise estatística

Os dados foram tabelados como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças entre os dados obtidos de cada grupo foram avaliadas pelo teste ANOVA e pelo teste *t*. Para avaliar a correlação de diferentes parâmetros como, por exemplo, a correlação entre as taxas de transferência dos lipídios para a HDL com os níveis séricos dos lipídeos e com a idade foi utilizado o teste de Pearson ou Spearman dependendo da distribuição da amostra. A probabilidade de significância considerada foi de $p < 0,05$ em todas as comparações efetuadas.

Utilizou-se software GraphPad Prism TM, versão 3.02 para as análises estatísticas.

3. RESULTADOS

3.1- Determinações bioquímicas

A Tabela 1 mostra os valores da concentração plasmática dos lipídeos e das apolipoproteínas dos grupos estudados.

Houve diferença entre os níveis séricos de colesterol total dos grupos, idosos sem evidência clínica de DAC (190 ± 40 mg/dL), meia idade (173 ± 43 mg/dL) e adulto jovem (113 ± 18 mg/dL); $p=0,0021$. O mesmo foi observado com a concentração de HDL-colesterol (50 ± 14 mg/dL, 40 ± 7 mg/dL, 40 ± 6 mg/dL ;respectivamente); $p=0,0007$. Importante ressaltar, que a diferença encontrada foi entre os grupos de idosos sem evidência clínica de DAC e adulto jovens.

Não houve diferença nos níveis séricos de LDL entre os grupos, adulto jovem (96 ± 23 mg/dL), meia idade (102 ± 44 mg/dL) e idosos sem evidência clínica de DAC (104 ± 19 mg/dL); $p=0,4993$. O mesmo ocorrendo com os triglicerídeos (86 ± 15 mg/dL, 100 ± 20 mg/dL, e 101 ± 30 mg/dL; respectivamente); $p=0,5164$.

Com relação aos resultados das concentrações da apo A-I e apo B dos grupos, a concentração plasmática de Apo A-I ($p= 0,4019$) e apo B ($p=0,1949$) dos grupos adulto jovem (128 ± 29 mg/dL e 70 ± 18 mg/dL) e meia-idade (135 ± 13 mg/dL e 88 ± 15 mg/dL) não foram diferentes das concentrações encontradas no grupo de idosos (141 ± 40 mg/dL e 80 ± 15 mg/dL). Quando realizada a comparação entre os grupos de idosos sem evidência clínica de DAC e com evidência de DAC, foram encontradas

diferenças nos níveis séricos de HDL e LDL colesterol. O grupo de idosos sem evidência clínica de DAC apresentou maior concentração sérica de HDL colesterol (50 ± 14 mg/dL, 42 ± 6 mg/dL, respectivamente) e menores níveis de LDL colesterol (104 ± 19 mg/dL, 143 ± 25 mg/dL, respectivamente). Não havendo diferença nos níveis de apoA1 e apoB, glicose e triglicerídeos entre os dois grupos.

Tabela 1- Concentrações plasmáticas dos lipídeos, apolipoproteínas e glicose dos grupos estudados

Determinações Bioquímicas	Adulto Jovem (n=25)	Meia-Idade (n=25)	Idoso (n=25)	Idoso DAC (n=11)
Colesterol (mg/dL)				
Total	113±18	173±43	190±40*	201±30
HDL	40±6	40±7	50±14*	42±6**
LDL	96±23	102±44	104±19	143±25**
Triglicerídeos (mg/dL)	86±15	100±20	101±30	123±46
Apo A-I (mg/dL)	128±30	135±14	141±40	100±60
Apo B (mg/dL)	70±18	88±15	80±15	87±40
Glicose (mg/dL)	89±11	83±10	91±12	98±12

Dados expressos em média ± desvio padrão Abreviaturas: Apo A-I= apolipoproteína A-I; ApoB = apolipoproteína B; HDL- Lipoproteína de Alta Densidade; LDL- Lipoproteína de Baixa Densidade; *P<0,0001, quando comparados os três grupos, adulto jovem, meia idade e idoso sem evidência clínica de DAC; **P<0,05, quando comparados os grupos de idosos, com e sem evidência de Doença Arterial Coronariana

3.2- Determinação do diâmetro da HDL e da atividade da PON1

A Tabela 2 mostra o tamanho das partículas de HDL e os valores da atividade da PON1 dos pacientes estudados.

Com relação ao tamanho das partículas de HDL, foi encontrada diferença entre os grupos: Os grupos adulto jovem ($8,9 \pm 0,3$ nm) e meia-idade ($8,9 \pm 0,3$ nm) apresentaram menores quando comparados ao diâmetro de HDL do grupo de idosos ($9,7 \pm 1,6$ nm); $p=0,0444$.

Não foram constatadas diferenças na atividade da PON1 entre os três grupos estudados, adulto jovem, meia idade e idosos sem evidência clínica de DAC (97 ± 44 mg/dL, 85 ± 40 mg/dL, 85 ± 44 mg/dL).

Ao comparar o grupo de idosos sem evidência clínica com o grupo de idosos com DAC, os idosos sem evidência da doença apresentaram maior tamanho de partícula de HDL quando comparado com o grupo de idosos com DAC ($9,7 \pm 1,6$ nm e $8,7 \pm 0,7$, respectivamente); $p=0,0380$. Não foi encontrada diferença na atividade da PON1 entre esses dois grupos.

Tabela 2–Tamanho das partículas de HDL e a medida da atividade da PON1 nos grupos estudados.

PARÂMETROS	GRUPOS			
	Adulto Jovem (n=25)	Meia-idade (n=25)	Idoso (n=25)	Idoso DAC (n=11)
Tamanho da HDL (nm)	8,9±0,3	8,9±0,3	9,7±1,6*	8,7±0,7**
PON1 (nmol min ⁻¹ mL ⁻¹)	97±44	85±40	85±44	76±42

Dados expressos em média ± desvio padrão, Abreviaturas: PON 1 = Paraoxonase 1; *P<0,05, quando comparado entre os três grupos, adulto jovem, meia idade e idoso sem evidência clínica de DAC; **P<0,05, quando comparado entre os grupos de idosos, com e sem Doença Arterial Coronariana

3.3-Taxa de transferência de colesterol livre, éster de colesterol, triglicerídeos e fosfolipídeos da LDE para a HDL.

A Tabela 3 mostra os valores das taxas de transferência do colesterol livre, éster de colesterol, triglicerídeos e fosfolipídeos da LDE para a HDL dos pacientes dos quatro grupos estudados.

Não houve diferença nas taxas de transferência do ^{14}C -colesterol livre dos grupos estudados: adulto jovem ($9,6\pm 1,7\%$), meia-idade ($10,1\pm 1,2\%$) e idosos sem evidência clínica de DAC ($10\pm 2,4\%$); $p=0,5515$. O mesmo ocorreu com a taxa de transferência do ^3H -triglicerídeos (adulto jovem: $6,5\pm 1,3\%$; meia-idade: $6,9\pm 1,3\%$ e idosos: $7,3\pm 2,4\%$; $p=0,4195$).

