

ALINE URBAN

**LIPEMIA PÓS-PRANDIAL NAS ALTERAÇÕES DAS
ATIVIDADES DA PROTEÍNA DE TRANSFERÊNCIA DE
ÉSTERES DE COLESTEROL OU DA LIPASE HEPÁTICA
EM HUMANOS E EM ROEDORES**

CAMPINAS - Unicamp

2007

ALINE URBAN

**LIPEMIA PÓS-PRANDIAL NAS ALTERAÇÕES DAS
ATIVIDADES DA PROTEÍNA DE TRANSFERÊNCIA DE
ÉSTERES DE COLESTEROL OU DA LIPASE HEPÁTICA
EM HUMANOS E EM ROEDORES**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências,
área de concentração em Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ELIANA COTTA DE FARIA

CAMPINAS - Unicamp

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Ur11	<p>Urban, Aline</p> <p>Lipemia pós-prandial nas alterações das atividades da proteína de transferência de ésteres de colesterol ou da lipase hepática em humanos e roedores / Aline Urban. Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Eliana Cotta de Faria Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p style="text-align: center;">1. Aterosclerose. 2. Proteínas de transferência de ésteres de colesterol. 3. CETP. 4. Lipase. I. Faria, Eliana Cotta de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</p>
------	---

Título em inglês: Lipemia postrandial in the alterations of the activities in the cholesterol ester transfer protein or hepatic lipase in human and rodents

Keywords: • Atherosclerosis
• Cholesterol ester transfer proteins
• CETP
• Lipase

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria

Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira

Profa. Dra. Edilma Maria de Albuquerque Vasconcelos

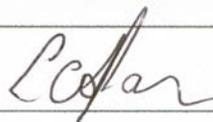
Data da defesa: 19 -12 - 2007

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

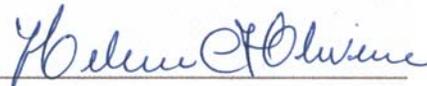
Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Eliana Cotta de Faria

Membros:

1. Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria -



2. Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira -



3. Profa. Dra. Edilma Maria de Albuquerque Vasconcelos -



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 19/12/2007

Dedicatória

*Dedico esse trabalho aos meus pais Cristina e Alfredo, Leandro e Lourdes,
pelo amor e incentivo em todos os momentos.*

*Aos meus avós Elza, José Carlos e Maria por sempre me dar o prazer de
estar em sua companhia.*

*Ao meu grande amor Alex Paffaro pela dedicação, carinho e compreensão
de sempre.*

Aos meus irmãos Alan, Arthur e Amanda por estarem sempre comigo.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter saúde todos os dias para estudar e trabalhar.

À minha orientadora Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria por ter acreditado em mim e no meu trabalho, pela todas e muitas horas de dedicação em sua excelente orientação.

À Profa. Dra. Lucia Castilho pelo grande apoio para a realização desse trabalho.

À minha grande amiga Andrea Vieira José que me incentivou a seguir a vida acadêmica.

Às amigas Fernanda Santiago, Larissa Kato, Carla Nuñez, Harumi Kinchoku, Fernanda Bibiano, Dra. Edilma Albuquerque, Dra. Vera Castanho e Dr. Fabio Sodré pelo bons momentos e grande apoio.

A Mirian Danelon e Aparecida Pereira, Marielza Koznac por toda ajuda, ensinamentos e amizade em todo o tempo de convivência.

À toda equipe do Laboratório de L pides do NMCE-UNICAMP.

À toda a equipe do Laboratório de Bioquímica do HC, em especial a Ronise Pozetti, por sempre me receber bem e por todos os auxílios prestados.

Ao Laboratório de Bioenergética do Prof. Dr. Aníbal Vercesi e principalmente ao Bruno Paim sempre solícito em ajudar.

Ao Laboratório de L pides da Faculdade de Medicina da USP São Paulo e Ribeirão Preto pela parceria.

À Profa. Dra. Helena Coutinho de Oliveira e toda a sua equipe por sempre estarem disponíveis a ajudar.

