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

Transferência simultânea de lipídeos de um modelo artificial de lipoproteína (LDE) para a lipoproteína de alta densidade (HDL)

Ana Cristina Lo Prete

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Tit. Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo
2007

Ana Cristina Lo Prete

Transferência simultânea de lipídeos de um modelo artificial de lipoproteína (LDE) para a lipoproteína de alta densidade (HDL)

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Tit. Raul Cavalcante Maranhão

orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 17 Setembro de 2004.

*Aos meus amados pais, **Francisco e Sara**, 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.*

*Aos meus irmãos **Lúcia, Fábio e Francisco**, por
todos esses anos de companhia e de apoio. Por estarem
ao meu lado em todos os momentos da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Tit. Raul Cavalcante Maranhão pela indispensável orientação, oportunidade e apoio na minha formação científica.

À minha grande amiga Carolina Azevedo, pela importante ajuda científica e por estar sempre perto, mesmo que distante, em todos os bons e maus momentos vividos.

Aos amigos do Laboratório de Metabolismo de Lípidos, Adriana Bulgarelli, Amanda Padoveze, Ana Carolina Gagliardi, Claudete Justina Valduga, Cristina Almeida, Fabíola Filippin, Fernanda Maniero, Iara Kretzer, Juliana Moura, Renato Barbosa, Sheila Vasconcelos, Talita Seydell e Tatiane Vanessa Oliveira, pelo apoio e valorosa amizade.

À amiga Camila Puk, pela grande amizade, apoio e importante participação na realização deste estudo.

À Dr^a Carmen Vinagre pela análise crítica na fase final desta tese.

À amiga Débora Deus, pela ajuda e apoio durante toda a realização deste trabalho.

A toda a equipe do Laboratório de Metabolismo de Lípidos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho com seu apoio prático ou intelectual.

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

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida. Esses são
os imprescindíveis."*

Bertolt Brecht

RESUMO

LO PRETE, A.C. **Transferência simultânea de lipídeos de um modelo artificial de lipoproteína (LDE) para a lipoproteína de alta densidade (HDL)**. 2007. 85p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Lipoproteínas do plasma trocam lipídeos e apolipoproteínas constantemente. Além da ação de proteínas de transferência, a habilidade das lipoproteínas em receber ou doar lipídeos depende também de diversos outros fatores. A estrutura e a composição de lipídeos e de proteína das lipoproteínas podem influenciar a fluidez da partícula e, desse modo, esta habilidade da lipoproteína. No plasma, a classe de lipoproteína que é a mais afetada pela transferência de lipídeos é a HDL. O presente estudo foi projetado para estabelecer um método simples para quantificar a habilidade desta lipoproteína em receber simultaneamente suas principais classes de lipídeos constituintes, fosfolípídeo, colesterol livre, éster de colesterol e triglicerídeo. O método é baseado na troca lipídica ocorrida entre uma nanoemulsão artificial (LDE) que se assemelha à estrutura lipídica da LDL, usada como doador de lipídeos radioativos, e as lipoproteínas plasmáticas. Após precipitação da LDE e das demais lipoproteínas, a capacidade da HDL de receber lipídeos é quantificada pela medida da radioatividade presente na lipoproteína.

No presente estudo, foi realizada a padronização deste método, assim como analisadas possíveis interferências no método. No mesmo estudo, foi analisada a transferência de lipídeos da LDE para a partícula de HDL em indivíduos controles.

A elevação da temperatura (4 a 37°C), do tempo de incubação (5min a 2h) e de HDL-Colesterol (33 a 244 mg/dL) resultaram em progressivo aumento na transferência dos quatro lipídeos da LDE para a HDL. Por outro lado, o aumento do pH (6,5 a 8,5) e da concentração de albumina (3,50 a 7,00 g/dL) não alteraram os valores de transferência. A amostra de plasma mostrou ser inalterada para este ensaio por período de 12 meses ($p > 0,05$), enquanto que a LDE foi inalterada por até 15 dias ($p > 0,2$). Os resultados da análise *intra*-ensaio apresentaram imprecisão (C.V.) para a transferência de fosfolípídeo, colesterol livre, éster de colesterol e triglicerídeo de 0,83, 0,56, 1,49 e 0,51%, respectivamente. A análise *inter*-ensaio mostrou imprecisão para os resultados de transferência de fosfolípídeo, colesterol livre, éster de colesterol e triglicerídeo 0,78, 0,59, 1,32 e 0,58%, respectivamente. A média da transferência de fosfolípídeo, colesterol livre, éster de colesterol e triglicerídeo da LDE para a HDL nos 53 voluntários foi de $25,5 \pm 2,6$, $9,9 \pm 1,6$, $4,8 \pm 1,3$ e $6,9 \pm 1,1\%$, respectivamente. As transferências de éster de colesterol, triglicerídeo e colesterol livre se correlacionaram positivamente entre estes lipídeos. Foram encontradas correlações positivas também entre as transferências de fosfolípídeo e de triglicerídeo e entre a transferência de colesterol livre e a concentração de colesterol de HDL.

O método de transferência de lipídeos para a fração HDL mostrou ser prático e preciso, podendo, dentro das condições ideais estabelecidas neste trabalho, determinar a capacidade receptora de lipídeos da HDL.

Palavras-chave: LDE. Transferência lipídica. HDL. Lipoproteínas.

ABSTRACT

LO PRETE, A.C. **Simultaneous transfer of lipids from an artificial model lipoprotein (LDE) to high-density lipoprotein (HDL)**. 2007. 85p. Thesis (Doctoral) - Faculty of Pharmaceutical Sciences of University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2007.

Plasma lipoproteins constantly exchange lipids and apolipoproteins. Besides the action of transfer proteins, the ability of lipoproteins to receive or donate lipids also depends on several other factors. The structure, lipid and protein composition of the lipoproteins may influence the fluidity of the particle and thereby this ability of lipoprotein. In the plasma, the lipoprotein class that is the most affected by lipid transfers is HDL. The current study was designed to establish a practical method to quantify the ability of this lipoprotein to simultaneously receive its main constituent lipid classes, namely phospholipid, free cholesterol, cholesteryl ester and triglycerides. The method is based on the lipids exchange between an artificial nanoemulsion (LDE) that resembles the LDL, used as a donor of radioactive lipids, and plasma lipoproteins. After precipitation of the LDE and the others plasma lipoproteins, the accept capacity of the HDL is quantified by the measure of radioactivity in the lipoprotein.

In the present study, the validation of this method was carried through. Moreover, possible interferences in the method had been analyzed. In the same study, the transfer of lipids of LDE for the particle of HDL from control subjects was analyzed.

The rise of temperature (4 to 37°C), time of incubation (5min to 2h) and of HDL-Cholesterol (33 to 244 mg/dL) resulted in gradual increase in the transfer of the four lipids from LDE to HDL. On the other hand, the increase of pH (6.5 to 8.5) and albumin concentration (3.50 to 7.00 g/dL) had not modified the values of transfers. The plasma sample showed to be unchanged for this assay for period of 12 months ($p>0.05$), whereas the LDE was unchanged for 15-days ($p>0.2$). The intra-assay results showed imprecision (C.V) of 0.83, 0.56, 1.49 and 0.51% for phospholipid, free cholesterol, cholesteryl ester and triglycerides transfer, respectively. The inter-assay showed imprecision for results of phospholipid, free cholesterol, cholesteryl ester and triglycerides transfer of 0.78, 0.59, 1.32 and 0.58%, respectively. The average of phospholipid, free cholesterol, cholesteryl ester and triglycerides transfers from LDE to HDL in the 53 volunteers was of 25.5 ± 2.6 , 9.9 ± 1.6 , 4.8 ± 1.3 and $6.9\pm1.1\%$, respectively. Cholesterol ester, triglyceride and free cholesterol transfers positively correlated among each other. A positive correlation was also found between phospholipid and triglyceride transfers and free cholesterol transfer and HDL-cholesterol concentration.

The method of lipids transfer to HDL showed to be practical and reproducible, being able, inside of the ideal conditions established in this work, to determine the acceptora capacity of lipids of the HDL.

Keywords: LDE. Transfer of lipids. HDL. Lipoprotein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito do aumento da temperatura na transferência de fosfolípídeo (●), colesterol livre (○), éster de colesterol (■) e triglicerídeo (◊) da LDE para a HDL (n= 5 alíquotas, valores expressos em média $\pm$ desvio padrão).

Figura 2. Efeito da variação do pH plasmático de 6,5 a 8,5 na transferência de fosfolípídeo (●), colesterol livre (○), éster de colesterol (■) e triglicerídeo (◊) da LDE para a HDL (n=5 alíquotas; valores expressos em média $\pm$ desvio padrão).

Figura 3. Efeito do aumento do tempo de incubação na transferência de fosfolípídeo (●), colesterol livre (○), éster de colesterol (■) e triglicerídeo (◊) da LDE para a HDL (n= 5 alíquotas; valores expressos em média $\pm$ desvio padrão).

Figura 4. Efeito do aumento da concentração de albumina na transferência de fosfolípídeo (●), colesterol livre (○), éster de colesterol (■) e triglicerídeo (◊) da LDE para a HDL (n= 5 alíquotas, valores expressos em média $\pm$ desvio padrão).

Figura 5. Efeito do aumento de HDL-colesterol na transferência de fosfolípídeo (●), colesterol livre (○), éster de colesterol (■) e triglicerídeo (◊) da LDE para a HDL (n= 5 alíquotas, valores expressos em média $\pm$ desvio padrão).

Figura 6. Correlação entre as taxas das transferências de éster de colesterol e triglicerídeo (A), éster de colesterol e colesterol livre (B), triglicerídeo e colesterol livre (C) e fosfolípídeo e triglicerídeo (D) (n=53 indivíduos; A: $p=0,0041$, $r=0,3883$; B: $p=0,0005$, $r=0,4629$; C: $p<0,0001$, $r=0,5974$; D: $p=0,0015$, $r=0,4254$).

Figura 7. Correlação entre a taxa da transferência de colesterol livre e a concentração de colesterol de HDL (n=53 indivíduos; $p=0,0305$, $r=0,3468$).

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
HDL	lipoproteína de alta densidade
IDL	lipoproteína de densidade intermediária
IMC	índice de massa corpórea
LCAT	lecitina colesterol acil transferase
LDE	nanoemulsão lipídica de baixa densidade
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LE	lipase endotelial
LH	lipase hepática
LLP	lipase lipoprotéica
NO	óxido nítrico
PLTP	proteína de transferência de fosfolípidos
PON1	paraoxonase 1
SR-B1	receptor <i>scavenger</i> classe B tipo I
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Metabolismo Lipídico.....	14
1.2 Lipoproteína de Alta Densidade.....	19
1.3 Funções da HDL.....	21
1.3.1 <i>Transporte Reverso do Colesterol</i>	24
1.4 Nanoemulsões ricas em colesterol (LDE).....	26
2. JUSTIFICATIVA.....	29
3. OBJETIVOS.....	31
4. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Material.....	34
4.2 Métodos.....	34
4.2.1 <i>Preparo da LDE</i>	34
4.2.2 <i>Transferência de fosfolípídeo, colesterol livre, éster de colesterol e triglicerídeo da LDE para a HDL</i>	36
4.2.3 <i>Transferência de lipídeos da LDE para HDL sob diferentes condições</i>	37
4.2.3.1. <i>Temperatura</i>	37
4.2.3.2. <i>pH</i>	38
4.2.3.3. <i>Tempo de incubação</i>	38
4.2.3.4. <i>Concentração de albumina</i>	39
4.2.3.5. <i>Concentração de HDL-Colesterol</i>	39
4.2.4 <i>Tempo de armazenamento da amostra</i>	40
4.2.5 <i>Tempo de armazenamento da LDE</i>	40

4.2.6 Validação Intra- e Inter-ensaio.....	41
4.2.7 Casuística.....	41
4.2.8 Determinações bioquímicas séricas.....	42
4.2.9 Tamanho da HDL.....	43
4.2.10 Análise Estatística.....	43
5. RESULTADOS.....	45
5.1 Efeito da temperatura.....	46
5.2 Efeito do pH.....	47
5.3 Efeito do tempo de incubação.....	48
5.4 Efeito da albumina.....	49
5.5 Efeito da HDL-Colesterol.....	50
5.6 Efeito do tempo de armazenamento da amostra.....	51
5.7 Efeito do tempo de armazenamento da LDE.....	51
5.8 Validação Intra- e inter-ensaio.....	51
5.9 Tamanho da partícula de HDL e transferência de fosfolípídeo, colesterol livre, éster de colesterol e triglicerídeo da LDE para a HDL, em indivíduos saudáveis.....	52
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXO.....	84

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

1.1 Metabolismo Lipídico

Os lipídeos são um grupo heterogêneo de compostos que, devido a sua insolubilidade em soluções aquosas, são transportados no plasma em associação a proteínas, em forma de partículas lipoprotéicas.

As lipoproteínas apresentam forma esférica e são compostas por um núcleo lipídico hidrofóbico, constituído principalmente por éster de colesterol e triglicerídeos, envolto por uma monocamada hidrofílica composta por fosfolipídeos, colesterol e proteínas. As lipoproteínas podem ser classificadas em quatro grupos de acordo com sua composição, densidade e mobilidade eletroforética: quilomícrons, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) (LEE et al.,1970; CHAPMAN et al.,1981).