Foram constatadas diferenças significativas entre as taxas de transferência do ^3H -éster de colesterol entre os grupos: adulto jovem ($3,7\pm 1,0\%$); meia-idade ($4,1\pm 0,7\%$) e idosos sem evidência clínica de DAC ($5,3\pm 1,8\%$); $p=0,024$. Também ocorreu diferença nas taxas de transferência do ^{14}C -fosfolipídeo: adulto jovem ($18,7\pm 4,6\%$), meia-idade ($18,3\pm 4,0\%$) e idosos ($20,6\pm 5,3$); $p=0,0368$. É importante salientar que essas significâncias encontradas foram entre os grupos adulto jovem e idosos sem evidência clínica de DAC.

Quando realizada a comparação entre os grupos de idosos, as taxas de transferência de éster de colesterol e triglicerídeos se mostraram maior no grupo de idosos sem evidência clínica de DAC que no grupo de idosos com DAC (^3H -éster de colesterol: idosos sem a evidência da doença

($5,3 \pm 1,8\%$) e idosos com DAC ($3,1 \pm 2,3\%$); $p=0,0025$ e de ^3H -triglicerídeos: idosos sem evidência clínica de DAC ($7,3 \pm 2,4\%$) e idosos com DAC ($5,1 \pm 1,6\%$); $p=0,0072$). Foi encontrada uma tendência de significância nas taxas de transferência do ^{14}C -colesterol livre entre os grupos com valor de $p=0,052$. Não foi encontrada diferença entre as taxas de ^{14}C - fosfolipídeos.

Tabela 3–Taxa de transferência (%) do colesterol livre, éster de colesterol, triglicerídeos e fosfolipídeos da LDE para a HDL nos grupos estudados.

TAXA DE TRANSFERÊNCIA	GRUPOS			
	Adulto Jovem (n=25)	Meia-Idade (n=25)	Idoso (n=25)	Idoso DAC (n=11)
¹⁴ C-colesterol (%)	9,6±1,7	10,1±1,2	10±2,4	8,2±1,3**
³ H- éster de colesterol (%)	3,7±1,0	4,1±0,7	5,3±1,8*	3,1±2,3**
³ H-triglicerídeos (%)	6,5±1,3	6,9±1,3	7,3±2,4	5,1±1,6**
¹⁴ C-fosfolipídeos (%)	18,7±4,6	18,3±4,0	20,6±5,3*	19,9±2,3

Dados expressos em média ± desvio padrão, Abreviaturas: PON 1 = Paraoxonase 1; *P<0,05 quando comparado entre os três grupos, adulto jovem, meia-idade e idoso sem evidência clínica de DAC; **P<0,05 quando comparado entre os grupos de idosos, com e sem Doença Arterial Coronariana

Como demonstrado na Tabela 4, **a idade** se correlacionou positivamente com a taxa de transferência do ^3H -éster de colesterol ($r=0,3365$; $p=0,0036$), com a concentração de colesterol total ($r=0,4965$; $p=0,0001$) e com a concentração de HDL colesterol ($r=0,3559$; $p=0,0023$). Também houve correlação positiva com o Tamanho de HDL ($r=0,3695$; $p=0,0013$) (Figura 3). Importante ressaltar que foi encontrada uma tendência, não comprovada estatisticamente entre a idade e a taxa de transferência do ^3H -triglicerídeos ($r=0,2248$; $p=0,0559$).

Tabela 4- Correlação entre a idade e taxa de transferência do colesterol livre (^{14}C -CL), éster de colesterol (^3H -CE), triglicerídeos (^3H -TG) e fosfolípidos (^{14}C -PL) radioativos, tamanho da HDL, a atividade da PON1, o perfil lipídico, concentração das apolipoproteínas.

PARÂMETROS	IDADE	
	r	p
^{14}C - cholesterol	0,0107	0,9274
^3H - éster de colesterol (%)	0,3365	0,0036
^3H -triglicerídeos (%)	0,2248	0,0559
^{14}C -fosfolípide (%)	0,1520	0,1993
Tamanho da HDL (nm)	0,3695	0,0013
PON 1	-0,1983	0,1429
Colesterol total (mg/dL)	0,4965	0,0001
HDL-C (mg/dL)	0,3559	0,0023
LDL-C (mg/dL)	0,0568	0,6606
Triglicerídeos (mg/dL)	0,0688	0,6043
Apolipoproteína A-I(g/L)	0,1667	0,2070
Apolipoproteína B (g/L)	0,0424	0,7498

Dados expressos como coeficiente de correlação (r) de Sperman

Figura 3-Correlações entre idade e HDL-C, Colesterol Total, Tamanho de HDL e taxa de transferência de éster de colesterol (^3H -CE). (Continua)

Figura 3-Correlações entre idade e HDL-C, Colesterol Total, Tamanho de HDL e taxa de transferência de éster de colesterol ($^3\text{H-CE}$). (Conclusão)

Na tabela 5, a **taxa de transferência do ^{14}C -colesterol livre** se correlacionou positivamente com a taxa de transferência do ^3H -éster de colesterol ($r=0,4616$; $p=0,0001$) e com a taxa de transferência do ^3H -triglicerídeos ($r=0,4178$; $p=0,0002$). Não houve correlação entre taxa de transferência do ^{14}C -colesterol livre e as concentrações de colesterol total ($p=0,6816$), HDL colesterol ($p=0,8702$), Triglicerídeos ($p=0,3033$) e LDL colesterol ($p=0,1960$). O tamanho de HDL ($p=0,0751$), a paraoxonase ($p=0,5849$) e as concentrações de apo A1 ($p=0,2697$) e apoB ($p=0,0863$) também não se correlacionaram com taxa de transferência do ^{14}C -colesterol livre.

A tabela 5 também mostra, que **taxa de transferência do ^3H -éster de colesterol** se correlacionou positivamente com a taxa de transferência do ^3H -triglicerídeos ($r= 0,7394$; $p=0,0001$), com a taxa de transferência do ^{14}C -colesterol ($r= 0,4616$; $p=0,0001$), e com a taxa de transferência do ^{14}C -fosfolipídeos ($r=0,2430$; $p=0,0383$). Não houve correlação com o colesterol total ($p=0,7923$), HDL colesterol ($p=0,0955$), LDL colesterol ($p=0,5435$), triglicerídeos ($p=0,7502$), apo A1 ($p=0,3724$), apoB ($p=0,1839$). Também não houve correlação entre a taxa de transferência do ^3H -éster de colesterol e o tamanho de HDL ($p=0,9865$) e a paraoxonase ($p=0,7674$).