Ao Rogério Antonio de Oliveira, por toda a paciência e ajuda na parte estatística que foi fundamental para concluir esse trabalho.

À toda a minha família pela ajuda que recebi de cada um. Todos foram muito importantes para que eu pudesse realizar esse sonho.

“A mais bela experiência que podemos ter é a do mistério. É a emoção fundamental existente na origem da verdadeira arte e ciência. Aquele que não a conhece e não pode se maravilhar com ela está praticamente morto e seus olhos estão ofuscados”.

Albert Einstein

Sumário

Resumo	xxiii
Abstract.....	xxvii
1. Introdução.....	31
Aterosclerose	31
Metabolismo de lipoproteínas plasmáticas.....	32
Metabolismo de Lipoproteínas ricas em Triglicérides	33
Metabolismo da HDL e Transporte Reverso de Colesterol.....	37
Figura 1: Transporte Reverso de Colesterol.....	39
Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol (CETP).....	40
Figura 2: Estrutura Tridimensional da CETP.....	40
Figura 3: O mecanismo proposto para a heterotroca.....	41
Novas Funções da CETP	42
Polimorfismos da CETP.....	43
Deficiência de CETP	43
Lipase hepática ou triacilglicerol lipase hepática.....	46
Figura 4: Estrutura Tridimensional da Lipase Hepática.....	46
Polimorfismos da LH	47
Deficiência de LH.....	48
Lipemia pós-prandial.....	48
Lipemia pós-prandial e aterogênese	50
Terapia de Reposição Hormonal – Tibolona.....	52
2. Objetivos.....	54
3. Materiais e Métodos	56
Casuística.....	56
Teste de tolerância à gordura.....	58
Coleta de sangue Pré e Pós Heparina	59
Ultrassonografia “doppler” das artérias carótidas	59
Ultracentrifugação preparativa seqüencial para isolamento de lipoproteínas ricas em triglicérides.....	59

Processamento das amostras: de jejum e após sobrecarga de gordura	60
Determinação da Atividade da Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol.....	60
Determinação das Atividades de Lipoproteína Lipase e Lipase Hepática	61
Determinação da Proteína de Transferência de Fosfolípides	62
Análises Moleculares: Extração de DNA.....	62
Polimorfismo -514C/T do Gene da Lipase Hepática	63
Polimorfismo I405V da Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol.....	64
Polimorfismo TaqIB da Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol.....	65
Polimorfismo do gene da Apolipoproteína E	65
Teste de Tolerância à Gordura em Ratos e Camundongos.....	66
Análises estatísticas	67
4. Resultados.....	69
Trabalho Científico 1: TIBOLONE TREATMENT REVERSED INCREASED POSTPRANDIAL LIPEMIA IN A POST-MENOPAUSAL WOMAN WITH CETP, HL AND LPL DEFICIENCIES	69
Trabalho Científico 2: DIFFERENCES AND SIMILARITIES OF POSTPRANDIAL LIPEMIA IN RODENTS AND HUMANS	81
Trabalho Científico 3: A MODERATE INCREASE IN HUMAN PLASMA CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN ACTIVITY DOES NOT CHANGE <i>IN VIVO</i> POSTPRANDIAL LIPEMIA.....	90
5. Discussão Geral	105
6. Conclusões.....	110
8. Referências Bibliográficas.....	112
ANEXO 1	129
ANEXO 2	130