Seus componentes protéicos são denominados apolipoproteínas e se associam à lipoproteína por interações não covalentes. As apolipoproteínas desempenham importante papel na estabilização estrutural das lipoproteínas, modulam o metabolismo lipoprotéico ao atuarem como ativadores e bloqueadores enzimáticos e, por fim, medeiam a captação celular das lipoproteínas por receptores específicos (SCHAEFER et al., 1978). Variam no tamanho e na composição química, sendo classificadas de acordo com uma nomenclatura alfa-numérica: apo A-I (FIELDING; SHORE; FIELDING, 1972; BREWER et al., 1978), apo A-II (LUX; JOHN; BREWER, 1972), apo A-IV (WEISGRABER; BERSOT; MAHLEY, 1978), apo B (apo B-100 e apo B-48) (KANE; HARDMAN; PAULUS, 1980), apo C-I, apo C-II (LAROSA

et al., 1970), apo C-III (BROWN; BAGINSKY, 1972), apo D (CURRY; MCCONATHY; ALAUPOVIC, 1977), apo E (SHORE; SHORE, 1973), apo F (OLOFSSON; MCCONATHY; ALAUPOVIC, 1978), apo G (AYRAULT-JARRIER; ALIX; POLONOVSKI, 1978), apo H (NAKAYA; SCHAEFER; BREWER, 1980), apo L (VANHOLLEBEKE; PAYS, 2006), apo M (LUO et al., 2004), apo(a) (BORRESEN; BERG, 1981) e apo J (DE SILVA et al. 1990b, 1990c).

Inicialmente, os lipídeos ingeridos na dieta sofrem digestão, a qual tem início no estômago pela ação da lipase lingual e da lipase gástrica. Estas enzimas hidrolisam preferencialmente os triglicerídeos, liberando ácidos graxos de cadeias curta e média. No duodeno, a lipase pancreática hidrolisa a cadeia longa, completando o processo de digestão dos triglicerídeos (TURLEY; DIETSCHY, 2003). O fosfolipídeo e o éster de colesterol são hidrolisados no intestino pela fosfolipase A2 e pela colesterol esterase, respectivamente. Os produtos da digestão lipídica (ácidos graxos, monoglicerídeo, lisofosfolipídeo e colesterol) interagem com os sais biliares e são dissolvidos no interior das micelas formadas por esses sais (LEVY, 1992). Quando nas células absortivas da mucosa intestinal, devido ao baixo pH, os produtos da digestão lipídica se separam das micelas de sais biliares e se difundem por absorção passiva através da membrana da borda em escova (TURLEY; DIETSCHY, 2003). Em seguida, a proteína que se liga aos ácidos graxos conduz esses lipídeos ao retículo endoplasmático liso. Nessa organela, a Acetil Coenzima A: Colesterol Acil Transferase (ACAT) reesterifica ácidos graxos, monoglicerídeo, lisofosfolipídeo e colesterol, formando novamente triglicerídeos, éster de colesterol e fosfolipídeos. Os lipídeos formados migram do retículo endoplasmático liso até o retículo endoplasmático rugoso, onde incorporam a apo B-48, apo A-I, apo A-II e apo A-IV, originando a partícula

denominada pré-quilomícron. Esta partícula recém formada é transportada até o aparelho de Golgi e, posteriormente, secretada na linfa mesentérica pelo processo denominado exocitose ou pinocitose reversa (REDGRAVE; MARANHÃO, 1985; LEVY, 1992).

A quantidade, o tamanho e a composição do quilomícron secretado dependem do aporte e da natureza dos lipídeos absorvidos. O diâmetro do quilomícron secretado varia de 75 a 1200 nm, sua densidade é de aproximadamente 0,95 g/mL, sua mobilidade eletroforética é nula e seu componente estrutural é a apo B-48. O núcleo do quilomícron é formado por triglicerídeos (80-95%) e éster de colesterol (2-4%). A monocamada que envolve este núcleo é composta por fosfolipídeos (3-6%), colesterol (1-3%) e proteínas (1-2%) (BISGAIER; GLICKMAN, 1983).

Após sua secreção nos capilares linfáticos intestinais, o quilomícron interage com outras lipoproteínas da linfa, principalmente com a HDL (HAVEL; KANE; KASHYAP, 1973; SCHAEFER et al., 1982). Como resultado dessas interações, o quilomícron recebe apo C e apo E, doa apo A-I e apo A-IV e perde fosfolipídeos e colesterol (TALL et al., 1982; BORENSZTAJN; GETZ; KOTLAR, 1988). Após ocorrerem as trocas de componentes de superfície por meio de colisões com outras lipoproteínas, o quilomícron alcança a circulação sistêmica pelo ducto torácico (PATSCHE, 1998). Nesta fase, pela ação da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP), o quilomícron doa triglicerídeos para a HDL e recebe em troca, éster de colesterol, sendo esta troca parte do mecanismo denominado transporte reverso de colesterol. Simultaneamente a essas trocas, a apo C-II, presente no quilomícron, ativa a enzima lipase lipoprotéica (LLP) que se encontra ligada à membrana basal das células endoteliais (CHENG et al., 1981;

VILARO et al., 1988). Esta enzima promove a hidrólise dos triglicerídeos contidos em seu núcleo, resultando em intensa catabolização da partícula e conseqüente liberação de ácidos graxos livres, monoglicerídeos e glicerol. Os ácidos graxos livres são a seguir oxidados ou reesterificados e armazenados no tecido muscular e adiposo (BROWN; KOVANEN; GOLDSTEIN, 1981).

A partícula resultante do catabolismo do quilomícron apresenta diâmetro menor (30-80 nm) e é denominada remanescente de quilomícron (WINDLER et al., 1988). Esse remanescente sofre a perda de apo A-I e de apo C, que retornam para a HDL. Além disso, tem seu conteúdo de triglicerídeo diminuído quando comparado com o quilomícron, porém sem alteração significativa da composição de éster de colesterol. No entanto, a perda de fosfolipídeos durante a formação do remanescente de quilomícron torna sua superfície relativamente mais rica em colesterol.

A catabolização do quilomícron possibilita que a partícula ultrapasse os sinusóides hepáticos onde está localizada a enzima lipase hepática (LH), responsável pela hidrólise final de parte dos triglicerídeos que não haviam sido hidrolisados pela LLP. Desse modo, o remanescente de quilomícron pode ser reconhecido pelas células parenquimatosas hepáticas. O reconhecimento ocorre por meio de sua ligação a receptores que reconhecem a apo E (receptor E ou receptor de remanescente), situados na superfície sinusoidal dos hepatócitos (BROWN; KOVANEN; GOLDSTEIN, 1981).

Após a captação hepática, o remanescente de quilomícron é degradado nos lisossomos, liberando ácidos graxos, glicerol, aminoácidos e colesterol. Este último pode ser utilizado para a síntese de membranas, ser excretado na bile na forma de ácidos biliares ou integrar as VLDLs, lipoproteínas

produzidas e secretadas pelos hepatócitos (HAVEL; HAMILTON, 1988), dando continuidade ao transporte lipídico. A produção da VLDL é modulada por fatores hormonais e por fatores dependentes do balanço energético e metabólico. A VLDL tem diâmetro de 30 a 70 nm, densidade de flutuação entre 0,950 e 1,006 g/mL e mobilidade eletroforética pré- β . São lipoproteínas compostas por lipídeos endógenos, consistindo de triglicerídeos (55-65%), colesterol (4-8%), fosfolipídeos (15-20%) e apolipoproteínas (apo B-100, apo C's e apo E).

No hepatócito, a formação da VLDL ocorre em duas etapas principais. Na primeira etapa, a qual ocorre no retículo endoplasmático, a apo B é lipidada por proteínas de transferência microssomais. Estas proteínas transferem lipídeos, principalmente triglicerídeos, para a apo B, levando à formação da pré-VLDL. Na segunda etapa, a pré-VLDL é convertida em VLDL na membrana celular dos hepatócitos (GIBBONS, 1990). Logo após formação e posterior secreção na circulação, a VLDL entra em contato com outras lipoproteínas e, por meio de colisões principalmente com a HDL, adquire maiores quantidades de apo E e de apo C-II (HAVEL; HAMILTON, 1988). Assim como no metabolismo do quilomícron, a apo C-II atua como cofator de ativação da LLP (KRAUSS et al., 1973), promovendo hidrólise dos triglicerídeos da VLDL. Desse modo, as partículas de VLDL tornam-se progressivamente depletadas em triglicerídeos e parte da superfície da partícula, incluindo fosfolipídeos e apo C e E, é transferida para partículas de HDL, levando à formação das partículas de IDL.

Em meados da década de 70, estudos de cinética identificaram a IDL como uma classe de lipoproteína com propriedades metabólicas distintas, agindo como intermediária de transição na cascata de delipidação da VLDL para a LDL. Cerca de 50% do total das partículas de IDL formadas a partir do catabolismo

da VLDL são removidas pelo fígado por endocitose, via ligação tanto ao receptor específico de apo E (receptor E), quanto ao receptor de apo B e apo E (receptor B/E). As partículas de menor tamanho podem ser removidas pelo fígado ou podem continuar a perder triglicerídeos e fosfolipídeos por ação da LH presente no endotélio dos capilares hepáticos. Além dessa alteração lipídica, com exceção da apo B-100, a IDL perde todas as apolipoproteínas e passa a ser denominada LDL (HAVEL, 1984).

A LDL é uma lipoproteína com tamanho de 18 a 30 nm e densidade entre 1,020 e 1,065 g/mL. Possui mobilidade eletroforética beta e é constituída principalmente de ésteres de colesterol, contendo também uma pequena porção de triglicerídeos (ALAUPOVIC; LEE; MCCONATHY, 1972). A parte protéica da LDL é constituída de uma única molécula de apolipoproteína B-100, que é o componente que liga essas partículas a receptores específicos. A LDL ligada aos receptores é então captada por endocitose e posteriormente degradada pelos lisossomos (GOLDSTEIN et al., 1985). Desse modo, o colesterol da LDL pode ser utilizado em diversos processos celulares, entre eles, a síntese de membranas e hormônios, assim como ser armazenado, após reesterificação pela ação da ACAT.

Por último temos a classe de lipoproteína foco do presente estudo, a HDL.

1.2 Lipoproteína de Alta Densidade

HDL é uma classe heterogênea de lipoproteínas sintetizada e secretada tanto pelo fígado quanto pelo intestino. É caracterizada por alta densidade

(>1,063 g/mL) e menor tamanho (5-17 nm) dentre as demais lipoproteínas (LUND-KATZ et al., 2003; KOPPAKA, 2001; SEGREST et al., 2000). As várias subclasses da HDL variam em seu conteúdo de lipídeos, apolipoproteínas, enzimas e proteínas de transferência de lipídeos, resultando em partículas de diferentes cargas de superfície, densidade, tamanho e antigenicidade.

A HDL constitui-se de um núcleo lipídico hidrofóbico, contendo principalmente ésteres de colesterol (10-20%), uma pequena quantidade de triglicerídeos (7%) e colesterol não esterificado (<1%). Este núcleo é circundado por uma camada monofásica de fosfolipídeos (25%), colesterol não esterificado (5%) e apolipoproteínas (48-53%) (BARTER et al., 2003). As principais apolipoproteínas da HDL são apo A-I e apo A-II, embora outras como apo A-IV, apo A-V (PENNACCHIO et al., 2001), apo C-I, apo C-II, apo C-III, apo D, apo E, apo J e apo L (DUCHATEAU et al., 1997) possam estar presentes.

Quando separada por ultracentrifugação, são observadas duas frações principais de HDL: uma chamada de HDL₂, isolada na zona de densidade entre 1,063 e 1,125 g/mL e outra chamada de HDL₃, obtida entre 1,125 e 1,21 g/mL. Quando separada por eletroforese em gel de poliacrilamida, que usa o tamanho e a carga da partícula como base para a separação, a fração da HDL previamente separada por ultracentrifugação pode ser dividida em cinco subfrações distintas (RAINWATER, 1998; RAINWATER et al., 1997; WARNICK; REMALEY, 2001). As subfrações separadas por ordem decrescente de tamanho são a HDL_{2b} (diâmetro médio 10,6 nm), a HDL_{2a} (9,2 nm), a HDL_{3a} (8,4 nm), a HDL_{3b} (8,0 nm) e a HDL_{3c} (7,6 nm). Estas também podem ser identificadas por ressonância magnética nuclear (BARTER et al., 2003; RARDER, 2002). Por último, quando as partículas de HDL plasmáticas são separadas por eletroforese em gel de agarose, ocorrem quatro

bandas de migração denominadas alfa, pré-alfa, pré-beta e gama. As partículas que migram na posição alfa são esféricas e constituem a maior porção. Estas incluem as frações HDL₃ e HDL₂, assim como duas subpopulações, uma compreendendo as partículas contendo apo A-I, mas não apo A-II (HDL A-I) e outra que contém as duas apolipoproteínas (HDL A-I/A-II) (WANG; BRIGGS, 2004; LUND-KATZ et al., 2003). As partículas conhecidas como pré- β_1 HDL são na verdade moléculas de apo A-I ou partículas discóides formadas por uma ou duas moléculas de apo A-I complexada(s) com fosfolípidos e possivelmente uma pequena quantidade de colesterol não esterificado. A fração gama é constituída de partículas que contêm apenas apo E e não apo A-I (BARTER et al., 2003; WARNICK; REMALEY, 2001).

1.3 Funções da HDL

A HDL exerce diversas funções em nosso organismo. É responsável por doar apolipoproteínas para o quilomícron, VLDL e IDL, necessárias ao metabolismo das mesmas (REDGRAVE; MARANHÃO, 1985). Desempenha também papel de transportadora plasmática de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico, incluindo a CETP (MARCEL et al., 1990), a lecitina:colesterol-aciltransferase (LCAT) (FRANCONE; GURAKAR; FIELDING, 1989) e a proteína transportadora de fosfolípidos (PLTP) (TALL; FORESTER; BONGIOVANNI, 1983). Além destas funções, a partícula de HDL possui várias atividades antiaterogênicas, entre as quais destacam-se: antioxidante, antiinflamatória, antitrombótica, manutenção da função endotelial e transporte reverso do colesterol (SVIRIDOV; NESTEL, 2002; RADER,

2002; BARTER et al., 2003; MEYERS; KASHYAP, 2004; CHOI et al., 2006; WANG; BRIGGS, 2004).