Na Tabela 6, é demonstrado que a **taxa de transferência do ^3H -triglicerídeos** se correlacionou positivamente com a taxa de transferência do ^{14}C -colesterol ($r= 0,4178$; $p=0,0002$) e com a taxa de transferência do ^3H -éster de colesterol ($r= 0,7394$; $p=0,0001$). Foi encontrada também correlação positiva desta taxa de transferência com a concentração de apoB ($r=0,3729$; $p=0,0036$). Não houve correlação entre a taxa transferência do ^3H -triglicerídeos

e a taxa de transferência do ^{14}C -fosfolípide ($p=0,5282$), o tamanho da HDL ($p=0,4266$), atividade da PON1 ($p=0,2253$). Não houve correlação também entre a taxa de transferência do ^3H -triglicerídeos e as concentrações de HDL-colesterol ($p=0,1761$), triglicerídeos ($p=0,2765$), apo A1 ($p=0,2170$).

Foi citado também na tabela 6 as correlações entre as **taxa de transferência do ^{14}C -fosfolípideo**, que de forma positiva se correlacionou com o tamanho de HDL ($r=0,2944$; $p=0,0115$) e com a concentração de HDL colesterol ($r=0,3408$; $p=0,0030$). É válido ressaltar, que esta taxa já citada acima, também se correlacionou com a taxa de transferência do ^3H -éster de colesterol ($r=0,2430$; $p=0,0383$).

A taxa de transferência do ^{14}C -fosfolípideo não se correlacionou com a atividade da PON1 ($p=0,3472$), com os valores de colesterol total ($p=0,7134$), LDL-colesterol ($p=0,8629$), triglicerídeos ($p=0,8841$), apo B ($p=0,4913$) e apoA1 ($p=0,8138$).

Tabela 5- Correlação entre a taxa de transferência do colesterol livre ($^{14}\text{C-CL}$) e do éster de colesterol ($^3\text{H-CE}$) radioativos e o tamanho da HDL, a atividade da PON1, o perfil lipídico, concentração das apolipoproteínas e idade.

PARÂMETROS	$^{14}\text{C-CL}$ (%)		$^3\text{H-CE}$ (%)	
	R	p	r	p
$^{14}\text{C-}$ colesterol	-	-	0,4616	0,0001
$^3\text{H-}$ éster de colesterol (%)	0,4616	0,0001	-	-
$^3\text{H-}$ triglicerídeos (%)	0,4178	0,0002	0,7394	0,0001
$^{14}\text{C-}$ fosfolípideo (%)	-0,1938	0,1005	0,2430	0,0383
Tamanho da HDL (nm)	-0,2096	0,0751	-0,0020	0,9865
PON 1	-0,0745	0,5849	-0,0404	0,7674
Colesterol total (mg/dL)	-0,0560	0,6816	-0,0359	0,7923
HDL-C (mg/dL)	0,0197	0,8702	0,1994	0,0955
LDL-C (mg/dL)	0,1665	0,1960	0,0786	0,5435
Triglicerídeos (mg/dL)	-0,1363	0,3033	-0,0420	0,7520
Apolipoproteína A-I(g/L)	-0,1460	0,2697	0,1183	0,3724
Apolipoproteína B (g/L)	0,2253	0,0863	0,1754	0,1839
Idade	0,0107	0,9274	0,3365	0,0030

Dados expressos como coeficiente de correlação (r) de Sperman

Tabela 6- Correlação entre a taxa de transferência do triglicerídeos ($^3\text{H-TG}$) e do fosfolípídeo ($^{14}\text{C-PL}$) radioativos e o tamanho da HDL, a atividade da PON1, o perfil lipídico, concentração das apolipoproteínas e idade.

PARÂMETROS	$^3\text{H-TG}$		$^{14}\text{C-PL}$	
	R	p	r	p
^{14}C -colesterol (%)	0,4178	0,0002	-0,1938	0,1005
^3H - éster de colesterol (%)	0,7394	0,0001	0,2430	0,0383
^3H -triglicerídeo (%)	-	-	-0,0750	0,5282
^{14}C -fosfolípídeo (%)	-0,0750	0,5282	-	-
Tamanho da HDL (nm)	-0,0944	0,4266	0,2944	0,0115
PON 1	-0,1646	0,2253	-0,1280	0,3472
Colesterol total (mg/dL)	-0,1834	0,1761	0,0501	0,7134
HDL-C (mg/dL)	0,1233	0,3055	0,3408	0,0030
LDL-C (mg/dL)	-0,0284	0,8263	-0,0223	0,8629
Triglicerídeos (mg/dL)	0,1440	0,2765	-0,0193	0,8841
Apolipoproteína A-I(g/L)	0,1631	0,2170	0,0313	0,8138
Apolipoproteína B (g/L)	0,3729	0,0036	-0,0913	0,4913
Idade	0,2248	0,0559	0,1520	0,1993

Dados expressos como coeficiente de correlação (r) de Sperman

4. DISCUSSÃO

A proteção conferida a HDL provavelmente é consequência de várias funções dessa lipoproteína. De fato, tem sido sugerido que há circunstâncias nas quais altas concentrações de HDL colesterol não estão associadas a sua ação protetora, visto que a heterogeneidade das suas propriedades funcionais depende principalmente do grau de modificação oxidativa da partícula e de suas subpopulações (BARTER; RYE, 2006; CUTRI; HIME; NICHOLLS, 2006). Portanto, a qualidade da HDL é que determina sua função e sua atividade antiaterogênica (BARTER, 2004).

Estudos observacionais mostram que a HDL pode representar um fator de longevidade (BARTER, 2004; ARAI; HIROSE, 2004; HEIJMANS, 2006; TERRY, 2007). Em 2004, foi realizado um estudo em que foi comparado indivíduos saudáveis entre 85-89 anos com indivíduos mais jovens, com e sem doença coronariana. O nível de HDL-C foi maior que 40mg/dL em 92% dos indivíduos mais velhos comparados com 69% de indivíduos saudáveis com idade entre 38-69 anos, e 46% de indivíduos coronários de idade entre 32-69 anos (BARTER, 2004). Esses dados condizem com os resultados do presente estudo, no qual foi encontrado maior concentração dessa lipoproteína nos indivíduos mais velhos que não evidenciaram a DAC. Este aumento foi responsável pela maior concentração de colesterol total encontrada nesses pacientes, já que não houve diferença nos outros lipídeos entre os três grupos: adulto jovem, meia-idade e idosos sem evidência clínica de DAC.