Lista de Abreviaturas

ACAT	acil-colesterol aciltransferase
Apo AI	apolipoproteína AI
ApoB	apolipoproteína B
Apo CIII	apolipoproteína CIII
Apo E	apolipoproteína E
BP	pares de base
CE	ésteres de colesterol (<i>cholesteryl esters</i>)
CETP	proteína de transferência de ésteres de colesterol (<i>cholesteryl ester transfer protein</i>)
CTL	controles
DAC	doença arterial coronariana
EIM-c	espessura da íntima-média das carótidas
FL	fosfolípidos
HALP	hiperalfalipoproteinemia/nêmicos
HDL	lipoproteína de alta densidade (<i>high-density lipoprotein</i>)
HDL-C	colesterol da lipoproteína de alta densidade (<i>high-density lipoprotein</i>)
HDL ₂	subfração 2 de lipoproteína da alta densidade
HDL ₃	subfração 3 de lipoproteína da alta densidade
HSPG	proteoglicanos de heparan sulfato (<i>heparan sulphate proteoglicans</i>)
IDL	lipoproteína de densidade intermediária (<i>intermediate-density lipoprotein</i>)
IMC	índice de massa corpórea
LCAT	lecitina colesterol aciltransferase (<i>lecithin-cholesterol acyltransferase</i>)
LRTG	lipoproteínas ricas em triglicérides
LDL	lipoproteína de densidade baixa (<i>low-density lipoprotein</i>)
LDL-C	colesterol da lipoproteína de densidade baixa (<i>low-density lipoprotein</i>)
LH	lipase hepática (<i>hepatic lipase</i>)
LIPC	gene da lipase hepática
LP	lipoproteínas

LPL	lipoproteína lipase (<i>lipoprotein lipase</i>)
PL	fosfolípidos (<i>phospholipids</i>)
PLTP	proteína de transferência de fosfolípidos (<i>phospholipid transfer protein</i>)
QM	quilomícrons
SR-B1	receptor de varredura classe B tipo 1 (<i>scavenger receptor class B 1</i>)
TG	triglicérides
TRC	transporte reverso de colesterol
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa (<i>very-low density lipoprotein</i>)

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição calórica e química da refeição administrada e da dieta ocidental recomendada para homens ou mulheres adultos de acordo com Recommendation Dietary Allowances (RDA), 1989.

Trabalho Científico 1

Tabela 1: Clinical and fasting biochemical data before tibolone (BT) treatment, after tibolone (AT) and in controls (CTL)

Trabalho Científico 2

Tabela 1: Triglyceridemia after the fat rich meal in Wistar rats, C57/BL6 mice, control men and women

Trabalho Científico 3

Tabela 1: Clinical and fasting biochemical data in individuals with diminished (d) or increased (i) activity of cholesteryl ester transfer protein (CETP) and in controls (CTL)

Tabela 2: Correlation coefficients between average common carotid intima-media thickness and clinical and biochemical data in women with diminished or increased cholesteryl ester transfer protein

Lista de Figuras

Figura 1: Transporte Reverso de Colesterol

Figura 2: Estrutura Tridimensional da CETP

Figura 3: O mecanismo proposto para a heterotroca

Figura 4: Estrutura Tridimensional da Lipase Hepática

Trabalho Científico 1

Figura 1: A - Postprandial Plasma Triglycerides; B - Plasma Cholesterol; C - Cholesterol in Triglycerides Rich-Lipoproteins; D - Triglycerides in Triglycerides Rich-Lipoproteins in a Patient Before Tibolone, After Tibolone and in Controls; E - Electrophoresis of Triglycerides Rich-Lipoproteins

Trabalho Científico 2

Figura 1: Postprandial serum triglycerides in rodents and human

Trabalho Científico 3

Figura 1: Postprandial lipemia in individuals with high (h) activity of cholesteryl ester transfer protein (CETP) and controls (CTL).