A ação antioxidante da HDL se deve ao fato desta partícula reduzir as modificações oxidativas da LDL (FREDENRICH; BAYER, 2003; KONTUSH; CHANTEPIE; CHAPMAN, 2003; MACKNESS; DURRINGTON, 1995). A LDL oxidada, considerada iniciadora do desenvolvimento da aterosclerose (IULIANO, 2001; STEINBERG, 1993), age como fator quimiotático para monócitos que, ao consumirem esta partícula, se transformam em macrófagos cheios de lipídeos (células espumosas). Esses macrófagos modificados, por sua vez, exercem efeitos citotóxicos sobre as células endoteliais, aumentando a ativação de plaquetas, estimulando a migração e a proliferação de células musculares lisas (SMC) e promovendo constrição arterial por diminuir o óxido nítrico, um potente vasodilatador (YLA-HERTTUALA, 1999). A inibição da oxidação da LDL pela HDL é atribuída ao seu conteúdo de antioxidantes (α -tocoferol, licopeno, estrógenos) (BEHRENS; THOMPSON; MADERE, 1982; PERUGINI et al., 2000), às suas apolipoproteínas, que reduzem moléculas indutoras da oxidação de fosfolipídeos (ASSMANN; GOTTO, 2004) e à presença da paraoxonase. A paraoxonase é uma enzima que catalisa a hidrólise de ácidos carboxílicos aromáticos e compostos organofosforados (CANALES; SANCHEZ-MUNIZ, 2003; WATSON et al., 1995; AVIRAM et al., 2000). Caso não degradados estes compostos podem estimular resposta inflamatória e subsequente adesão de monócitos ao endotélio, acelerando o processo de aterosclerose (NAVAB et al., 2001; PASQUALINI et al., 2005). Desse modo, a HDL mostra uma ação antiinflamatória indireta. Esta partícula pode ser também diretamente antiinflamatória por inibir a enzima esfingosina Quinase nas células endoteliais. Esta ação diminui a esfingosina 1-fosfato, molécula chave na mediação

do processo inflamatório, também mediado pelo fator de necrose tumoral (XIA et al., 1999).

Estudos vêm sugerindo que a HDL apresenta ação antitrombótica, ajudando a prevenir o infarto do miocárdio, resultado da oclusão do vaso por trombos após o rompimento da placa aterosclerótica (CHOI et al., 2006). Tais resultados se devem à ação da partícula em si, assim como da apo A-I, presente nesta lipoproteína. Em estudo com homens hipercolesterolêmicos, foi visto que os níveis séricos desta lipoproteína é um preditor da formação de trombos (NAQVI et al., 1999). Em outros estudos, a HDL aumentou a inativação de fatores de coagulação, reduzindo a trombogenicidade (GRIFFIN et al., 1999), estabilizou prostaciclina (PGI₂), as quais previnem a formação de trombos (PIRICH et al., 1997) e diminuiu a atividade pró-coagulante das células vermelhas sanguíneas (EPAND et al., 1994). Além disso, a HDL é antitrombótica por reduzir a oxidação da LDL, evitando a formação desta partícula trombogênica (ROTA et al., 1998; LEE et al., 2005). Por fim, foi comprovado que a apo A-I inibe a formação de trombos em ratos (LI et al., 1999), assim como diminui a atividade pró-coagulante das células vermelhas sanguíneas em humanos (EPAND et al., 1994).

A HDL possui também ação de manutenção da função endotelial (SPIEKER; LISCHER, 2005). A disfunção endotelial é a etapa inicial da aterogênese, iniciando uma cascata de eventos que acelera a formação da placa aterosclerótica. A disfunção leva facilmente o sangue à coagulação, com conseqüente perda de óxido nítrico, o qual causa constrição dos vasos sanguíneos, assim como adesão e migração de leucócitos. A HDL mostra melhora na função endotelial visto que células endoteliais expostas a esta partícula diminuem a expressão de moléculas de adesão, as quais previnem o acúmulo de macrófagos na parede da artéria (CLAY et

al., 2001). Em estudo com homens hipercolesterolêmicos que apresentavam disfunção endotelial e baixa taxa de HDL, a infusão da lipoproteína restabeleceu a função endotelial por melhorar a biodisponibilidade de óxido nítrico (SPIEKER et al., 2002; BISOENDIAL et al., 2003). Somado a esta função, a HDL pode exercer efeito antiapoptótico nas células do endotélio vascular, prevenindo-as de autodestruição (NOFER et al., 2001), o que torna a placa menos vulnerável à ruptura. Desse modo, a HDL pode ajudar a prevenir a iniciação da aterosclerose por melhorar a função endotelial, assim como aumentar a estabilidade da placa em pacientes com doença avançada.

1.3.1 Transporte Reverso do Colesterol

O transporte reverso do colesterol regula a formação, conversão, transformação e degradação da partícula de HDL. Esta troca de lipídeos entre as diferentes classes de lipoproteínas é importante, pois move o excesso de colesterol dos tecidos periféricos para disponibilização no metabolismo ou excreção. Uma variedade de tecidos e moléculas desempenha papéis chave neste processo. O fígado é o sítio primário para formação da HDL nascente sendo, juntamente com outros tecidos periféricos, envolvido na posterior lipidação desta partícula com fosfolipídeos e colesterol. A apo A-I secretada pelo fígado ou intestino se associa com fosfolipídeos e forma uma HDL discoidal que apresenta β mobilidade eletroforética, sendo denominada pré- β HDL ou Apo A-I pobre em lipídeos. Esta forma de HDL está envolvida na remoção de colesterol e fosfolipídeos provenientes dos tecidos periféricos (FIELDING; FIELDING, 1995). O

efluxo de lipídeos das células para a partícula lipoprotéica receptora pode ocorrer por vários mecanismos, incluindo o processo facilitado pelo transportador de membrana (ABCA-I), assim como por difusão aquosa (revisado por YANCEY et al., 2003). Neste processo, os lipídeos das membranas celulares são transferidos para as partículas de pré- β HDL. Além do ABCA-I, outros dois transportadores de membranas (ABCG-1 e ABCG-4) têm recentemente sido classificados como mediadores do efluxo do colesterol celular para HDL, embora não para a apo A-I pobre em lipídeos (WANG et al., 2004). Após o efluxo, o colesterol livre presente na superfície da partícula de HDL é esterificado pela LCAT, esterase sintetizada no fígado e localizada na superfície da HDL (SCHAEFER et al., 1982; EISENBERG, 1984). A apo A-I presente nesta lipoproteína ativa a LCAT, a qual esterifica o colesterol da HDL esférica (HDL₃). Além disso, a lipoproteína continua a receber lipídeos dos tecidos periféricos, aumentando de tamanho (HDL₂). Este processo difere do anterior, pois é mediado pelo SR-B1 ou por difusão passiva, e não pelo ABCA-I (PHILLIPS et al., 1998). A partícula de HDL₂ troca colesterol e triglicerídeos com partículas de LDL e VLDL (MARCEL et al., 1980). Este processo é mediado pela CETP e a extensão da transferência depende da concentração de cada componente lipídico na lipoproteína doadora. O triglicerídeo recebido pela HDL₂ torna-se substrato para a LH a qual converte a HDL₂ novamente em HDL₃, que retorna para o ciclo de remoção tecidual do colesterol (EISENBERG, 1984). Em um segundo mecanismo, a HDL₃ pode receber colesterol livre e fosfolipídeos durante a lipólise da VLDL em um processo mediado pela LLP e facilitado pela PLTP (HUUSKONEN et al., 2001). Desse modo, a troca de lipídeos entre as lipoproteínas é importante, pois move o excesso de colesterol das células periféricas para o fígado para posterior excreção ou reutilização pelo organismo.

Por fim, a degradação da HDL ocorre no fígado iniciada pela captação seletiva do éster de colesterol, processo mediado pelo SR-B1 (ATTIE; KASTELEIN; HAYDEN, 2001). A captação e degradação da partícula envolvem ainda a LH, que hidrolisa os triglicerídeos da partícula, assim como a lipase endotelial, que hidrolisa os fosfolipídeos (MCCOY et al., 2002). Já a apo A-I, originária desta degradação, é reciclada para a formação de nova partícula de HDL. Uma diferente via de degradação da HDL é a depuração renal da apo A-I, mediada pela cubulina, na qual a holopartícula de HDL é endocitada (VON ECKARDSTEIN; NOFER; ASSMANN, 2001; HAMMAD et al., 1999). Em outro caso, o enriquecimento da HDL com éster de colesterol pode levar à formação de partículas maiores, as quais são captadas pelo fígado por meio de receptores celulares específicos que reconhecem a apo E (receptores da LDL) (INNERARITY et al., 1984).

Como resultado do processo descrito acima, a partícula de HDL esterifica o colesterol, movendo esta molécula da superfície ao núcleo da lipoproteína. Esse processo promove a estabilização do “pool” de colesterol plasmático, protegendo a artéria da dissociação do colesterol presente na superfície da lipoproteína.

1.4 Nanoemulsões ricas em colesterol (LDE)

MARANHÃO et al. (1986) realizaram estudos do metabolismo da LDL por meio de uma nanoemulsão lipídica, a LDE, com composição semelhante à fase lipídica da LDL. A massa de LDE é constituída de aproximadamente 66% de

fosfolipídeos, 33% de éster de colesterol e 1% de triglicerídeo, sem a parte protéica da lipoproteína (HIRATA, 1991).

Experimentos para verificar o comportamento da LDE foram conduzidos em indivíduos normolipidêmicos e portadores de hipercolesterolemia, nos quais o acúmulo de colesterol ocorre devido à deficiência nos receptores da LDL. Foi verificado que a remoção da LDE no último grupo era mais lenta do que no grupo de indivíduos normolipidêmicos, confirmando que a mesma poderia ser utilizada como instrumento para investigação das dislipidemias (MARANHÃO et al., 1997). Esse resultado sugere que a LDE é removida pelos receptores de LDL, visto que nesta doença há um defeito em tais receptores (BROWN; GOLDSTEIN, 1986), justificando a lenta remoção da lipoproteína artificial.

Os resultados preliminares de estudos conduzidos em ratos mostraram que a LDE apresentava cinética plasmática semelhante à da LDL natural, sugerindo mais uma vez que estivesse sendo captada pelos mesmos receptores da LDL. A LDE não contém a apo B, no entanto, foi descoberto que é capaz de adquirir outra lipoproteína, a apo E, do plasma (MARANHÃO et al., 1993). É importante ressaltar que a LDL natural não possui apo E, ligando-se ao receptor pela sua única proteína, a apo B-100. Estudos de competição em linfócitos mostraram que a LDL natural compete com a LDE pela captação celular, comprovando que a remoção de ambas se dá pelo mesmo receptor específico (MARANHÃO et al., 1997). No entanto, a LDE tem maior afinidade pelos receptores de LDL do que a LDL natural (HIRATA et al., 1999). A diferença se deve ao fato da apo E, adquirida pela LDE, apresentar maior afinidade pelos receptores do que a apo B-100, presente na LDL natural.

Com base nos achados citados anteriormente, a LDE foi também utilizada em estudos de direcionamento de fármacos. Como grande parte das células neoplásicas apresenta aumento no número de receptores para LDL, a LDE pode ser usada como veículo para o direcionamento de fármacos antineoplásicos a estas células, diminuindo os efeitos colaterais da terapia convencional (MARANHÃO et al., 1994; ADES et al., 2001; MARANHÃO et al., 2002; RODRIGUES et al., 2002; GRAZIANI et al., 2002; VALDUGA et al., 2003; TEIXEIRA; CURI; MARANHÃO, 2004; HUNGRIA et al., 2004; RODRIGUES et al., 2005; AZEVEDO et al., 2005; LO PRETE et al., 2006).

A fim de esclarecer os grandes circuitos envolvidos no transporte dos lipídeos entre as lipoproteínas, neste trabalho a LDE será utilizada como partícula doadora de lipídeos para a HDL.

2. JUSTIFICATIVA

Visto que o transporte reverso e outras funções da HDL dependem de trocas lipídicas que constantemente remodelam a estrutura da lipoproteína, este movimento de lipídeos recebidos e doados pela HDL é possivelmente importante para a manutenção da estrutura, estabilidade e função da partícula (NORATA; PIRILLO; CATAPANO, 2006; FERRETTI et al., 2006),

Diante disso, o presente trabalho foi projetado para estabelecer um método prático capaz de quantificar a habilidade simultânea desta lipoproteína em receber seus principais constituintes lipídicos, sendo eles: fosfolípideo, colesterol livre, éster de colesterol e triglicerídeo. O método utiliza a LDE como estrutura doadora de lipídeos radioativos à partícula de HDL, mimetizando a troca de lipídeos entre as lipoproteínas. Desse modo, é possível avaliar esta funcionalidade da HDL com praticidade. No caso do uso da LDL natural com esta mesma finalidade, a lipoproteína deve ser isolada do indivíduo, marcada e reincubada com o plasma do mesmo indivíduo. Além disso, a LDE oferece facilidades operacionais que torna muito mais fácil a avaliação de uma das vias do transporte reverso do colesterol, permitindo a avaliação de um grande número de indivíduos com a mesma preparação.

Após desenvolvimento, foi necessária a padronização do método, avaliando possíveis interferentes e estabelecendo as condições ideais para realização do mesmo. Por fim, viu-se necessária a verificação da aplicabilidade do método por meio da determinação da transferência dos quatro lipídios em indivíduos saudáveis.