Há evidências convincentes de que pelo menos algumas das funções potencialmente antiaterogênicas da HDL estão relacionadas com subpopulações específicas dessa lipoproteína, não se relacionando com a fração total da mesma

(BARTER; RYE, 2006). Neste contexto, lipoproteínas de diâmetro maior são vistas como as mais protetoras, pois são mais aceptoras de colesterol liberado de macrófagos na parede da artéria, sendo partículas mais ricas de éster de colesterol (BARTER; RYE, 2006). No presente trabalho, o grupo de idosos sem evidência clínica de DAC apresentou maior tamanho de partícula de HDL comparado com os outros dois grupos, adulto jovem e meia-idade. Este resultado foi também encontrado no estudo no qual idosos sem doença coronariana e seus descendentes apresentaram maior diâmetro das partículas de HDL e LDL, independente dos níveis de HDL-C e apoA1, sugerindo que o tamanho de partícula esteja relacionado com longevidade (BARTER, 2004). Desse modo, no presente estudo, o maior diâmetro da partícula de HDL encontrado no grupo de indivíduos idosos, pode estar relacionado com a ausência de evidência clínica da DAC nesses pacientes.

A HDL também possui diversas propriedades antiaterogênicas, entre elas, antioxidante, antiinflamatória, antitrombótica e o transporte reverso de colesterol (SVIRIDOV; NESTEL, 2002; RADER, 2002; BARTER et al, 2003; MEYERS; KASHYAP, 2004). No que diz respeito a sua função antioxidante, ela foi avaliada neste estudo pela medida da atividade da enzima PON1. Alguns estudos mostraram a diminuição da atividade dessa enzima com a idade (FERRE et al., 2004; SERES et al., 2004). A explicação para esse fato é que, com a idade se observa aumento do colesterol total, aumentando a oxidação da LDL, a qual inativa a atividade da PON1 (FERRE et al., 2004; SERES et al, 2004). Em contradição, no presente estudo não foram encontradas diferenças entre a atividade da enzima nos diferentes grupos.

Apesar de ser importante na prevenção da oxidação de lipídeos (DURRINGTON; MACKNESS; MACKNESS, 2001), o resultado encontrado no presente trabalho pode ser devido a grande quantidade de fatores que influenciam a modulação dessa enzima, como fatores ambientais, fármacos, fumo, álcool e dieta. Em consequência, a concentração dessa enzima pode variar, *in vivo*, em até 40 vezes dentro de uma mesma população (COSTA et al., 2005).

A mais conhecida e mais importante função antiaterogênica da HDL é sua habilidade de promover o efluxo de colesterol das células (SVIRIDOV; NESTEL, 2002; RADER, 2002; BARTER et al., 2003; MEYERS; KASHYAP, 2004). Neste processo, destacamos três importantes mecanismos para sua realização: efluxo de colesterol celular, esterificação do colesterol e troca de lipídeos entre as lipoproteínas. Sabe-se que a forma livre do colesterol, situada na camada superficial da partícula da lipoproteína, é mais instável do que sua forma esterificada e pode dissociar-se com facilidade das lipoproteínas e difundir-se no meio aquoso plasmático. No entanto, a atividade de esterificação do colesterol da partícula de HDL tem sido pouco estudada. Com o intuito de avaliar o comportamento dessas duas formas de colesterol, foi realizado um estudo em nosso laboratório para verificar a captação de colesterol livre e sua forma esterificada em fragmentos arteriais e venosos de pacientes com DAC (COUTO et al., 2007). Vinte quatro horas antes da cirurgia de revascularização, foi injetada nesses pacientes, LDE marcada radioativamente com colesterol livre e éster. Como resultado, foi encontrada maior captação de colesterol livre de que sua forma esterificada nos tecidos vasculares.

Pode-se supor, portanto, que haja situações em que mecanismos de menor eficiência na captação e esterificação de colesterol resultem em maior predisposição para aterosclerose.

A HDL pode sofrer modificações em sua estrutura e composição, acarretando em alterações funcionais da partícula (FERRETI, 2005; NORATA; PIRILLO; CATAPANO, 2006). É descrito na literatura que alterações na composição e metabolismo da HDL podem estar associadas a doenças, resultando na instabilidade da partícula (KONTUSH; CHAPMAN, 2006). Estas alterações metabólicas levam a partícula de HDL a perder sua atividade biológica normal e adquirir novas propriedades (KONTUSH; CHAPMAN, 2006). Como consequência desta instabilidade, a lipoproteína pode sofrer alteração em sua capacidade de receber os lipídeos constituintes. As concentrações das demais lipoproteínas plasmáticas e a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico são provavelmente determinantes de alterações funcionais da HDL (CABANA et al., 1996; FERRETI et al., 2005; NORATA; PIRILLO; CATAPANO., 2006).

Dentre as alterações, destacamos a que esta relacionada à troca de lipídeos entre lipoproteínas, importante mecanismo no transporte reverso de colesterol, e que foi avaliada no presente trabalho por meio da capacidade da HDL em receber lipídeos. Esse mecanismo foi analisado por meio da taxa de transferência de cada lipídeo da LDE para HDL. Na análise da transferência de colesterol livre, não houve diferença entre as taxas de transferência para HDL nos

grupos adulto jovem, meia-idade e idoso sem evidência clínica da DAC, não havendo alteração na capacidade da HDL em receber este lipídeo. Portanto, essa ausência de alteração sugere que esta via do transporte reverso de colesterol não sofreu alteração com o avançar da idade.

Ao analisar a taxa de transferência de éster de colesterol da LDE para HDL, houve aumento no grupo de idosos sem evidência clínica de DAC, quando comparado com os grupos adulto jovem e meia-idade. Importante destacar que, dois fatores influenciam esta transferência: a presença de proteína de transferência específica, denominada CETP, e a concentração e composição das lipoproteínas doadoras e receptoras (LAMARCHE; RASHID; LEWIS, 1999; RASHID et al, 2003). A CETP promove dois tipos de troca entre as lipoproteínas. A primeira e mais comum, é a troca de éster de colesterol por triglicerídeo. A segunda promove troca somente de éster de colesterol entre as lipoproteínas (RAJARAM; CHAN; SAWYER, 1994). O aumento dessa taxa de transferência pode ser devido a quantidade de éster de colesterol presente nessa partícula que recebe além de TG, o próprio CE, num processo ciclo dependente.

Outro achado desse estudo foi a maior taxa de transferência de fosfolipídeos nos idosos que não evidenciaram a DAC, quando comparada com os grupos adulto jovem e meia-idade. Esse fato pode ser explicado em virtude da partícula necessitar de mais fosfolipídeos para sua síntese de monocamada, uma vez que ela capta mais éster de colesterol, aumentando seu núcleo, tornando-se maior.