Resumo

Resumo

A resposta pós-prandial a uma sobrecarga de gordura apresenta efeitos pró-aterogênicos diretos por deposição de lipoproteínas remanescentes na parede arterial e, indiretos sobre o metabolismo de lipoproteínas ricas em triglicérides. Alterações durante a lipemia pós-prandial podem estar relacionadas com as atividades das proteínas de transferência de ésteres de colesterol e da lipase hepática. Estas duas proteínas possuem papel ambíguo no desenvolvimento da aterosclerose e sua atuação sobre o metabolismo de lipoproteínas ricas em triglicérides pós-prandiais é muito pouco descrita na literatura. Estudamos as repercussões metabólicas em mulheres assintomáticas (n=28) após uma refeição oral única, líquida e rica em gordura em indivíduos apresentando deficiência primária de CETP e LH com coletas de sangue seriadas até 8h. A seleção dos casos foi feita através da determinação de valores de corte para CETP e LH, iguais ou menores aos percentis 10 ou iguais ou maiores que os percentis 90 de uma população normolipidêmica (n=129). Os indivíduos que possuem atividade das proteínas entre os percentis 10 e 90 foram selecionados como controles. A mulher que apresenta deficiência múltipla (CETP -79% e LH -88%) possui aumento da lipemia pós-prandial que foi atenuada após um ano de tratamento de reposição hormonal com Tibolona. Analisando um grupo de 6 indivíduos com um aumento médio de 33% de CETP, obtivemos curvas dos lipídeos pós-prandiais similares aos controles, em contraste com os relatos de casos com lipemia aumentada e deficiência de CETP. Este modelo demonstra uma ausência de um efeito de CETP na lipoproteína rica durante seu aumento moderado, provavelmente devido a falta das mudanças no transporte reverso do colesterol e igualmente a ausência dos triglicérides de um efeito direto da proteína de transferência no metabolismo lipoproteínas ricas em triglicérides. O estudo pós-prandial que usa modelos de roedores foram também realizados; observamos após uma sobrecarga oral da gordura que camundongos de ambos os sexos e ratos fêmeas apresentam lipemia pós-prandial com características similares aos seres humanos normolipidêmicos. Uma distinta resposta foi observada nos ratos machos que são mais sensíveis à dieta apresentando lipemia tardia

Palavras chave: lipemia pós-prandial, aterosclerose, proteína de transferência de ésteres de colesterol, lipase hepática.

Abstract

Abstract

The postprandial response to a fat overload presents proatherogenic direct effects with remanent lipoproteins deposition in arterial walls and indirect on the triglycerides-rich lipoprotein metabolism. Alterations during the postprandial lipemia are related with the activities of cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase. These two proteins possess ambiguous roles in the development of atherosclerosis and their performance on the triglycerides-rich lipoprotein metabolism is very scarcely described in the literature. We studied the metabolic repercussions in asymptomatic women (n=28) after a single liquid and rich in fat oral meal in individuals presenting primary deficiency of CETP and HL with serial collections of blood up to 8h. The selection of participants was made through cutoff values for CETP and HL either equal or lower or equal or higher than percentiles 10 and 90 of a normolipidemic population (n=129). The individuals that presented activities of proteins between percentiles 10 and 90 were selected as controls. In a case-report here described a woman who presented multiple deficiencies (CETP= -79% and HL= -88%) had increased postprandial lipemia that was attenuated one year of hormonal treatment with Tibolone, a result not described yet in the literature. Analyzing a group of 6 individuals with an average CETP increase of 33%, we obtained postprandial lipids curves similar to controls, in a sharp contrast with the case report with increased lipemia and CETP deficiency. This model demonstrates an absence of a CETP effect on triglyceride rich lipoprotein during its moderate increase, probably due the lack of changes in the reverse cholesterol transport and also the absence of a direct effect of the transfer protein on triglyceride-rich lipoprotein metabolism. As well postprandial studies using rodent models were performed; we observed after an oral overload of fat that mice of both the sexes and female rats present postprandial lipemia with characteristics similar to normolipidemic humans. A distinguished response was observed in male rats that are more sensible to the diet with the presence of the delayed and late lipemia.

Keywords: postprandial lipemia, atherosclerosis, cholesteryl ester transfer protein, hepatic lipase.

Introdução

1. Introdução

Aterosclerose

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de mortalidade no mundo sendo responsáveis por 16,6 milhões de morte/ano, e contribuindo aproximadamente com um terço de todos os eventos fatais. Neste contexto, as doenças do coração correspondem a 7,2 milhões dos óbitos/ano e o acidente vascular cerebral (AVC) a 5,5 milhões.