3. OBJETIVOS

- ✓ Determinar “in vitro” possíveis interferentes na técnica, objetivando otimização do processo de transferência de lipídeos para a partícula de HDL;
- ✓ Padronizar o método de análise da capacidade da HDL de receber fosfolipídeo, colesterol livre, éster de colesterol e triglicerídeo de uma lipoproteína artificial (LDE);
- ✓ Avaliar a aplicabilidade do método por meio do estudo da capacidade receptora de lipídeos da HDL, em indivíduos saudáveis.

4. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Os lipídeos trioleína, oleato de colesterol e colesterol, utilizados na produção das nanoemulsões a partir de soluções-estoque, foram adquiridos da Nu-Check Prep. Elisian, EUA. A fosfatidilcolina foi obtida da Lipid Products (Surrey, Inglaterra).

Toda a vidraria utilizada durante os experimentos foi submetida à esterilização à seco (estufa à 180°C, por 1 h e 30 min) e à vapor (autoclavagem a 120 °C, 1 atm, 20 min), procedimento realizado pelo Setor de Esterilização do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Incor-HC-FMUSP).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo da LDE

A nanoemulsão LDE foi preparada segundo a técnica descrita 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 livre (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), dissolvidos em clorofórmio-etanol (2:1, v/v). Posteriormente, foram adicionados 70KBq de 3H-éster de colesterol e 70KBq de 14C-fosfatidilcolina ou 70KBq de 3H-triglicerídeos e 70KBq de 14C-colesterol

(Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Após adição dos lipídeos radioativos, as misturas foram secas sob fluxo de nitrogênio, em banho de água (37°C) e mantidas em dessecador a vácuo, por 16h, a 4°C, para a remoção total dos solventes residuais. Ao final desse período, foram adicionados à mistura dessecada, 10 mL de tampão TRIS-HCl 0,01 M, pH 8,0. Em seguida, a suspensão de lipídios foi emulsificada por irradiação ultrassônica durante 3h, sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando entre 51 e 55°C, nas quais os componentes estão em estado de transição cristal-liquído. A irradiação ultrassônica foi realizada com potência de 125 watts, em modo contínuo de operação, por um disruptor de células (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, EUA), equipado com ponta de titânio de 1 cm de diâmetro.

Ao término da irradiação ultrassônica, as nanoemulsões foram purificadas por ultracentrifugação (Ultracentrifuga Sorvall, modelo OTD Comb, Wilmington, EUA), durante 30 min, a 35.000 rpm, em temperatura de 4°C. O sobrenadante da solução (1,0 mL), contendo partículas que flutam em densidade 1,006 g/mL, foi retirado e descartado. Após adição de brometo de potássio sólido para ajustar a densidade em 1,210 g/mL, o volume restante foi submetido à nova ultracentrifugação em rotação de 35.000 rpm, durante 2h, a 4°C. Foram removidos 2,0 mL do sobrenadante, os quais contêm a fração das partículas de tamanho e composição desejados.

A nanoemulsão purificada foi dialisada por 16h, a 4°C, para a total remoção dos sais de brometo de potássio utilizados na etapa final de purificação. Nesta etapa foram utilizados 4,0 mL de tampão estéril TRIS-HCl 0,01 M, pH 8, e saco de diálise Spectrapor 6 (Spectrum Medical Ind., Los Angeles, EUA). A

nanoemulsão purificada foi submetida à esterilização por filtração, utilizando-se filtros com poros de 0,2 μ de diâmetro (Millipore, São Paulo, SP).

Para evitar contaminação por microorganismos, todo o procedimento de preparo das nanoemulsões foi realizado em câmara de fluxo laminar vertical. As nanoemulsões 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.

4.2.2 Transferência de fosfolípídeo, colesterol livre, éster de colesterol e triglicerídeo da LDE para a HDL

Amostras de sangue dos voluntários foram coletadas, após jejum de 12 h, em tubo contendo anticoagulante EDTA (1,5 g/L). O plasma foi obtido após 10 min de centrifugação, a 3.000 rpm, em centrífuga Sorval RT7. Foram incubados 50 μ L da LDE marcada radioativamente com ^3H -éster de colesterol e ^{14}C -fosfatidilcolina ou ^3H -triglicerídeos e ^{14}C -colesterol livre com 200 μ L de plasma. A incubação ocorreu por 60 min, 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 min a 3.000 rpm. A fração HDL foi obtida após precipitação da nanoemulsão juntamente com as lipoproteínas contendo apo B. Alíquotas de 250 μ L do sobrenadante, contendo a fração HDL, foram pipetadas em frascos de

cintilação. Foram acrescentados a esses frascos, 5,0 mL de solução cintiladora Ultima Gold (PerkinElmer, Boston, USA). 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, realizado para eliminação de possíveis interferentes no ensaio, consiste da mistura de 200 μL de solução tampão TRIS-HCl (pH 7,4) e 50 μL de LDE, incubada e precipitada nas mesmas condições descritas anteriormente. O valor de radioatividade total presente na amostra foi determinado pela incubação de 200 μL de plasma com 50 μL 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.

4.2.3 Transferência de lipídeos da LDE para HDL sob diferentes condições

A transferência dos lipídeos da LDE para HDL foi analisada sob diferentes condições de temperatura, pH, tempo de incubação, concentração de albumina e concentração de HDL-Colesterol.

4.2.3.1 Temperatura

O ensaio de transferência dos lipídeos da LDE para a HDL foi realizado sob diferentes temperaturas. A mistura de plasma e LDE foi incubada por

1h em agitador orbital sob temperaturas de 4, 25, 37 e 40°C. Após incubação, foi feita a precipitação das lipoproteínas contendo apo B para obtenção da fração HDL. O sobrenadante contendo a fração HDL foi adicionado à solução cintiladora para contagem da radioatividade transferida para a lipoproteína. Para cada temperatura foram realizadas 5 alíquotas.

4.2.3.2 pH

O efeito do pH plasmático na transferência de lipídeos da nanoemulsão para a HDL foi avaliado variando-se o pH da amostra em 6,5; 7,0; 7,4; 8,0 e 8,5. Esta variação foi obtida pela adição de solução de HCL, para acidificar a amostra, ou NaOH, para alcalinizar. Alíquotas de plasma nos valores de pH pré-estabelecidos foram incubadas com a LDE por 1h a 37°C. Após incubação, seguiu-se a fase de precipitação das demais lipoproteínas e posterior contagem da radioatividade presente na HDL, como descrito anteriormente. Para todos os pH plasmáticos, foram realizadas 5 alíquotas.

4.2.3.3 Tempo de incubação

Para testar esta variável, o ensaio de transferência de lipídeos foi realizado sob diferentes períodos de incubação. O plasma foi incubado com a LDE em agitador orbital a 37°C por 5, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 min. Após cada período de incubação, foi acrescentada à mistura, solução precipitante para

obtenção da fração HDL. O sobrenadante, contendo a HDL, foi adicionado à solução cintiladora para contagem dos lipídeos radioativos. Os resultados de todas as temperaturas correspondem à média de 5 alíquotas.

4.2.3.4 Concentração de albumina

O efeito da concentração de albumina no ensaio de transferência de lipídeos foi testado em mesma amostra de plasma de concentrações de albumina que variaram em 3,50; 3,68; 4,06; 4,55; 5,08; 5,60 e 7,00 g/dL. Esta variação foi obtida pela adição de concentrações crescentes de albumina bovina à amostra. Das soluções finais, foram retirados 200 μ L para serem incubados com a LDE, seguindo o protocolo do ensaio. O resultado corresponde à média de 5 alíquotas para cada concentração.

4.2.3.5 Concentração de HDL-Colesterol

O efeito da concentração do colesterol presente na partícula de HDL na transferência de lipídeos foi avaliado em mesma amostra de plasma de diferentes concentrações de HDL-Colesterol. Esta variação foi obtida pela adição de concentrações crescentes de HDL da mesma amostra de plasma. Para obtenção da fração HDL, primeiramente o plasma teve sua densidade ajustada com solução de KBr para 1,063 g/mL e foi ultracentrifugado por 24h a 40.000 rpm. Em seguida, a densidade do plasma foi reajustada para 1,21 g/mL e este foi ultracentrifugado

novamente, por 38h a 40.000 rpm. A fração HDL foi adicionada ao plasma resultando em amostras de concentrações de HDL-Colesterol de 33, 47, 84, 100, 133, 185 e 244 mg/dL. Após obtenção das amostras com diferentes concentrações, 200µL destas soluções finais foram utilizados no ensaio de transferência de lipídeos. O resultado de cada concentração representa a média de 5 alíquotas.

4.2.4 Tempo de armazenamento da amostra

Foi avaliada a interferência do período de armazenamento do plasma na transferência de lipídeos da LDE para a fração HDL. Durante o período de 12 meses, o ensaio de transferência de lipídeos foi realizado em diferentes dias, utilizando-se diferentes nanoemulsões e mesma amostra de plasma, armazenada em freezer a -80°C.

4.2.5 Tempo de armazenamento da LDE

Foi avaliada a interferência do período de armazenamento da nanoemulsão, estocada a 4°C, na transferência de lipídeos da LDE para a fração HDL. Durante o período de 30 dias, foram realizados diferentes ensaios de transferência de lipídeos de uma amostra de plasma incubada com uma mesma nanoemulsão.

4.2.6 Validação Intra- e inter-ensaio

O método de transferência de lipídeos da LDE para a partícula de HDL teve sua precisão intra- e inter-ensaio determinadas de acordo com o *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos* (2003). A imprecisão *intra*-ensaio foi determinada pela média de 3 ensaios, realizados no mesmo dia, pelo mesmo analista. Em cada ensaio, foi verificada a variação na transferência de lipídeos ocorrida entre 10 alíquotas de mesma amostra de plasma. A imprecisão *inter*-ensaio foi calculada baseada em 3 ensaios de 10 amostras cada, realizados em 3 dias diferentes, realizados com intervalos de 1 semana, por diferentes analistas. O resultado de ambas as análises foi expresso como o coeficiente de variação encontrado. De acordo com o guia utilizado, coeficientes de variação inferiores a 5% conferem precisão ao método analisado.

4.2.7 Casuística

Foram estudados 53 voluntários (38 ± 11 anos), de ambos os sexos (28 homens e 25 mulheres), normolipidêmicos, não diabéticos, normotensos, sedentários, não tabagistas e que não faziam uso freqüente de bebida alcoólica (características físicas e dados bioquímicos, ver Anexo A). Critérios laboratoriais de exclusão: colesterol total <200 mg/dL; LDL-C <130 mg/dL; HDL-C >40 mg/dL; TG <150 mg/dL; Glicose <110 mg/dL. Com base nos critérios estabelecidos, os

voluntários foram selecionados do banco de dados do Laboratório de Metabolismo de Lipídeos do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-HC-FM-USP). Todos os participantes assinaram termo de consentimento pós-informado e passaram a fazer parte deste estudo, o qual faz parte do Protocolo de Pesquisa (637/04) analisado e aprovado, em 24/07/2004, pela Comissão de Ética em Pesquisas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FM-USP).

4.2.8 Determinações bioquímicas séricas

Foi coletado sangue em tubo seco (soro) e tubo contendo anticoagulante EDTA (plasma), de todos os participantes após jejum de 12h. Foram realizadas em amostras de soro as seguintes determinações bioquímicas: colesterol total e frações (VLDL, LDL e HDL), triglicerídeos 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 triglicerídeo e a glicose foram determinados por método colorimétrico-enzimático automatizado, com kit comercial Labtest (Labtest, Santa Lagoa, MG, Brasil).

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 400 mg/dL (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972).

4.2.9 Tamanho da HDL

O tamanho da partícula de HDL foi mensurado segundo a técnica descrita por Lima e Maranhão (2004). Amostras de sangue dos pacientes foram coletadas após jejum de 12 h, em tubo contendo EDTA. O plasma foi obtido após 10 min de centrifugação, a 3.000 rpm, em centrífuga Sorval RT7. A fração HDL foi obtida do plasma por precipitação química das frações contendo apo B (VLDL, LDL), utilizando-se solução de polietilenoglicol (PEG) 8000 (400 g/L), na proporção plasma/precipitante, 1:1 (v/v). O sobrenadante, contendo a fração HDL, foi diluído em solução de NaCl 10 mmol/L e filtrado através de filtro millipore® 0,22 µm. O diâmetro da HDL (nm) foi obtido por espalhamento de luz, coletada em ângulo de 90°, utilizando o equipamento *Laser Light Scattering* (ZetaPALMS, Brookhaven Instr. Corp., USA) e o software *Big Particle Sizing*, versão 2.34 (Brookhaven Instr. Corp., Holtsville, NY, USA). Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão obtido após 10 leituras de 1 minuto cada.

4.2.10 Análise estatística

Na análise dos dados de comparação de dois grupos, foi utilizado o teste “t”, quando os dados se apresentavam de forma Gauseana (paramétricos) e o teste Mann-Whithney quando os dados não mostraram comportamento Gauseano

(não paramétricos). Quando comparados três ou mais grupos com distribuição não paramétrica foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer.

A análise de correlação entre as taxas de transferência dos lipídeos para a HDL e os demais parâmetros analisados foi feita pelo teste de Pearson ou de Sperman dependendo da distribuição da amostra.

No ensaio de precisão, os resultados foram expressos como o coeficiente de variação encontrado entre as amostras. Os resultados para os demais ensaios foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, considerando como nível crítico para significância valores $<0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito da temperatura

A elevação da temperatura de 4 a 40°C resultou em progressivo aumento na transferência de todos os lipídeos no intervalo de 4 a 37°C, quando um platô foi alcançado (Figura 1). Entre 4 e 37°C, houve correlação positiva entre a temperatura e a transferência de fosfolipídeo ($p<0,0001$, $r=0,9732$), colesterol livre ($p<0,0001$, $r=0,9832$), éster de colesterol ($p<0,0001$, $r=0,9620$) e triglicerídeo ($p<0,0001$, $r=0,9546$).