No que diz respeito às correlações, podemos destacar a correlação positiva encontrada entre as taxas de transferência de colesterol livre, de

triglicerídeos e de éster de colesterol. A correlação entre colesterol livre e triglicerídeos representa uma das maiores funções da HDL, que é promover o transporte reverso de colesterol. O colesterol é captado na sua forma livre e esterificado, via LCAT, com posterior troca por triglicerídeos com as lipoproteínas plasmáticas (EISENBERG, 1984). Em virtude disso, sugere-se que quanto mais colesterol livre é captado pela HDL, mais colesterol é esterificado, e conseqüentemente, mais triglicerídeos é recebido pela HDL em troca desse colesterol.

Outra importante correlação foi encontrada entre as taxas de transferência do éster de colesterol e triglicerídeos. Isso pode ser explicado, pois ambos são partículas hidrofóbicas e, portanto, necessitam de proteína de transferência para serem transferidos. Reporta-se aqui, a CETP, onde tanto o éster de colesterol como os triglicerídeos são transferidos por essa via (STEIN; STEIN, 2005) e, portanto, obedecem a mesma relação de transferência.

Neste trabalho, também foram encontradas correlações positivas entre idade, taxa de transferência de éster de colesterol e tamanho de partícula de HDL. Logo, quanto maior a idade dos indivíduos maior quantidade de éster de colesterol foi recebida, resultando em maior tamanho de partícula. Baseado na literatura, estes resultados conferem a estes indivíduos possivelmente uma maior ateroproteção ((BARTER, 2004; ARAI; HIROSE, 2004; HEIJMANS, 2006; TERRY, 2007). Esses resultados estão relacionados com o grupo de indivíduos que não apresentavam qualquer tipo de doenças.

Em princípio, os indivíduos idosos sem evidência clínica da DAC, aparentemente têm alguma proteção contra a mesma. Desse modo, com o intuito

de saber se os resultados encontrados no presente trabalho sustentam a afirmação acima, foi realizada a comparação desse grupo com um grupo de idosos que apresentavam a doença arterial coronariana. Para que não houvesse interferência no metabolismo de lipídeos, a terapia com hipolipemiantes foi suspensa.

Algumas diferenças foram encontradas com relação as análises bioquímicas entre os dois grupos, como menor concentração de LDL-C e maior concentração de HDL-C no grupo de idosos que não apresentavam a doença. A menor concentração de HDL-C pode ser oriunda tanto da maior remoção desta lipoproteína da circulação quanto da menor formação de seus pré-cursors. Esses dados estão em concordância com outros trabalhos, em que pacientes com DAC apresentam alteração no perfil lipídico, em virtude dos altos níveis de LDL-C, e que há correlação inversa entre os níveis de HDL-C e a presença da doença (BISHOP.; DUBEN-ENGELKIRK.; FODY, 2000; NORATA; PIRILLO; CATAPANO, 2006).

Outro resultado importante deste trabalho foi o menor tamanho de partícula de HDL encontrado no grupo DAC. Esses resultados estão de acordo com os dados da literatura, nos quais o menor tamanho está relacionado com menor conteúdo de éster de colesterol, resultando em partículas mais aterogênicas. Ao comparar esses dois grupos, foi encontrada menor taxa de transferência de éster de colesterol e triglicerídeos no grupo de idosos que apresentavam DAC. Embora controversos, muitos estudos mostram que pacientes com DAC apresentam diminuição na atividade da CETP, proteína responsável pela troca tanto de éster de colesterol quanto de triglicerídeos. Assim sendo, a possível diminuição da atividade dessa proteína nos pacientes com DAC pode ser a responsável pelas menores taxas de transferência desses dois lipídeos encontradas neste trabalho. No entanto,

com relação à taxa de transferência do colesterol livre, embora não tenha havido diferença entre os grupos estudados, foi encontrada tendência de diminuição no grupo DAC ($p=0,0502$).

Com base nesses resultados sugere-se que pacientes com DAC apresentam alterações no tamanho e funcionalidade da partícula de HDL em promover o transporte reverso de colesterol.

5. CONCLUSÕES

- O grupo de indivíduos idosos sem DAC apresenta maior tamanho de partícula de HDL quando comparado com os outros grupos (Adulto jovem e Meia idade), sendo possivelmente partículas mais protetoras;
- Não há diferença na atividade da PON1 entre os grupos estudados;
- As taxas de transferência de lipídeos são maiores no grupo de idosos sem evidência clínica de DAC quando comparadas com os grupos adulto jovem e meia idade, indicando maior capacidade receptora de lipídeos neste grupo;
- O grupo de idosos sem DAC apresenta maiores taxas de transferência de lipídeos e maior tamanho de partícula quando comparados com o grupo de idosos com DAC, sugerindo que este último grupo apresenta alteração na funcionalidade da partícula de HDL.

REFERÊNCIAS

-
- ADES, A.; CARVALHO, J. P.; GRAZIANI, S. R.; AMANCIO, R. F.; SOUEN, J. S.; PINOTTI, J. A.; MARANHÃO, R. C. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. **Gynecol. Oncol.**, v. 82, p. 84, 2001.
- ARAI Y, HIROSE, N. Aging and HDL metabolism in elderly people more than 100 years old. **J Atheroscler Thromb.**, v. 11, p. 246, 2004.
- ASSMANN, G.; FUNKE, H.; SCHMITZ, G.- Low-density lipoproteins and hypercholesterolemia. **Drug Research.**, v. 39, p. 996, 1989.
- ASSMANN JR, G.; GOTTO, A. M. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. **Circulation.**, v. 109, p. 1118, 2004.
- ASZTALOS B.F, REHEIM O.S, MILANI R.L, LEFEVRE M, MENAMARA J.R, HORVATH K.V. Distribution of Apo A-I containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease. **Arterioscler Thromb Vas Biol.**, v. 20, p. 2670, 2000.
- ATZMON G, GABRIELY I, GREINER W, DAVIDSON D, SCHECHTER C, BARZILAI N. Plasma HDL levels highly correlate with cognitive function in exceptional longevity. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.**, v. 57, p. 712, 2002.
- AZEVEDO, C. H.; CARVALHO, J. P.; VALDUGA, C. J.; MARANHÃO, R. C. Plasma kinetics and uptake by the tumor of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) associated to etoposide oleate in patients with ovarian carcinoma. **Gynecol. Oncol.**, v. 97, p. 178, 2005.
- BACHORIK, P.S., RIFKIND, B.M., KWITEROVICH, P.O.- Lipídeos e dislipoproteinemias. In: HENRY J.B., **Diagnósticos clínicos e tratamentos por métodos laboratoriais**. 2ed. São Paulo, Manole, 1999.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NBR 14724: Normas para apresentação de trabalhos científicos, Teses, Dissertações e Monografias, Rio de Janeiro, 2006.

BAGDADE, J.D.; RITTER, M.C.; SUBBAIAH, P.V. Accelerated cholesteryl ester transfer in plasma of patients with hypercholesterolemia. **J. Clin. Invest.**, v. 87, p. 1259, 1991.