A aterosclerose é uma doença crônica, progressiva e grave da parede arterial de natureza imuno-inflamatória. As alterações do endotélio podem ser classificadas como de origem hemodinâmica, química, imunológica, ou infecciosa (Tegos et al., 2001; van Oostrom et al., 2003; Vigna et al., 2004; Maggi et al., 2004).

Sugere-se que a lesão do endotélio inicia-se na camada íntima com a ativação da expressão de sítios fixadores de monócitos na superfície celular, denominados molécula de adesão da célula vascular1 (VCAM-1) e agentes quimiotáticos de monócitos, a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1). Os monócitos são atraídos pelo endotélio e migram para dentro da íntima, transformando-se em macrófagos. A lipoproteína de baixa densidade (LDL) plasmática atravessa o endotélio, acumula-se no espaço intersticial sub-intimal e forma complexos com componentes do tecido conectivo (colágeno, elastina, proteoglicanos). Em diferente processo, a LDL pode ser oxidada no espaço sub-endotelial por radicais livres e oxigênio, que provavelmente são secretados pelo endotélio. Estas formas oxidadas podem atravessar o endotélio e serem reconhecidas por um receptor especial na superfície do macrófago. Os macrófagos carregados de lípidos constituem as células espumosas. Complexos de proteoglicanos de LDL e lipoproteína(a) (LP(a)) existem na camada íntima e podem ser internalizadas por macrófagos por fagocitose (Tegos et al., 2001; Hyson et al., 2003; Blackburn et al., 2003a; Huff et al., 2003; Herron et al., 2004). Com a evolução da doença ocorre a proliferação de outras células, como as células musculares lisas (Mahley et al., 2006; Huff et al., 2003) transformando-se de estrias gordurosas para placas fibrosas. A lesão pode complicar-se com hemorragia, trombose e ruptura de placa.

Clinicamente, a aterosclerose pode se manifestar por acidente vascular cerebral, doença coronariana ou doença vascular periférica (Tegos et al., 2001).

A aterosclerose possui origem multifatorial. Está intimamente associada a fatores de risco principais como tabagismo, hipertensão arterial, diabetes mellitus, histórico familiar positivo, sexo (Quintão et al., 1992; Mahley et al., 2006; Tegos et al., 2001), outros fatores de risco são: obesidade, estresse, inatividade física, (Mahley et al., 2006; Tegos et al., 2001; Blackburn et al., 2003 b; Sanders et al., 2003), idade, alcoolismo e dislipidemias, que são modificações das concentrações plasmáticas de lípidos e/ou lipoproteínas (Tegos et al., 2001).

Numerosos estudos clínicos e epidemiológicos têm relacionado fortemente a diminuição da concentração plasmática da lipoproteína de alta densidade (HDL) e o aumento da LDL com o desenvolvimento de doença arterial coronariana (DAC) (Young et al., 2004). Baixa concentração de lipoproteína de alta densidade (HDL) circulante é um fator de risco independente para DAC (Assmann et al., 2003).

Metabolismo de lipoproteínas plasmáticas

As lipoproteínas (LP) são partículas esféricas compostas por lípidos complexos agregados a proteínas. Exercem a função de transporte plasmático de ácidos graxos, colesterol e vitaminas lipossolúveis entre o intestino, o fígado e os tecidos periféricos. Sua composição, tamanho e densidade são os determinantes que os classificam (Camera et al., 1999; Vigna et al., 2004). Sob ultracentrifugação, classes diferentes são descritas: quilomícrons (QM), lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), LDL e HDL (Stein et al., 1998; Hyson et al., 2003; Tsuji et al., 2004; Herron et al., 2004).

Os ácidos graxos são os principais lípidos geradores de energia para todos os tecidos do organismo, com exceção do cérebro. São constituintes de lípidos complexos, componentes estruturais importantes em todas as membranas celulares (Camera et al., 1999); também são precursores de hormônios esteróides e de ácidos biliares e mensageiros intra e extracelulares (Camera et al., 1999; Mahley et al., 2006).