Figura 1. Efeito do aumento da temperatura na transferência de fosfolipídeo (●), colesterol livre (○), éster de colesterol (■) e triglicerídeo (◻) da LDE para a HDL (n= 5 alíquotas, valores expressos em média $\pm$ desvio padrão).

5.2 Efeito do pH

O aumento do pH da amostra de plasma de 6,5 a 8,5 não afetou a transferência dos quatro lipídeos da LDE para a HDL (Figura 2).

Figura 2. Efeito da variação do pH plasmático de 6,5 a 8,5 na transferência de fosfolípido (●), colesterol livre (○), éster de colesterol (■) e triglicerídeo (◊) da LDE para a HDL (n=5 alíquotas; valores expressos em média ± desvio padrão).

5.3 Efeito do tempo de incubação

O aumento do tempo de incubação de 5min a 1h resultou em aumento na transferência de fosfolípídeo ($p=0,0001$), colesterol livre ($p<0,0001$), éster de colesterol ($p=0,0002$) e triglicerídeo ($p<0,0001$). No entanto, o aumento na transferência foi menos pronunciado no intervalo de 1 a 2h, tendendo a se estabilizar entre 2 a 3h de incubação (Figura 3).

Figura 3. Efeito do aumento do tempo de incubação na transferência de fosfolípídeo (●), colesterol livre (○), éster de colesterol (■) e triglicerídeo (◻) da LDE para a HDL (n= 5 alíquotas; valores expressos em média $\pm$ desvio padrão).

5.4 Efeito da albumina.

A variação da concentração de albumina na amostra de plasma de 3,50 a 7,00 g/dL não alterou a transferência dos quatro lipídeos da LDE para a HDL (Figura 4).

Figura 4. Efeito do aumento da concentração de albumina na transferência de fosfolípido (●), colesterol livre (○), éster de colesterol (■) e triglicerídeo (◊) da LDE para a HDL (n= 5 alíquotas, valores expressos em média $\pm$ desvio padrão).

5.5 Efeito da HDL-Colesterol

O aumento da concentração de colesterol de HDL de 33 a 244 mg/dL aumentou a transferência de todos os lipídeos (Figura 5). Foram encontradas correlações positivas entre HDL-C e as taxas de transferência de fosfolípídeo ($p<0,0001$, $r=0,9201$), colesterol livre ($p<0,0001$, $r=0,9909$), éster de colesterol ($p<0,0001$, $r=0,9912$) e triglicerídeo ($p<0,0001$, $r=0,9909$).

Figura 5. Efeito do aumento de HDL-colesterol na transferência de fosfolípídeo (●), colesterol livre (○), éster de colesterol (■) e triglicerídeo (◊) da LDE para a HDL (n= 5 alíquotas, valores expressos em média $\pm$ desvio padrão).

5.6 Efeito do tempo de armazenamento da amostra

O armazenamento da amostra de plasma a -80°C por período de até 12 meses não alterou os resultados de transferência dos lipídeos ($p>0,05$).

5.7 Efeito do tempo de armazenamento da LDE

O armazenamento da LDE a 4°C por até 15 dias após sua produção não afetou o resultado da transferência dos quatro lipídeos para a HDL ($p>0,2$). No entanto, no dia 30 houve diferença nos valores de transferência quando comparados aos do dia 0, 1 e 15 ($p<0,05$ para as quatro comparações).

5.8 Validação *Intra-* e *inter*-ensaio

A análise da precisão *intra*-ensaio apresentou coeficientes de variação para os valores de transferências de fosfolípídeo, colesterol livre, éster de colesterol e triglicerídeo de 0,83, 0,56, 1,49 e 0,51%, respectivamente. Ao analisar a precisão *inter*-ensaio, as taxas de transferências de fosfolípídeo, colesterol livre, éster de colesterol e triglicerídeo apresentaram coeficientes de variação de 0,78, 0,59, 1,32 e 0,58%, respectivamente.

5.9 Tamanho da partícula de HDL e transferência de fosfolípido, colesterol livre, éster de colesterol e triglicerídeo da LDE para a HDL, em indivíduos saudáveis

O tamanho de partícula de HDL dos 53 indivíduos participantes foi de $9,1 \pm 1,0$ nm.

A média da transferência de fosfolípido, colesterol livre, éster de colesterol e triglicerídeo da LDE para a HDL dos indivíduos participantes foi de $25,5 \pm 2,6\%$, $9,9 \pm 1,6\%$, $4,8 \pm 1,3\%$ e $6,9 \pm 1,1\%$, respectivamente.

Foram feitas análises de correlação entre as transferências dos lipídeos e as características físicas e laboratoriais dos participantes.

As transferências de éster de colesterol, triglicerídeo e colesterol livre se correlacionaram positivamente entre estes lipídeos (Figura 6A, 6B e 6C). No entanto, a transferência de fosfolípido só apresentou correlação com a transferência de triglicerídeo, sendo esta uma correlação positiva (Figura 6D).

Foi encontrada correlação positiva entre a transferência de colesterol livre e a concentração de colesterol de HDL (Figura 7). Com relação aos outros lipídeos e outras determinações, não foram encontradas correlações destes com a transferência dos quatro lipídeos.

A **B**

Figura 6. Correlação entre as taxas das transferências de éster de colesterol e triglicerídeo (A), éster de colesterol e colesterol livre (B), triglicerídeo e colesterol livre (C) e fosfolípídeo e triglicerídeo (D) (n=53 indivíduos; A: $p=0,0041$, $r=0,3883$; B: $p=0,0005$, $r=0,4629$; C: $p<0,0001$, $r=0,5974$; D: $p=0,0015$, $r=0,4254$) – (Continua).

C

D

Figura 6. Correlação entre as taxas das transferências de éster de colesterol e triglicerídeo (A), éster de colesterol e colesterol livre (B), triglicerídeo e colesterol livre (C) e fosfolípídeo e triglicerídeo (D) (n=53 indivíduos; A: $p=0,0041$, $r=0,3883$; B: $p=0,0005$, $r=0,4629$; C: $p<0,0001$, $r=0,5974$; D: $p=0,0015$, $r=0,4254$) – (conclusão).

Figura 7. Correlação entre a taxa da transferência de colesterol livre e a concentração de colesterol de HDL (n=53 indivíduos; $p=0,0305$, $r=0,3468$).

6. DISCUSSÃO

A composição das lipoproteínas plasmáticas é constantemente modificada durante seus metabolismos intravasculares, como resultado da dinâmica troca de lipídeos e proteínas entre as partículas e a troca de lipídeos entre partículas e células.

Ao analisar o metabolismo das lipoproteínas, não se deve levar em consideração somente a concentração de colesterol da partícula, mas também a composição, o tamanho e a capacidade de transferir lipídeos com outras lipoproteínas.

Muitos estudos têm mostrado “in vivo” (NUNES et al., 2001; SCHWARTZ; VANDENBROEK; COOPER, 2004) e “in vitro” (CRAIG et al., 1982; LASSEL et al., 1999; LALANNE; PONSIN, 2000; MEDINA et al., 2000; NUNES et al., 2001) a transferência de lipídeos entre as lipoproteínas. No plasma, a classe de lipoproteína que é a mais afetada pela transferência de lipídeos é a HDL. No entanto, não há na literatura estudo que enfoque a capacidade da HDL em receber de outra lipoproteína, simultaneamente, colesterol em sua forma livre e esterificada, fosfolípídeo e triglicerídeo.

A HDL desempenha papel de transportadora plasmática de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico e apresenta várias atividades antiaterogênicas. Entre estas atividades podemos destacar a antioxidante, a antiinflamatória, a de manutenção da função endotelial (SVIRIDOV; NESTEL, 2002; RADER, 2002; BARTER et al., 2003; MEYERS; KASHYAP, 2004; CHOI et al., 2006) e a de transporte reverso do colesterol (WANG; BRIGGS, 2004; HERSBERGER; VON ECKARDSTEIN, 2005; MAHLEY; HUANG; WEISGRABER, 2006; LEWIS, 2006).

Esta última função faz da HDL uma partícula chave no transporte de lipídeos no plasma, o que estimulou o estudo da sua capacidade receptora de lipídeos das demais lipoproteínas plasmáticas. Desse modo, este trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver um método rápido e prático para avaliar, *in vitro*, esta capacidade da HDL, usando como modelo de estudo uma nanoemulsão artificial semelhante como doadora de lipídeos.

Para a padronização deste método, foram analisadas no presente estudo, as possíveis variáveis no ensaio de transferência de lipídeos da LDE para a HDL.

Inicialmente, foi avaliada a interferência da temperatura de incubação da LDE com a amostra de plasma. Foi verificado aumento da transferência dos quatro lipídeos para a HDL em decorrência do aumento de temperatura no intervalo de 4 a 37°C. Este resultado pode ser explicado pela alteração na conformação dos lipídeos em diferentes temperaturas. Desse modo, com o aumento da temperatura, os lipídeos apresentam conformações com maior fluidez, facilitando sua transferência (CHIU et al., 1995). Outro fator que pode explicar este resultado é o aumento de choques entre as partículas, resultantes do maior movimento das mesmas quando expostas a temperaturas mais elevadas. No entanto, após 37°C, embora tenha havido aumento das transferências de lipídeos, estas ocorreram em menores proporções. É provável que este fenômeno tenha ocorrido devido ao início do processo de denaturação das proteínas de transferência de lipídeos, como é o caso da PLTP, que alcança sua totalidade de denaturação aos 57°C (LALANNE; PONSIN, 2000). Por outro lado, embora em baixos valores, a transferência de lipídeos ocorreu desde os 4°C. Este resultado foi também observado em outros

estudos, nos quais houve transferência de fosfolípidos entre lipoproteínas a 4°C (LALANNE; PONSIN, 2000) e a 0° (EISENBERG, 1978).

Em seguida, foi realizada a análise do efeito da variação do pH do plasma na transferência dos lípidos da LDE para a HDL. Como resultado, foi visto que a variação do pH plasmático entre 6,5 e 8,5 não alterou a transferência dos quatro lípidos da LDE para a HDL. Resultado semelhante foi encontrado em estudo no qual a transferência de éster de colesterol entre as partículas de HDL e VLDL não foi alterada pela variação do pH plasmático de 5,5 a 9,0 (SAMMETT; TALL, 1984). Em outro estudo, a atividade da PLTP, proteína responsável pela transferência de fosfolípido, não sofreu alteração na faixa de pH que variou de 6,5 a 9,0. Como resultado, não foi verificada diferença na transferência de fosfolípidos entre lipossoma e HDL com a variação do pH plasmático (DESRUMAUX et al., 1998). Desse modo, os resultados encontrados no presente estudo condizem com a literatura e, com relação à ação das proteínas de transferência, podem ser explicados pela ampla faixa de pH em que muitas proteínas se mantêm estáveis (SOARES; FERREIRA, 2004).

Ao analisar o efeito do tempo de incubação da HDL com a LDE na transferência dos lípidos para a partícula de HDL, foi verificado que a transferência de todos os lípidos aumenta com a progressão do tempo de incubação, tendendo a se estabilizar no período de 2 a 3h. Tall et al. (1983) observaram correlação positiva do tempo de incubação com a transferência de fosfolípidos entre vesículas unilamelares e HDL. Também foi encontrada essa relação positiva entre o tempo de incubação e transferência de lípidos em estudo com quilomícrons incubados com LDL. Nesse estudo, foi observado progressivo aumento na transferência do éster de

colesterol, marcado radioativamente, em paralelo ao aumento do tempo de incubação (LASSEL et al., 1999). Pode-se sugerir que estes resultados se devam ao aumento do tempo em que as partículas permanecem em contato, promovendo maior troca lipídica tanto por choques quanto por proteínas de transferência. No presente estudo, o platô alcançado entre 2 e 3h provavelmente se deve a um estado de equilíbrio na concentração dos lipídeos entre as lipoproteínas, doadora e receptora. No entanto, o tempo de incubação de 1h foi escolhido para poder avaliar todos os lipídeos em um único ensaio, evitando a superestimação nos valores de transferência ocorrido entre as lipoproteínas expostas a um maior período de contato (NUNES et al., 2001).

Outro interferente analisado foi a concentração de albumina presente na amostra de plasma. A adição de quantidades crescentes desta proteína no plasma não alterou a transferência dos quatro lipídeos da LDE para a HDL. A albumina desempenha grande papel de transportadora de ácidos graxos livres, resultantes da lipólise de triglicerídeos do tecido adiposo ou da ação da lipase lipoprotéica no metabolismo das lipoproteínas ricas em triglicerídeos (HANKINS, 2006). No entanto, a ausência de alterações da transferência de lipídeos na presença de diferentes concentrações de albumina foi também verificada em outros estudos (SPARKS; PRITCHARD, 1989; LAGROST et al., 1995). Estes resultados indicam que esta proteína não exerce importante função na transferência dos lipídeos avaliados entre lipoproteínas. Neste caso, o choque entre as partículas e a atividade de proteínas específicas de transferência, CETP e PLTP, seriam os principais responsáveis por esta troca.

É sabido que a concentração tanto da lipoproteína doadora, quanto da receptora, influencia a taxa de transferência de lipídeos (GROENER; KOSTNER, 1987; KMAN; LUNDBERG, 1987; MANN et al., 1991; BAGDADE; RITTER; SUBBAIAH, 1991; GUERIN; DOLPHIN; CHAPMAN, 1994; GUERIN et al., 1995). Assim, o acréscimo de HDL-Colesterol aumentou a transferência dos lipídeos da LDE para a HDL por aumentar a proporção de partículas receptoras em relação as partículas doadoras, deslocando para a HDL, lipídeos que possivelmente seriam recebidos por outras lipoproteínas.