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

BARTER P.J. HDL: A recipe for longevity. **Atherosclerosis.**, v.5, p. 25, 2004a.

BARTER P.J, NICHOLLS S, RYE KA, ANANTHARAMAIAH GM, NAVAB M, FOGELMAN AM. Antiinflammatory properties of HDL. **Circ Res.**, v. 95, p. 764, 2004b.

BARTER P.J, RYE K.A. Relationship between the concentration and antiatherogenic activity of high-density lipoproteins. **Curr opin Lipid .**, v.17,p. 399, 2006.

BISHOP, M.L.; DUBEN-ENGELKIRK, J.L.; FODY, E.P.- Principles, procedures, correlations. In: **Cinical Chemistry.**, 4th edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

BROWN, M.S.; KOVANEN, P.T.; GOLDSTEIN, J.L. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. **Science.**, v. 212, p.628, 1981.

BROWN B.G, ZHAO X.Q, CHAIT A, FISHER L.D, CHEUNG M.C, MORSE J.S. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. HATS. **N Engl J Med.**, v. 24, p. 1583, 2001.

BROPHY V.H, JAMPSA R.L, CLENDENNING J.B, MCKINSTRY L.A, JARVIK G.P, FURLONG CE. Effects of 5' regulatory-region polymorphism on paraoxonase-gene (PON1)expression . **Am J Hum Genet.**,v. 68, p.1428, 2001.

CABANA, V. G.; LUKENS, J. R.; RICE, K. S.; HAWKINS, T. J.; GETZ, G. S. HDL content and composition in acute phase response in three species: triglyceride enrichment of HDL a factor in its decrease. **J. Lipid. Res.**, v. 37, p. 2662, 1996.

CALABRESI L, FRANCESCHINI G, SIRTORI CR, DE PALMA A, SARESELLA M, FERRANTE P, TARAMELLI D. Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high density lipoproteins. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 238,p. 61, 1997.

CELLINI E.; NACMIAS B.; OLIVIERI F.; Cholesteryl ester transfer protein (CETP) I405V polymorphism and longevity in Italian centenarians. **Mechanisms of aging and development.**, v. 126, p. 826, 2005.

CHAPMAN, M.J.; GOLDSTEIN, S.; LAGRANGE, D.; LAPLAUD, P.M. - A density gradient ultracentrifugal procedur for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. **J. Lipid Res.**, v.22, p. 260, 1981.

CHENG, C.F.; OOSTA, G.M.; BENSADOUM, A.; ROSENBERG, R.D.- Binding of lipoprotein lipase to endothelial cells in culture. **J. Biol. Chem.**,v.256,p.12893,1981.

COCKERILL G.W, RYE KA, GAMBLE JR, VADAS MA, BARTER PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**,v. 15, p. 1987,1995.

COSTA, L.G.; VITALONE, A.; COLE, T.B.; FURLONG, C.E.- Modulation of paraoxonase (pon1) activity. **Biochemical Pharmacology.**, v.69, p.541, 2005.

COUTO R.D, DALLAN LA, LISBOA LA, MESQUITA CH, VINAGRE CG, MARANHÃO RC. Deposition of free cholesterol in the blood vessels of patients with coronary artery disease: a possible novel mechanism for atherogenesis. **Lipids.**, v. 42, p. 411, Epub 2007.

CUTRI B.A, HIME N.J, NICHOLLS S.J. High-density lipoproteins: an emerging target in the prevention of cardiovascular disease. **Cell Res.**, v. 16, p. 799, 2006.

DECOSSIN C, CASTRO G, DERUDAS B, BERTRAND M, FRUCHART J.C, REVET C. Subclasses of LpA-I in coronary artery disease: distribution and cholesterol efflux ability. **Eur J Clin Invest.**, v. 27, p. 299,1997.

DUCHATEAU N.P., PULLINGER R C. , ORELLANA ER., KUNITAKE ST. , NAYA-VIGNE J. , . O'CONNOR PM., MALLOY MJ., AND KANE JP. Apolipoprotein L, a New Human High Density Lipoprotein Apolipoprotein Expressed by the Pancreas **J Biol Chem.**, v. 10, p. 25576, 1997.

DURRINGTON, P.N.; MACKNESS, B.; MACKNESS, MI. Paraoxonase and Atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biolog.**, v.21, p.473, 2001.

ECKARDSTEIN, A.V.; NOFER, J.R.; ASSMANN G.- High density lipoproteins and arteriosclerosis: Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.21, p. 13, 2001.

EISENBERG, S.- High density lipoprotein metabolism. **J. Lipid Res.**, v.25, p. 1017, 1984.

EKMAN, S.; LUNDBERG, B. The transfer of lipids from protein-free lipoprotein models to human fibroblasts in culture. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 921, p. 347, 1987.

FREEDMAN D.S, BEWMAN BA, SRINIVASAN SR, BERENSON GS, OTVOS JD. Distribution and correlates of high-density-lipoprotein subclasses among children and adolescents. **Metabolism.**, v.50, p. 370, 2001.

FREEDMAN D.S, OTVOS JD, JEYARAJAH EJ, BARBORIAK JJ, ANDERSON AJ, WALKER J. The measurement of lipoprotein subclasses with proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Associations with the extent of documented coronary artery disease. **Arterioscler Thromb Vas Biol.**, v.18, p. 1046,1998.

FERRE N, CAMPS J, FERNANDEZ-BALLART J, ARIJA V, MURPHY MM, CERUELO S, BIARNES E, VILELLA E, TOUS M, JOVEN J. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional, and lifestyle factors in the general population. **Clin Chem.**, v. 49, p.1491,2003.

FERRETTI G, BACCHETTI T, NÈGRE-SALVAYRE A, SALVAYRE R, DOUSSET N, CURATOLA G. Structural modifications of HDL and functional consequences. **Atherosclerosis.**, v. 187, p. 1, 2006.

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.**, v. 18, p. 499, 1972.

FRICK M.H, ELO MO, HAAPA K, HEINONEN OP, HEINSALMI P, HELO P. Helsinki Heart Study: primary prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia: safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. **N Engl J Med.**, v. 317, p. 1237, 1987.

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

GLOMSET, J.A.; NORUM, K.R.; KING, W. Plasma lipoproteins in familial lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency: lipid composition and reactivity in vitro. **J. Clin. Invest. Oct.**, v. 49, p. 1827, 1970.

GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S.- The LDL receptor and the regulation of cellular cholesterol metabolism. **J. Cell. Sci. Suppl.**, v. 3, p. 131, 1985.

GROENER, J.E.; KOSTNER, G.M. Lipid transfer protein-catalyzed exchange of cholesteryl ester between high density lipoproteins and apoB-containing lipoproteins. **J. Lipid Res.**, v. 28, p. 1053, 1987.