Os lípides complexos, tais como colesteril-éster (CE), triglicérides (TG) e fosfolípidos (PL), e as proteínas (apolipoproteínas) específicas são organizados na estrutura lipoprotéica conforme a sua solubilidade em meio aquoso. Mantêm o CE e TG na região apolar hidrofóbica do núcleo da partícula e PL, colesterol não-esterificado ou livre (CL) e apolipoproteínas na monocamada externa superficial hidrofílica (Camera et al., 1999).

As apolipoproteínas (apo) estão classificadas em grupos A, B, C, D, E e seus subgrupos (Stein et al., 1998). Estão presentes nas lipoproteínas e tem funções metabólicas distintas. São diferenciadas através de sua estrutura, pelo comportamento físico-químico e pela distribuição nas várias lipoproteínas (Stein et al., 1998; Humphries et al., 2004).

O metabolismo das lipoproteínas plasmáticas inicia-se com a absorção da gordura minutos após a ingestão da dieta. Os lípidos sofrem emulsificação pelos sais biliares e PL. Lipases provocam a hidrólise parcial dos TG, PL e CE, e formam como produtos monoacilglicerol e ácidos graxos livres (AGL); lisofosfolípidos e AGL; CL e ácido graxo, respectivamente. Estes são absorvidos após atravessarem a monocamada de água, que reveste os enterócitos transportadores, por absorção via gradiente de concentração. No citoplasma, monoacilglicerol, lisofosfolípidos, AGL e CL são direcionados ao retículo endoplasmático (RE), sendo estes lípidos transportados através de proteínas fixadoras de ácidos graxos (FABP) (Camera et al., 1999; van Oostrom et al., 2003).

No interior do RE dos enterócitos, os AGL sob a ação de enzimas específicas formam ésteres de Coenzima-A (HS-CoA) que resintetizam TG, PL e CE. Ao mesmo tempo, na membrana do RE está sendo sintetizada a apoB-48 que é translocada para o interior do RE, iniciando a formação estrutural dos QM (Camera et al., 1999). Estes são transferidos para o complexo de Golgi, onde se ligam às apoA-I e apoA-II da superfície. Posteriormente são transportados por via linfática e ducto torácico chegando à circulação sistêmica (Quintão et al. 1992; Camera et al., 1999).

Metabolismo de Lipoproteínas ricas em Triglicérides

Os QM são lipoproteínas ricas em TG presentes no plasma pós-prandial, que transportam 98 – 99% de lípidos (85 – 90% TG) e 1 – 2% de proteínas, portanto caracterizam-se por partículas de baixa densidade (<0,95 g/mL) e grande diâmetro (> 1000

Å) (Mahley et al., 2006), diferenciadas pela quantidade de TG e colesterol dietético (Kenneth et al., 2001). Quando sintetizados pelos enterócitos possuem em sua estrutura somente apo B-48, AI e AII as duas últimas são transferidas às HDL. Durante a circulação linfática adquirem apoE, que é moduladora da associação de QM à receptores da superfície da célula, além de apoC-II e C-III, respectivamente co-fatores positivo e negativo da atividade de lipoproteína lipase (LPL); ambas transferidas da HDL para outras lipoproteínas (Camera et al., 1999; Mahley et al., 2006).

Os QM no plasma ligam-se através da apoE aos proteoglicanos da superfície celular endotelial, e sob a ação lipolítica da lipoproteína lipase, enzima que atua na hidrólise principalmente do TG, resultam em molécula de glicerol (monoacilglicerol ou diacilglicerol) e moléculas de AGL. Os AGL liberados no plasma circulam ligados à albumina (Camera et al., 1999; Sanders et al., 2003). Estes são utilizados como fonte de energia para adipócitos, hepatócitos e células musculares (Quintão et al., 1992). Este processo ocorre em cascata e continua a ser estimulado até que a concentração de TG diminua de 20 a 50 %; as apoA-I, A-II e C transferidas para a HDL diminuem o diâmetro da LP, formando remanescentes de QM (QMrem), avidamente captados pelo fígado. A meia vida dos QM na circulação é muito curta, cerca de 10 minutos (Camera et al., 1999). Os QMrem entram através dos sinusóides hepáticos no espaço de Disse (Quintão et al., 1992; Camera et al., 1999), onde adquirem maiores quantidades de apo E, ligam-se aos hepatócitos através de proteoglicanos por interação iônica e sob a ação da lipase hepática (LH), reduzindo mais conteúdo de TG da lipoproteína. São então reconhecidos pelos receptores hepáticos, o receptor LDL ou B/E e a proteína relacionada ao receptor LDL (LRP) e internalizados pelos hepatócitos (Camera et al., 1999).