Outra análise deste estudo se refere ao tempo de estocagem da amostra de plasma e da nanoemulsão. A amostra de plasma mostrou ser inalterada para este ensaio por período de 12 meses, não tendo sido realizadas análises com data posterior a este período. A escolha do período de estocagem por 12 meses foi baseada no tempo de estabilidade das amostras para a determinação de HDL-Colesterol. Para essa determinação, é estabelecido que o plasma estocado a -80°C é seguramente estável por um ano (Recommendations on Lipoprotein Measurement from the Working Group on Lipoprotein Measurement, 1995) podendo, após esse período, ocorrer decréscimo na concentração de HDL. No presente trabalho, foi observado que as taxas de transferência dos lipídeos variam de acordo com a concentração de HDL-Colesterol. Desse modo, não seria indicado utilizar uma amostra que possa ter sofrido decréscimo na concentração dessa lipoproteína. Portanto, ao se realizar o ensaio após 12 meses de estocagem os resultados de transferência poderiam ser subestimados. Com relação à LDE, a nanoemulsão mostrou estabilidade para o ensaio de transferência de lipídeos para a HDL por até 15 dias. Após este período, os resultados de transferência não se mantiveram

reprodutíveis para o ensaio. Este resultado se deve a não utilização de conservantes e antioxidantes durante a preparação da nanoemulsão, uma vez que neste momento do estudo não foi objetivada a produção industrial desta lipoproteína artificial.

Após análise das possíveis variáveis no ensaio, foi realizada a determinação da precisão do método, por meio da avaliação das variações intra- e inter-ensaio. Nas duas análises, os coeficientes de variação encontrados foram menores que 5%, valor máximo aceitável para métodos analíticos segundo o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (2003), indicando precisão da metodologia desenvolvida.

Para avaliar a aplicabilidade da técnica descrita no presente estudo, foi realizada neste trabalho, a transferência de lipídeos em 53 indivíduos saudáveis. Com base nos resultados encontrados, foi feita a análise de correlação entre as taxas de transferência de lipídeos e as características físicas e dados laboratoriais dos participantes.

A correlação positiva encontrada entre as taxas de transferência de colesterol livre e de triglicerídeo pode representar a principal função da HDL no transporte reverso de colesterol. A HDL tem a função de captar colesterol na forma livre, esterificar este lipídeo pela ação da LCAT, e trocá-lo por triglicerídeos com as demais lipoproteínas plasmáticas (EISENBERG, 1984). Com isso, é sugerido que quanto mais colesterol livre é captado pela HDL, mais éster de colesterol é gerado e transferido às lipoproteínas ricas em triglicerídeos, as quais, em troca deste colesterol, transferem mais triglicerídeos à partícula de HDL.

Foi encontrada neste estudo correlação positiva entre as taxas de transferência de éster de colesterol e de triglicerídeos. Por se tratar de lipídeos

hidrofóbicos, ambos necessitam da presença de proteínas especializadas para se transportar entre as lipoproteínas. Visto que ambos são transportados pela mesma proteína de transferência, a CETP (STEIN; STEIN, 2005), apenas em sentidos opostos, estes lipídeos obedecem à mesma relação de transferência.

Outra correlação positiva encontrada foi entre as taxas de transferência de colesterol livre e de éster de colesterol. Este resultado pode ser atribuído ao fato de que a CETP, além de promover a troca de éster de colesterol por triglicerídeo, pode também promover a troca de éster de colesterol por outra partícula de éster de colesterol (RAJARAM; CHAN; SAWYER, 1994). Desse modo, ao receber colesterol livre, a partícula de HDL esterifica este lipídeo e o transfere para as demais lipoproteínas, recebendo em troca não somente triglicerídeo, mas também éster de colesterol.

Com relação as taxas de transferência de fosfolipídeo e triglicerídeo, os resultados mostraram haver correlação positiva entre elas. Embora se trate de um lipídeo de núcleo e outro de superfície, ambos obedecem a uma correlação positiva, visto que a superfície da partícula de HDL, predominantemente composta por fosfolipídeo, é proporcional ao tamanho do núcleo.

Correlação positiva foi também encontrada entre a taxa de transferência de colesterol livre e a concentração de HDL-Colesterol. Este resultado pode ser explicado em virtude do conteúdo de colesterol existente na HDL corresponder, em sua maioria, a moléculas de éster de colesterol, provenientes do processo de esterificação do colesterol livre captado pela lipoproteína.

De acordo com os resultados apresentados, é possível avaliar a capacidade da HDL em receber lipídios de outras lipoproteínas e o envolvimento deste mecanismo com diversas patologias.

7. CONCLUSÕES

- ✓ Variações de temperatura, tempo de incubação e concentração de HDL-C aumentam a transferência de lipídeos para a HDL, enquanto que variações de pH e concentração de albumina não resultam em alteração da transferência;
- ✓ O método de transferência de lipídeos para a partícula de HDL é preciso;
- ✓ Dentro das condições estabelecidas no presente trabalho, o método é aplicável para a análise da capacidade da HDL de receber lipídios de outras lipoproteínas;

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.**, São Paulo, v. 82, n. 1, p. 84-87, jul. 2001.

ALAUPOVIC P.; LEE, D. M.; MCCONATHY, W. J. Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins. Distribution of lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, Oklahoma, v. 260, n. 4, p. 689-707, abril 1972.

ASSMANN JR, G.; GOTTO, A. M. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. **Circulation**, Munster, v. 109, n. 23, p. 1118-1114, jun. 2004.

ATTIE, A. D.; KASTELEIN, J.; HAYDEN, M. R. Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. **J. Lipid Res.**, Madison, v. 42, n. 11, p. 1717-1726, nov. 2001.

AVIRAM, M.; HARDAK, E.; VAYA, J.; MAHMOOD, S.; MILO, S.; HOFFMAN, A.; BILLICKE, S.; DRAGANOV, D.; ROSENBLAT, M. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. **Circulation**, Haifa, v. 101, n. 21, p. 2510-2517, maio 2000.

AYRAULT-JARRIER, M.; ALIX, J. F.; POLONOVSKI, J. A new protein from human plasma lipoproteins: isolation and partial characterization of apolipoprotein G. **Biochimie**, Paris, v. 60, n. 1, p. 65-70, 1978.

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.**, São Paulo, v. 97, n. 1, p. 178-182, abril 2005.

BAGDADE, J.D.; RITTER, M.C.; SUBBAIAH, P.V. Accelerated cholesteryl ester transfer in plasma of patients with hypercholesterolemia. **J. Clin. Invest.**, Chicago, v. 87, n. 4, p. 1259-1265, abril 1991.

BARTER, P.; KASTELEIN, J.; NUNN, A.; HOBBS, R. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. **Atherosclerosis**, Adelaide, v. 168, n. 2, p. 195-211, jun. 2003.

BEHRENS, W. A.; THOMPSON, J. N.; MADERE, R.. Distribution of alpha-tocopherol in human plasma lipoproteins. **Am. J. Clin. Nutr.**, Ottawa, v. 35, n. 4, p. 691-696, abril 1982.

BISOENDIAL, R. J.; HOVINGH, G. K.; LEVELS, J. H.; LERCH, P. G.; ANDRESEN, I.; HAYDEN, M. R.; KASTELEIN, J. J.; STROES, E. S. Restoration of endothelial function by increasing high-density lipoprotein in subjects with isolated low high-density lipoprotein. **Circulation**, Amsterdam, v. 107, n. 23, p. 2944 -2948, jun. 2003.

BORENSZTAJN, J.; GETZ, G. S.; KOTLAR, T. J. Uptake of chylomicron remnants by the liver: further evidence for modulation role of phospholipids. **J. Lipid Res.**, Chicago, v. 29, p. 1087-96, ago. 1988.

BORRESEN, A. L.; BERG, K. Serum reserve cholesterol binding capacity (SRCBC): the relative importance of different lipoprotein classes. **Artery**, Montebello, v. 9, n. 2, p. 96-119, set. 1981.

BREWER JR, H. B.; FAIRWELL, T.; LARUE, A.; RONAN, R.; HOUSER, A.; BRONZERT, T. J. The amino acid sequence of human apo A-I, an apolipoprotein isolated from high density lipoproteins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Bethesda-MD, v. 80, n. 3, p. 623-630, 1978.

BROWN, W. V.; BAGINSKY, M. L. Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Atlanta, v. 46, n. 2, p. 375-382, jan. 1972.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, Dallas, v. 232, n. 4746, p. 34-47, abril 1986.

BROWN, M. S.; KOVANEN, P. T.; GOLDSTEIN, J. L. Regulation of plasma cholesterol by lipoproteins receptors. **Science**, Dallas, v. 212, n. 4495, p. 628-635, maio 1981.

CANALES, A.; SANCHEZ-MUNIZ, F. J. Paraoxonase, something more than an enzyme? **Méd. Clin. (Barc)**, Madri, v. 12, n. 14, p. 537- 548, out. 2003.

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.**, Limoges, v.22, p.260-266, fev. 1981.

CHENG, C. F.; OOSTA, G. M.; BENSADOUM, A.; ROSENBERG, R. D. Binding of lipoprotein lipase to endothelial cells in culture. **J. Biol. Chem.**, Boston, v. 256, n. 24, p. 12893-12898, dez. 1981.

CHIU, S. W.; CLARK, M.; BALAJI, V.; SUBRAMANIAM, S.; SCOTT, H. L.; JAKOBSSON, E. Incorporation of surface tension into molecular dynamics simulation of an interface: a fluid phase lipid bilayer membrane. **Biophys J.**, Urbana, v. 69, n. 4, p. 1230-1245, out. 1995.

CHOI, B. G.; VILAHUR, G.; VILES-GONZALEZ, J. F.; BADIMON, J. The role of high-density lipoprotein cholesterol in atherothrombosis. **Mt. Sinai. J. Med.**, New York, v. 76, n. 4, p. 690-701, jul. 2006.

CLAY, M. A.; PYLE, D. H.; RYE, K. A.; VADAS, M. A.; GAMBLE, J. R.; BARTER, P. J. Time sequence of the inhibition of endothelial adhesion molecule expression by reconstituted high density lipoproteins. **Atherosclerosis**, Adelaide, v. 157, n. 1, p. 23-29, jul. 2001.

CURRY, M. D.; MCCONATHY, W. J.; ALAUPOVIC, P. Quantitative determination of human apolipoprotein D by electroimmunoassay and radial immunodiffusion. **Biochim. Biophys. Acta.**, Greenville, v. 491, n. 1, p. 232-241, março 1977.

DE SILVA, H. V.; STUART, W. D.; PARK, Y. B.; MAO, S. J.; GIL, C. M.; WETTERAU, J. R.; BUSCH, S. J.; HARMONY, J. A. Purification and characterization of apolipoprotein J. **J. Biol. Chem.**, Cincinnati, v. 265, n. 24, p. 14292-14297, ago. 1990.

DESRUMAUX, C.; ATHIAS, A.; MASSON, D.; GAMBERT, P.; LALLEMANT, C.; LAGROST, L. Influence of the electrostatic charge of lipoprotein particles on the activity of the human plasma phospholipid transfer protein. **J. Lipid Res.**, Dijon, v. 39, p. 125-129, jan. 1998.

DUCHATEAU, P.N.; PULLINGER, C.R.; ORELLANA, R.E.; KUNITAKE, S.T.; NAYAVIGNE, J.; O'CONNOR, P.M.; MALLOY, M.J.; KANE, J.P. Apolipoprotein L, a new human density lipoprotein apolipoprotein expressed by the pancreas. Identification, cloning, characterization, and plasma distribution of apolipoprotein L. **J. Biol. Chem.**, San Francisco, v. 272, n. 41, p. 25576-25582, out. 1997.

EISENBERG, S. Effect of temperature and plasma on the exchange of apolipoproteins and phospholipids between rat plasma very low and high density lipoproteins. *J. Lipid Res.*, Jerusalem, v. 19, n.2, p. 229-236, fev. 1978.

EISENBERG, S. High density lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.*, Jerusalem, v. 25, n. 10, p. 1017-1058, out. 1984.

EKMAN, S.; LUNDBERG, B. The transfer of lipids from protein-free lipoprotein models to human fibroblasts in culture. *Biochim. Biophys. Acta*, Turku, v. 921, n. 2, p. 347-355, set. 1987.

EPAND, R. M.; STAFFORD, A.; LEON, B.; LOCK, P. E.; TYTLER, E. M.; SEGREST, J. P.; ANANTHARAMAIAH, G. M. HDL and apolipoprotein A-I protect erythrocytes against the generation of procoagulant activity. *Arterioscler. Thromb.*, Hamilton, v. 14, n. 11, p. 1775-1783, nov. 1994.

FERRETTI, G.; BACCHETTI, T.; NÈGRE-SALVAYRE, A.; SALVAYRE, R.; DOUSSET, N.; CURATOLA, G. Structural modifications of HDL and functional consequences. *Atherosclerosis*, v. 187, n. 6, p. 1-9, set. 2006.

FIELDING, C. J.; SHORE, V. G.; FIELDING, P. E. A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, San Francisco, v. 46, n. 4, p. 1493-1498, fev. 1972.

FIELDING, C. J.; FIELDING, P. E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *Lipid Res.*, San Francisco, v. 36, n. 2, p. 211-228, fev. 1995.