GUERIN, M.; DOLPHIN, P.J.; CHAPMAN, M.J. A new in vitro method for the simultaneous evaluation of cholesteryl ester exchange and mass transfer between HDL and apoB-containing lipoprotein subspecies. Identification of preferential cholesteryl ester acceptors in human plasma. **Arterioscler. Thromb.**, v.14, p. 199, 1994.

-
- GUERIN, M.; DOLPHIN, P.J.; TALUSSOT, C.; GARDETTE, J.; BERTHEZENE, F.; CHAPMAN, M.J. Pravastatin modulates cholesteryl ester transfer from HDL to apoB-containing lipoproteins and lipoprotein subspecies profile in familial hypercholesterolemia. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.15, p. 1359, 1995.
- GURGEL, E.F.; ABDALLA, L.F.; COSTA, S.S.S.; VAZ, J.A.R.; NASCIMENTO, M.L.; NAVES, L.A. Avaliação da correlação entre os níveis de apolipoproteínas A1 e as frações do colesterol. **Laboratório Sabin de Análises Clínicas**, Brasília – DF, 2006: <Disponível em www.sabinonline.com.br/imagem/liporoteina.jpg> Acesso em: 03 mai. 2007.
- HEIJMANS B.T, BEEKMAN M, HOUWING-DUISTERMAAT J.J, COBAIN M.R, POWELL J, BLAUW G.J, VAN DER OUDERAA F, WESTENDORP RG, SLAGBOOM PE. Lipoprotein particle profiles mark familial and sporadic human longevity. **PLoS Med.**, v. 3, p.495, 2006.
- HESLOP P, SMITH GD, METCALFE C, MACLEOD J, HART C. Sleep duration and mortality: The effect of short or long sleep duration on cardiovascular and all-cause mortality in working men and women. **Sleep Med.**, v. 3, p. 305, 2002
- HIRATA, R.D.; HIRATA, M.H.; MESQUITA, C.H.; CESAR, T.B.; MARANHÃO, R.C. Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsion model in rats. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1439, p. 53, 1999.
- HUNGRIA, V.T.; LATRILHA, M.C.; RODRIGUES, D.G.; BYDLOWSKI, S.P.; CHIATTONE, C.S.; MARANHÃO, R.C.- Metabolism of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with multiple myeloma and a preliminary clinical study of LDE as a drug vehicle for the treatment of the disease. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 53, p. 51, 2004.
- JAMES, R.W.; DEAKIN, S.P.- The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. **Free Radical Biology & Medicine.**, v. 37, p.1986, 2004.

JOHN S.,ALICE H.,MARINA G.,GREGORY G. Impact of age on the metabolism of VLDL,IDL,and LDL apolipoprotein B100 in men. **J.of Lipid. Res.**, v. 36, p. 165,1995.

JOHNSEN S.H, MATHIESEN E.B, FOSSE E, JOAKIMSEN O, STENSLAND-BUGGE E, NJOLSTAD I. Elevated high-density lipoprotein cholesterol levels are protective against plaque progression a follow-up study of 1952 persons with carotid atherosclerosis the tromsø study. **Circulation.**, v. 112, p. 498, 2005.

KWITEROVICH JR., P.O.- The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides:a current review. **Am. J. Cardiol.**, v.86, p. 452, 2000.

KONTUSH, A.; CHAPMAN, M.J. Functionally defective high density lipoprotein: a new therapeutic target at the cossroads of dyslipidemia, inflammation and atherosclerosis. **Pharmacol. Ver.**,v. 58, p. 342, 2006

LAMARCHE, B.; RASHID, S.; LEWIS, G.F. HDL metabolism in hypertriglyceridemic states: an overview. **Clinica Chimica Acta.**, v. 286, p.145, 1999.

LEE, D.M.; ALAUPOVIC, P. Studies of the composition and structure of plasma lipoproteins. Isolation, composition, and immunochemical characterization of low density lipoprotein subfractions of human plasma. **Biochemistry.**, v. 9, p. 2244, 1970.

LEWIS, G.F.; RADER, D.J. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport..**Circ Res.**, v. 96, p. 122, 2006.

LIMA, E.; MARANHÃO R.C. Rapid, simple laser-light scattering method for HDL particle size in whole plasma. **Clinical Chemistry.** v. 50, p. 1086, 2004.

LEWIS, G.F- Determinants of plasma HDL concentrations and reverse cholesterol **Curr Opin Cardiol.**, v. 21, p. 345, 2006.

MACKNESS, M. I.; DURRINGTON, P. N. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. **Atherosclerosis**., v. 115, p. 243, 2001.

MANN, C.J.; YEN, F.T.; GRANT, A.M.; BIHAIN, B.E. Mechanism of plasma cholesteryl ester transfer in hypertriglyceridemia. **J. Clin. Invest.**, v. 88, p. 2059, 1991.

MARANHÃO, R.C.; CESAR, T.B.; PEDROSO-MARIANI, S.R.; HIRATA, M.H.; MESQUITA, H.C.- Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling LDL. **Lipids**., v.28, p. 691, 1993.

MARANHÃO, R.C. - Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. **Cancer Res.**, v.54, p. 4660, 1994.

MARANHÃO, R.C. ; ROLAND, I.A. ; TOFFOLETTO, O. ; RAMIRES, J.A. ; GON CALVES, R.P. ; PILEGGI, F.- Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to LDL receptors. **Lipids**., v. 32, p. 627, 1997.

MARCEL, Y.L.; VEZINA, C.; TENG, B.; SNIDERMAN, A.- Transfer of cholesterol esters between human high density lipoproteins and triglyceride-rich lipoproteins controlled by a plasma protein factor. **Atherosclerosis**., v. 35, p.127, 1980.

McGILL H.C JR, McMAHAN C.A and The Patobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research group. Determinants of atherosclerosis in young. **Am J Cardiol.**, v. 82,p. 30T, 1998.

MELO, N.R.; LATRILHA, M.C.; SANTOS, R.D.; POMPEI, L.M.; MARANHÃO, R.C.- Effects in post-menopausal women of transdermal estrogen associated with progestin upon the removal from the plasma of a microemulsion that resembles low-density lipoprotein (LDL). **Maturitas**., v. 50, p. 275, 2002.

MEYERS, C.D.; KASHYAP, M.L.- Pharmacologic elevation of high-density lipoproteins: recent insights on mechanism of action and atherosclerosis protection. **Curr Opin Cardiol.**, v. 19, p. 366, 2004.

MILLER, G.J, AND N. E. MILLER. Plasma- high- density-lipoprotein concentration and the development of ischaemic heart disease. **Lancet.**, v.56, p.16, 1975.

NAOUM, F.A.; GUALANDRO, S.F.; LATRILHA, M.C.; MARANHÃO, R.C.- Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion in subjects with heterozygous beta-thalassemia. **Am. J. Hematol.**,v. 77, p. 340, 2004.