FRANCONE, O. L.; GURAKAR, A.; FIELDING, C. Distribution and functions of lecithin:cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in plasma lipoproteins. Evidence for a functional unit containing these activities together with apolipoproteins A-I and D that catalyzes the esterification and transfer of cell-derived cholesterol. *J. Biol. Chem.*, San Francisco, v. 264, n. 12, p. 7066-7072, abril 1989.

FREDENRICH, A.; BAYER, P. Reverse cholesterol transport, high-density lipoproteins and HDL cholesterol: recent data. *Diabetes Metab.*, Nice, v. 29, n. 3, p. 201-205, jun. 2003.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the

preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, Bethesda-MD, v. 18, n. 6, p. 499-502, jun. 1972.

GIBBONS, G. F. Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. **Biochem. J.**, Oxford, v. 268, n. 1, p. 1-13, maio 1990.

BISGAIER, C. L.; GLICKMAN, R. M. Intestinal synthesis, secretion, and transport of lipoproteins. **Ann. Ver. Physiol.**, New York, v. 45, p. 625-636, out. 1983.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S.; ANDERSON, R. G. W.; RUSSEL, D. W.; SCHNEIDER, W. J. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. **Ann Ver. Cell Biol.**, Dallas, v. 1, p. 1-39, maio 1985.

CRAIG, I. F.; VIA, D. P.; SHERRILL, B. C.; SKLAR, L. A.; MANTULIN, W. W.; GOTTO JR, A. M.; SMITH, L. C. Incorporation of defined cholesteryl esters into lipoproteins using cholesteryl ester-rich microemulsions. **J. Biol. Chem.**, Houston, v. 257, n. 1, p. 330-335, jan. 1982.

GRAZIANI, S. R.; IGREJA, F. A. F.; HEGG, R.; MENEGHETTI, C.; BRANDIZZI, L. I.; BARBOSA, R.; AMÂNCIO, F. R.; PINOTTI, J. A.; MARANHÃO, R. C. Uptake of a cholesterol rich emulsion by breast cancer. **Ginecologic Oncology**, São Paulo, v. 85, n. 3, p. 493-497, jun. 2002.

GRIFFIN, J. H.; KOJIMA, K.; BANKA, C. L.; CURTISS, L. K.; FERNANDEZ, J. A. High-density lipoprotein enhancement of anticoagulant activities of plasma protein S and activated protein C. **J. Clin. Invest.**, San Diego, v. 103, n. 2, p. 219-227, jan. 1999.

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.**, Graz, v. 28, n. 9, p. 1053-1056, set. 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.**, Paris, v. 14, n. 2, p. 199-206, fev. 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.**, Paris, v. 15, n. 9, p. 1359-1368, set. 1995.

GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS,
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003.

HAMMAD, S. M.; STEFANSSON, S.; TWAL, W. O.; DRAKE, C. J.; FLEMING, P.; REMALEY, A.; BREWER JR, H. B.; ARGRAVES, W. S. Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B(12) complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Charleston, v. 96, n. 18, p. 10158-10163, ago. 1999.

HANKINS, J. The role of albumin in fluid and electrolyte balance. **J. Infus. Nurs.**, Greensboro, v. 29, n. 5, p. 260-265, set. 2006.

HAVEL, R. J.; KANE, J. P.; KASHYAP, M. L. Interchange of apolipoproteins between chylomicrons and high density lipoproteins during alimentary lipemia in man. **J. Clin. Invest.**, San Francisco, v. 34, p. 32-8, jan. 1973.

HAVEL, R. J. The formation of LDL: mechanisms and regulation. **J. Lipid Res.**, San Francisco, v.25, p. 1570-76, dez. 1984.

HAVEL, R. J.; HAMILTON, R. L. Hetatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. **Hepatology**, San Francisco, v. 8, p. 1689-704, nov./dez. 1988.

HERSBERGER, M.; VON ECKARDSTEIN, A. Modulation of high-density lipoprotein cholesterol metabolism and reverse cholesterol transport. **Handb. Exp. Pharmacol.**, Zurich, v. 170, p. 537-561, 2005.

HIRATA, R. D. C. **Efeitos da apolipoproteína B sobre o metabolismo lipídico através da utilização de emulsões semelhantes a fração lipídica da LDL**. 1991. Tese (Doutorado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

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**, São Paulo, v. 1437, n. 1, p. 53-62, jan. 1999.

HUNGRIA, V. T. M.; 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 treatment of the disease. **Cancer Chemother. Farmacol.**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 51-60, jan. 2004.

HUUSKONEN, J.; OLKKONEN, V. M.; JAUHIAINEN, M.; EHNHOLM, C. The impact of phospholipids transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. **Atherosclerosis**, Helsinki, v. 155, n. 2, p. 269-281, abril 2001.

INNERARITY, T. L.; BERSOT, T. P.; ARNOLD, K. S.; WEISGRABER, K. H.; DAVIS, P. A.; FORTE, T. M.; MAHLEY, R. W. Receptor binding activity of high-density lipoproteins containing apoprotein E from abetalipoproteinemic and normal neonate plasma. **Metabolims**, San Francisco, v. 33, n. 2, p. 186-195, fev. 1984.

IULIANO, L. The oxidant stress hypothesis of atherogenesis. **Lipids**, Rome, v. 36, p. 41-44, 2001.

KANE, J. P.; HARDMAN, D. A.; PAULUS, H. E. Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Los Angeles, v. 77, n. 5, p. 2465-2469, maio 1980.

KONTUSH, A.; CHANTEPIE, S.; CHAPMAN, M. J. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Paris, v. 23, n. 10, p. 1881-1888, out. 2003.

KOPPAKA, V. Structural studies of discoidal lipoprotein A-I. **Cell Mol. Life Sci.**, Philadelphia, v. 58, n. 7, p. 885-893, jun. 2001.

KRAUSS, R. M.; HERBERT, P. N.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Further observations on the activation and inhibition of lipoprotein lipase by apolipoproteins. **Circ. Res.**, Bethesda-MD, v. 33, n. 4, p. 403-411, out. 1973.

LALANNE, F.; PONSIN, G. Mechanism of the phospholipid transfer protein-mediated transfer of phospholipids from model lipid vesicles to high density lipoproteins. **Biochim. Biophys. Acta**, Lyon, v. 1487, n. 1, p. 82-91, ago. 2000.

LAGROST, L.; FLORENTIN, E.; GUYARD-DANGREMONT, V.; ATHIAS, A.; GANDJINI, H.; LALLEMANT, C.; GAMBERT, P. Evidence for nonesterified fatty acids

- as modulators of neutral lipid transfers in normolipidemic human plasma. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dijon, v. 15, n. 9, p. 1388-1396, set. 1995.
- LAROSA, J. C.; LEVY, R. I.; HERBERT, P.; LUX, S. E.; FREDRICKSON, D. S. A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Bethesda-MD, v. 41, n. 1, p. 57-62, out. 1970.
- LASSEL, T. S.; GUERIN, M.; AUBOIRON, S.; GUY-GRAND, B.; CHAPMAN, M. J. Evidence for a cholesteryl ester donor activity of LDL particles during alimentary lipemia in normolipidemic subjects. **Atherosclerosis**, Paris, v. 147, n. 1, p. 41-48, nov. 1999.
- LEE, C. M.; CHIEN, C. T.; CHANG, P. Y.; HSIEH, M. Y.; JUI, H. Y.; LIAU, C. S.; HSU, S. M.; LEE, Y. T. High-density lipoprotein antagonizes oxidized low-density lipoprotein by suppressing oxygen free-radical formation and preserving nitric oxide bioactivity. **Atherosclerosis**, Taipei, v. 183, n. 2, p. 251-258, dez. 2005.
- 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**, New York, v.9, p.2244-52, maio 1970.
- LEVY, E. The 1991 Borden Award Lecture. Selected aspects of intraluminal and intracellular phases of intestinal fat absorption. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, Quebec, v. 70, n. 4, p. 403-409, 1992.
- LEWIS, G. F. Determinants of plasma HDL concentrations and reverse cholesterol transport. **Curr. Opin. Cardiol.**, Toronto, v. 21, n. 4, p. 345-352, jul. 2006.
- LI, D.; WENG, S.; YANG, B.; ZANDER, D. S.; SALDEEN, T.; NICHOLS, W. W.; KHAN, S.; MEHTA, J. L. Inhibition of arterial thrombus formation by ApoA1 Milano. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Gainesville, v. 19, n. 2, p. 378-383, fev. 1999.
- LIMA, E. S.; MARANHÃO, R. C. Rapid, simple laser-light-scattering method for HDL particle sizing in whole plasma. **Clin. Chem.**, São Paulo, v. 50, n. 6, p. 1086-1088, jun. 2004.
- LO PRETE, A. C.; MARIA, D. A.; RODRIGUES, D. G.; VALDUGA, C. J.; IBANEZ, O. C.; MARANHÃO, R. C. Evaluation in melanoma-bearing mice of an etoposide derivative associated to a cholesterol-rich nanoemulsion. **J. Pharm. Pharmacol.**, São Paulo, v. 58, n. 6, p. 801-808, jun. 2006.

LUND-KATZ, S.; LIU, L.; THUAHNAI, S. T.; PHILLIPS, M. C. High density lipoprotein structure. **Front. Biosci.**, Philadelphia, v. 1, n. 8, p. 1044-1054, maio 2003.

LUO, G.; ZHANG, X.; NILSSON-EHLE, P.; XU, N. Apolipoprotein M. **Lipids Health Dis.**, Lund, v. 4, n. 3, p. 21, out. 2004.

LUX, S. E.; JOHN, K. M.; BREWER JR, H. B. Isolation and characterization of apoLp-Gln-II (apoA-II), a plasma high density apolipoprotein containing two identical polypeptide chains. **J. Biol. Chem.**, Bethesda-MD, v. 247, n. 23, p. 7510-7518, dez. 1972.

MACKNESS, M. I.; DURRINGTON, P. N. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. **Atherosclerosis**, Manchester, v. 115, n. 2, p. 243-253, jun. 1995.

MAHLEY, R. W.; HUANG, Y.; WEISGRABER, K. H. Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. **J. Clin. Invest.**, San Francisco, v. 116, n. 5, p. 1226-1229, maio 2006.

MANN, C. J.; YEN, F. T.; GRANT, A. M.; BIHAIN, B. E. Mechanism of plasma cholesteryl ester transfer in hypertriglyceridemia. **J. Clin. Invest.**, New Orleans, v. 88, n. 6, p. 2059-2066, dez. 1991.

MARANHÃO, R. C.; TERCYAC, A. M.; REDGRAVE, T. G. Effects of cholesterol content on metabolism of protein-free emulsion models of lipoprotein. **Biochem. Biophys. Acta**, São Paulo, v. 875, n. 2, p. 247-255, fev. 1986.

MARANHÃO, R. C.; CESAR, T. B.; PEDROSO-MARIANI, S. R.; HIRATA, M. H.; MESQUITA, C. H. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. **Lipids**, São Paulo, v. 28, n. 8, p. 691-696, ago. 1993.

MARANHÃO, R. C.; GARICOCHEA, B.; SILVA, E. L.; LLACER, P. D.; CADENA, S. M. S.; COELHO, I. J. C.; MENEGHETTI, J. C.; PILEGGI, F. J. C.; CHAMONE, D. A. F. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. **Cancer Res.**, São Paulo, v. 54, n. 17, p. 4660-4666, set. 1994.

MARANHÃO, R. C.; ROLAND, I. A.; TOFFOLETTO, O.; RAMIRES, J. A.; GOLÇALVES, R. P.; MESQUITA, C. H.; PILEGGI, F. J. C. Plasma kinetics behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors. **Lipids**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 627-633, jun. 1997.

MARANHÃO, R. C.; GRAZIANI, S. R.; YAMAGUCHI, N.; MELO, R. F.; LATRILHA, M. C.; RODRIGUES, D. G.; COUTO, R. D.; SCHREIER, S.; BUZAID, A. C. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, São Paulo, v. 49, n. 6, p. 487-498, jun. 2002.

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**, Montreal, v. 35, n. 2, p. 127-133, fev. 1980.

MARCEL, Y. L.; MCPHERSON, R.; HOGUE, M.; CZARNECKA, H.; ZAWADZKI, Z.; WECCH, P. K.; WHITLOCK, M. E.; TALL, A. R.; MILNE, R. W. Distribution and concentration of cholesteryl ester transfer protein in plasma of normolipidemic subjects. **J. Clin. Invest.**, Montreal, v. 85, n. 1, p. 10-17, jan. 1990.

MCCOY, M. G.; SUN, G. S.; MARCHADIER, D.; MAUGEAIS, C.; GLICK, J. M.; RADER, D. J. Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase. **J. Lipid Res.**, Philadelphia, v. 43, n. 6, p. 921-929, jun. 2002.

MEDINA, W. L.; NUNES, V. S.; CARRILHO, A. J.; SHIMABUKURU, A. F.; LOTTENBERG, A. M.; LOTTENBERG, S. A.; MCPHERSON, R.; KRAUSS, R. M.; QUINTAO, E. C. High-density lipoprotein cholesterol esterification and transfer rates to lighter density lipoproteins mediated by cholesteryl ester transfer protein in the fasting and postprandial periods are not altered in type 1 diabetes mellitus. **Eur. J. Intern. Med.**, São Paulo, v. 11, n. 5, p. 264-270, out. 2000.

MEYERS, C. D.; KASHYAP, M. L. Pharmacologic elevation of high-density lipoproteins: recent insights on mechanism of action and atherosclerosis protection. **Curr. Opin. Cardiol.**, Long Beach, v. 19, n. 4, p. 366-373, jul. 2004.

NAKAYA, Y.; SCHAEFER, E. J.; BREWER JR, H. B. Activation of human post heparin lipoprotein lipase by apolipoprotein H (beta 2-glycoprotein I). **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Bethesda-MD, v. 95, n. 3, p. 1168-1172, ago. 1980.

NAQVI, T. Z.; SHAH, P. K.; IVEY, P. A.; MOLLOY, M. D.; THOMAS, A. M.; PANICKER, S.; AHMED, A.; CERCEK, B.; KAUL, S. Evidence that high-density lipoprotein cholesterol is an independent predictor of acute platelet-dependent thrombus formation. **Am. J. Cardiol.**, Los Angeles, v. 84, n. 9, p. 1011-1017, nov. 1999.

NAVAB, M.; BERLINER, J. A.; SUBBANAGOUNDER, G.; HAMA, S.; LUSIS, A. J.; CASTELLANI, L. W.; REDDY, S.; SHIH, D.; SHI, W.; WATSON, A. D.; VAN LENTEN, B. J.; VORA, D.; FOGELMAN, A. M. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Los Angeles, v. 21, n. 4, p. 481-488, abril 2001.

NOFER, J. R.; LEVKAU, B.; WOLINSKA, I.; JUNKER, R.; FOBKER, M.; VON ECKARDSTEIN, A.; SEEDORF, U.; ASSMANN, G. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. **J. Biol. Chem.**, Münster, v. 276, n. 37, p. 34480-34485, set. 2001.

NORATA, G. D.; PIRILLO, A.; CATAPANO, A. L. Modified HDL: biological and physiopathological consequences. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, Milan, v.16, n.4 , p. 371-379, out. 2006.

NUNES, V. S.; QUINTAO, E. C.; CAZITA, P. M.; HARADA, L. M.; DE FARIA, E. C.; OLIVEIRA, H. C. Plasma lipases and lipid transfer proteins increase phospholipid but not free cholesterol transfer from lipid emulsion to high density lipoproteins. **BMC Biochem.**, São Paulo, v. 2, p. 1, fev. 2001.

OLOFSSON, S. O.; MCCONATHY, W. J.; ALAUPOVIC, P. Isolation and partial characterization of a new acidic apolipoprotein (apolipoprotein F) from high density lipoproteins of human plasma. **Biochemistry**, Göteborg, v. 17, n. 6, p. 1032-1036, março 1978.

PASQUALINI, L.; CORTESE, C.; MARCHESI, S.; SIEPI, D.; PIRRO, M.; VAUDO, G.; LIBERATOSCIOLI, L.; GNASSO, A.; SCHILLACI, G.; MANNARINO, E. Paraoxonase-1 activity modulates endothelial function in patients with peripheral arterial disease. **Atherosclerosis**, Perugia, v. 183, n. 2, p. 349-354, dez. 2005.

PATSCH, J. Influence of lipolysis on chylomicron clearance and HDL cholesterol levels. **Eur. Heart J.**, Innsbruck, v. 19, n. H, p. H2-H6, jul. 1998.

PENNACCHIO, L. A.; OLIVIER, M.; HUBACEK, J. A.; COHEN, J. C.; COX, D. R.; FRUCHART, J. C.; KRAUSS, R. M.; RUBIN, E. M. An apolipoprotein influencing

triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. **Science**, Berkeley, v. 294, n. 5540, p. 169-173, out. 2001.

PERUGINI, C.; BAGNATI, M.; CAU, C.; BORDONE, R.; ZOPPIS, E.; PAFFONI, P.; RE, R.; ALBANO, E.; BELLOMO, G. Distribution of lipid-soluble antioxidants in lipoproteins from healthy subjects. I. Correlation with plasma antioxidant levels and composition of lipoproteins. **Pharmacol. Res.**, Novara, v. 41, n. 1, p. 55-65, jan. 2000.

PHILLIPS, M. C.; GILLOTTE, K. L.; HAYNES, M. P.; JOHNSON, W. J.; LUND-KATZ, S.; ROTHBLAT, G. H. Mechanisms of high density lipoprotein-mediated efflux of cholesterol from cell plasma membranes. **Atherosclerosis**, Philadelphia, v. 137, p. 13-17, abril 1998.

PIRICH, C.; EFTHIMIOU, Y.; O'GRAD, J.; SINZINGER, H. Hiperalphalipoproteinemia and prostaglandin I2 stability. **Thromb. Res.**, Vienna, v. 88, n. 1, p. 41-49, out. 1997.

RADER, D.J. High-density lipoproteins and atherosclerosis. **Am. J. Cardiol.**, Philadelphia, v. 90, n. 8A, p. 62i-70i, out. 2002.

RAINWATER, D. L.; MOORE JR, P. H.; SHELLIEDY, W. R.; DYER, T. D.; SLIFER, S. H. Characterization of a composite gradient gel for the electrophoretic separation of lipoproteins. **J. Lipid Res.**, San Antonio, v. 38, n. 6, p. 1261-1266, jun. 1997.

RAINWATER, D. L. Electrophoretic separation of LDL and HDL subclasses. **Methods Mol. Biol.**, San Antonio, v. 110, p. 137-151, 1998.

RAJARAM, O. V.; CHAN, R. Y. S.; SAWYER, W. H. Effect of unesterified cholesterol on the activity of cholesteryl ester transfer protein. **Biochem. J.**, Melbourne, v. 304, p. 423-430, dez. 1994.

Recommendations on Lipoprotein Measurement from the Working Group on Lipoprotein Measurement. **National Cholesterol Education Program (NCEP)**, 1995.

REDGRAVE, T. G.; MARANHÃO, R. C. Metabolism of protein-free lipid emulsion models of chylomicrons in rats. **Biochim. Biophys. Acta**, São Paulo, v. 835, n. 1, p. 104-112, jun. 1985.

RODRIGUES, D. G.; COVOLAN, C. C.; CORADI, S. T.; BARBOZA, R.; MARANHÃO, R. C. Use of a cholesterol-rich emulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel. **J. Pharm. and Pharmacol.**, São Paulo, v. 54, n. 6, p. 765-772, jun. 2002.

RODRIGUES, D. G.; MARIA, D. A.; FERNANDES, D. C.; VALDUGA, C. J.; COUTO, R. D.; IBANEZ, O. C.; MARANHÃO, R. C. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: *in vitro* and *in vivo* studies. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, São Paulo, v. 55, n. 6, p. 565-576, jun. 2005.

ROTA, S.; MCWILLIAM, N. A.; BAGLIN, T. P.; BYRNE, C. D. Atherogenic lipoproteins support assembly of the prothrombinase complex and thrombin generation: modulation by oxidation and vitamin E. **Blood**, Cambridge, v. 91, n. 2, p. 508-515, jan. 1998.

SCHAEFER, E. J.; EISENBERG, S.; LEVY, R. I. Lipoprotein apoprotein metabolism. **J. Lipid Res.**, Bethesda-MD, v. 19, n. 6, p. 667-687, out. 1978.

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.**, Bethesda-MD, v. 23, n. 6, p. 850-862, ago. 1982.

SCHWARTZ, C. C.; VANDENBROEK, J. M.; COOPER, P. S. Lipoprotein cholesteryl ester production, transfer, and output in vivo in humans. **J. Lipid Res.**, Richmond, v. 45, n. 9, p. 1594-1607, set. 2004.

SEGREST, J. P.; LI, L.; ANANTHARAMAIAH, G. M.; HARVEY, S. C.; LIADAKI, K. N.; ZANNIS, V. Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein. **Curr. Opin. Lipidol.**, Birmingham, v. 11, n. 2, p. 105-115, abril 2000.

SHORE, V. G.; SHORE, B. Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. **Biochemistry**, Albany, v. 12, n. 3, p. 502-507, jan. 1973.

SOARES, T. A.; FERREIRA, R. Aplicação da equação de Poisson-Boltzmann ao cálculo de propriedades dependentes do pH em proteínas. **Quim. Nova**, Pernambuco, v. 27, n. 4, p. 640-647, fev. 2004.

SPIEKER, L. E.; SUDANO, I.; HURLIMANN, D.; LERCH, P. G.; LANG, M. G.; BINGGELI, C.; CORTI, R.; RUSCHITZKA, F.; LUSCHER, T. F.; NOLL, G. High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. **Circulation**, Zürich, v. 105, n. 12, p. 1399-1402, março 2002.

SPIEKER, L. E.; LUSCHER, T. F. Protection of endothelial function. **Handb. Exp. Pharmacol.**, Zürich, v. 112, n. 170, p. 619-644, 2005.

STEIN, O.; STEIN, Y. Lipid transfer proteins (LTP) and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, Jeruzalem, v. 178, n. 2, p. 217-230, fev. 2005.

STEINBERG, D. Oxidative modification of LDL in the pathogenesis of atherosclerosis. **Am. J. Geriatr. Cardiol.**, San Diego, v. 2, n. 5, p. 38-41, out. 1993.

SVIRIDOV, D.; NESTEL, P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. **Atherosclerosis**, Melbourne, v. 161, n. 2, p. 245-254, abril 2002.

TALL, A. R.; BLUM, C. B.; FORESTER, G. P.; NELSON, C. A. Changes in the distribution and composition of plasma high density lipoproteins after ingestion of fat. **J. Biol. Chem.**, New York, v. 257, n. 1, p. 198-207, jan. 1982.

TALL, A. R.; FORESTER, L. R.; BONGIOVANNI, G. L.; Facilitation of phosphatidylcholine transfer into high density lipoproteins by an apolipoprotein in the density 1.20-1.26 g/mL fraction of plasma. **J. Lipid Res.**, New York, v. 24, n. 3, p. 277-289, março 1983.

TEIXEIRA, R. S.; CURI, R.; MARANHÃO, R. C. Effects on Walker 256 tumor of carmustine associated with a cholesterol-rich microemulsion (LDE). **J. Pharm. Pharmacol.**, São Paulo, v. 56, n. 7, p. 909-914, jul. 2004.

TURLEY, S. D.; DIETSCHY, J. M. Sterol absorption by the small intestine. **Curr. Opin. Lipidol.**, Dallas, v. 14, n. 3, p. 233-240, jun. 2003.

VALDUGA, C. J.; FERNANDES, D. C.; LO PRETE, A. C.; AZEVEDO, C. H. M.; RODRIGUES, D. G.; MARANHÃO, R. C. Use of a Cholesterol-Rich Microemulsion that Binds to Low-Density Lipoprotein Receptors as Vehicle for Etoposide, **J. Pharm. Pharmacol.**, São Paulo, v. 55, n. 12, p. 1615-1622, dez. 2003.

VANHOLLEBEKE, B.; PAYS, E. The function of apolipoproteins L. **Cell Mol. Life Sci.**, Bruxelles, v. 63, n. 17, p. 1937-1944, set. 2006.

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.**, Umeå, v. 249, v. 2, p. 549-556, jan. 1988.

VON ECKARDSTEIN, A.; NOFER, J. R.; ASSMANN, G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Münster, v. 21, n. 1, p. 13-27, jan. 2001.

WANG, N.; LAN, D.; CHEN, W.; MATSUURA, F.; TALL, A. R. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. **Proc, Natl, Acad, Sci. USA**, New York, v. 101, n. 26, p. 9774-9779, jun. 2004.

WANG, M.; BRIGGS, M. R. HDL: The metabolism, function, and therapeutic importance. **Chem. Rev.**, St Louis, v. 104, n. 1, p. 119-137, jan. 2004.

WARNICK, G. R.; REMALEY, A. T. Measurement of cholesterol in plasma and other body fluids. **Curr. Atheroscler. Rep.**, Issaquah, v. 3, n. 5, p. 404-411, set. 2001.

WATSON, A. D.; BERLINER, J. A.; HAMA, S. Y.; LA DU, B. N.; FAULL, K. F.; FOGELMAN, A. M.; NAVAB, M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidised low density lipoprotein. **J. Clin. Invest.**, Los Angeles, v. 96, v. 6, p. 2882-2891, dez. 1995.

WEISGRABER, K. H.; BERSOT, T. P.; MAHLEY, R. W. Isolation and characterization of an apoprotein from the d less than 1.006 lipoproteins of human and canine lymph homologous with the rat A-IV apoprotein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Francisco, v. 85, n. 1, p. 287-292, nov. 1978.

WINDLER, E. E.; GREEVE, J.; DAERR, W. H.; GRETEN, H. Binding of rat chylomicrons and their remnants to the hepatic low-density-lipoprotein receptor and its role in remnant removal. **Biochem J.**, Hamburg, v. 252, n. 2, p. 553-561, jun. 1988.

XIA, P.; VADAS, M. A.; RYE, K. A.; BARTER, P. J.; GAMBLE, J. R. High density lipoproteins (HDL) interrupt the sphingosine kinase signaling pathway. A possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL. **J. Biol. Chem.**, Adelaide, v. 274, n. 46, p. 33143-33147, nov. 1999.

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.**, Philadelphia, v. 23, n. 5, p. 712-719, maio 2003.

YLA-HERTTUALA, S. Oxidized LDL and atherogenesis. **Ann N Y Acad. Sci.**, Kuopio, v. 874, p. 134-137, jun. 1999.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NBR 6023: informação e documentação; referências: elaboração, Rio de Janeiro, 2002.

ANEXO

ANEXO

ANEXO A – Características físicas e dados bioquímicos dos participantes.

	Média ±
<i>Idade (anos)</i>	38 ± 11
<i>Tamanho da HDL (nn)</i>	9,1 ± 1,0
<i>IMC (Kg/m²)</i>	25 ± 3
<i>Glicose (mg/dL)</i>	86 ± 9
<i>Triglicerídeo (mg/dL)</i>	104 ± 41
<i>Colesterol Total (mg/dL)</i>	165 ± 28
<i>HDL-c</i>	51 ± 13
<i>LDL-c</i>	102 ± 31
<i>VLDL-c</i>	19 ± 10
(n= 53 indivíduos)	