FORTE N.; DIAMENT J.; Lipoproteínas de alta densidade: aspectos metabólicos, clínicos, epidemiológicos e de intervenção terapêutica. Atualização para os clínicos. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 87, São Paulo Nov. 2006:<Disponível em: www.scielo.br/img/revistas/abc/v87n5/18f3.gif>Acesso em: 03 mai. 2007

NORATA G.D, PIRILLO A, CATAPANO A.L. Modified HDL: biological and physiopathological consequences. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.**, v.16,p. 371, Epub 2006.

PATSCH J.- Influence of lipolysis on chylomicron clearance and HDL cholesterol levels. **Eur. Heart J.**, v.19, (Suppl H), p. H2, 1998.

PARK S.H, PARK J.H, KANG J.S, KANG Y.H. Involvement of transcription factors in plasma HDL protection against TNF-alpha-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 35, p. 168, 2003.

PINTO, L.B.; WAJNGARTEN, M.; SILVA, E.L.; VINAGRE, C.G.; MARANHÃO, R.C.- Plasma kinetics of a cholesterol-rich emulsion in young, middle-aged and elderly subjects. **Lipids.**, v.36, p. 1307, 2001.

PINHEIRO K.V. ,. HUNGRIA V.T. M, FICKER E.S, VALDUGA C.J, MESQUITA C.H,. MARANHÃO R.C. Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma and a preliminary study on the toxicity of etoposide associated with LDE.**Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 57, p. 624, 2006.

PUK, C.G.; VINAGRE, C.G.; BOCCHI, E.; BACAL, F.; STOLF, N.; MARANHÃO, R.C.- Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion in patients submitted to heart transplantation. **Transplantation.**, v. 78, p. 1177, 2004.

RADER, D.J.; High-density lipoprotein and atherosclerosis. **Am. J. Cardiol.**, v. 90 (8A), p. 62, 2002.

RAJARAM, O.V.; CHAN, R.Y.S.; SAWYER, W.H. Effect of unesterified cholesterol on the activity of cholesteryl ester transfer protein. **Biochem. J.**, v. 304, p. 423, 1994.

RASHID, S.; WATANABE, T.; SAKAUE, T.; LEWIS, G.F. Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemic states: the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity. **Clinical Biochemistry.**, v. 36, p. 421, 2003.

RESENSEN R.S, OTVOS J.D, FREEDMAN D.S. Relations of lipoprotein subclass levels and low-density lipoprotein size to progression of coronary artery disease in the Pravastatin Limitation of Atherosclerosis in the Coronary Arteries. **Trial. Am J Cardiol.**, v. 90, p. 89,2002.

ROCTERS VAN LENNEP JE, WESTERVELD HT, ERKELENS DW, VAN DER WALL EE. Risk factors for coronary heart disease: implications of gender. **Cardiovasc Res.**, v. 53, p. 538, 2002.

SANTOS, R.D.; CHACRA, A.P.,MORIKAWA, A.T.; VINAGRE, C.G.; MARANHÃO, R.C.- Plasma kinetics of free and esterified cholesterol in familial hypercholesterolemia: effects of simvastatin. **Lipids.**, v. 40, p. 737, 2005.

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.**,v. 44, p.464, 2003.

SCARTEZINI, M.; PICHETH, G.; SALGADO, W.; IHARA, S.S.M.; PINTO, L.E.S.A.; TORRES, K.P.; MARTINEZ, T.L.- Metabolismo dos lípides e lipoproteínas. In: MRATINEZ, T.L., **Manual de condutas clínicas em dislipidemias**. 1ed. Rio de Janeiro, MedLine, 2003.

SCHAEFER, E.J.; ZECH, L.A.; JENKINS, L.L.; BRONZERT, T.J.; RUBALCABA, E.A.; LINDGREN, F.T.; AMODT, R.L.; BREWER, J.R.- Human apolipoprotein A-I and A-II metabolism. **J. Lipid Res.**, v.23, p. 850, 1982.

SERES I, PARAGH G, DESCHENE E, FULOP T JR, KHALIL A. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. **Exp Gerontol.**, v. 39, p. 59, 2004.

STEINBERG, D.; WITZTUM J.L.- lipoproteins and atherogenesis. **JAMA.**, v.264, p. 3047, 1990.

STEIN, O.; STEIN, Y.- Lipid transfer proteins (LTP) and atherosclerosis. **Atherosclerosis.**, v.178, p. 217, 2005.

SVIRIDOV, D.; NESTEL, P.- Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 161, p. 245-54, 2002.

TERRY D.F, EVANS J.C, PENCINA M.J, MURABITO J.M, VASAN R.S, WOLF P.A, KELLY-HAYES M, LEVY D, D'AGOSTINO R.B, BENJAMIN E.J. Characteristics of Framingham offspring participants with long-lived parents. **Arch Intern Med.**, v. 12, p. 438, 2007.

THE EXPERT PANEL ON DETECTION, EVALUATION, AND TREATMENT OF HIGH BLOOD CHOLESTEROL IN ADULTS. SUMMARY OF THE THIRD REPORT (Adult Treatment Panel III) OF THE NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP). **Jama.**, v.285,p.2486, 2001.

THOMAS P. BERSOT., GUY M. PÉPIN., ROBERT W. MAHLEY. Risk determination of dyslipidemia in populations characterized by low levels of high-density lipoprotein cholesterol. **American Heart Journal** ., v.146, p. 1053, 2003.

TRACY R.E. Risk factors and atherosclerosis in youth autopsy findings of the Bogalusa Heart Study. **Am J Med Sci.**, v.310, p. S37,1995.

VILARO, S.; LLOBERA, M.; BENGTSSON-OLIVECRONA, G.; OLIVECRONA, T. - Synthesis of lipoprotein lipase in the liver of newborn rats and localization of the enzyme by immunofluorescence. **Biochem. J., London.**, v.249, p.549, 1988.

WANG, C.S.; BRIGGS, M.R.- HDL: the metabolism, function, and therapeutic importance. **Chem Rev.**, v.104, p.119, 2004.

WILLIAMS P.T, VRANIZAN K.M, AUSTIN M.A, KRAUSS R.M. Associations of age, adiposity, alcohol intake, menstrual status and estrogen therapy with high-density-lipoprotein subclasses. **Arterioscler Thromb.**, v. 13, p. 1654, 1993.

WILSGAARD T, ARNESEN E. Change in serum lipids and body mass index by age, sex, and smoking status: the Tromso study 1986-1995. **Ann Epidemiol.**, v.14, p. 265, 2004.

YANCEY, P.G.; BORTNICK, A.E.; KELLNER-WEIBEL, G.; de la LLERA-MOYA, M.; PHILLIPS, M.C.; ROTHBLAT, G.H. Importance of different pathways os cellular cholesterol efflux. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 23, p. 712, 2003.