Os QM e seus remanescentes estão implicados na patofisiologia da aterosclerose. Os pacientes normolipidêmicos com doença arterial coronariana exibem um retardo no catabolismo quando comparado com pacientes normolipidêmicos sem DAC (Sposito et al., 2003).

As VLDL apresentam uma estrutura menor em tamanho (300- 700Å) e maior em densidade (< 1,006 g/mL), com composição de 85% - 90% de lípidos (55% TG, 20% CL, 15% PL) e 10 - 15% proteínas, dentre elas a apoB-100 (versão hepática da apo B), apoC e apoE (Mahley et al., 2006). São partículas endógenas, sintetizadas pelo fígado por estímulo

de elevada concentração de AGL nos hepatócitos, oriundos da ingestão de gorduras da dieta, por mobilização de AGL do tecido adiposo por períodos prolongados de jejum ou nos diabetesmellitus descompensado. Submetem-se ao mesmo processo de metabolização dos QM, com exceção do tempo de meia vida na circulação que é de algumas horas.

A hidrólise das VLDL resulta em partículas remanescentes ou IDL. São agregados intermediários encontrados em pequenas quantidades no plasma (Mahley et al., 2006). Possuem como principal componente protéico a apoB-100 produzida no fígado e a apoE. Geram em curto período de tempo as LDL através de duas vias metabólicas: 1) no fígado, onde são fixadas em proteoglicanos de heparan sulfato, captadas e interiorizadas através dos receptores B/E com degradação nos hepatócitos; e 2) no plasma, transformada pela ação da LPL em LDL no endotélio extra-hepático que hidrolisa TG e PL (Camera et al., 1999).

As LDL apresentam uma densidade de 1,019 – 1,063 g/mL, 200 Å de diâmetro, e composição de 75% de lípides (35% CE, 10% CL, 10% TG e 20%PL) e 25% de proteínas (apoB-100 e traços de apoE). São as lipoproteínas com o maior conteúdo em colesterol, representando 70% do total plasmático (Mahley et al., 2006). Apresentam uma meia vida de 2 a 3 dias na circulação.

Parte das LDL presente no plasma é catabolizada nos hepatócitos via receptores B/E ou receptores de LDL (Mahley et al., 2006). Inicia-se este processo pela interação das LDL com os receptores de alta afinidade em depressões revestidas (“coated pits”) por clatrina (proteína elástica) na membrana celular. As LDL são internalizadas por invaginações, que formam vesículas endocíticas as quais fundem-se com lisossomos intracelulares; as LDL, sob a ação de enzimas hidrolíticas, transformam apolipoproteínas em aminoácidos, CE, TG e PL em substratos menores, liberados no citoplasma (Stein et al., 1998; Quintão 1992; Camera et al., 1999).

O colesterol liberado é precursor para a produção de substratos como hormônios esteróides e ácidos biliares. Quando o conteúdo celular de colesterol está aumentado ocorre inibição da síntese endógena desta molécula (Camera et al., 1999; Huff et al., 2003), o que promove a homeostasia, com regulação das concentrações de colesterol. Três conseqüências ocorrem nesta situação:

- Bloqueio da hidroximetilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), que é a enzima chave na biossíntese de colesterol;
- Inibição da síntese de receptores de LDL, promovendo o bloqueio da captação de colesterol das LP pelas células;
- Aumento da atividade da acil-colesterol aciltransferase (ACAT), enzima com função de esterificar o CL dentro das células, mantendo o colesterol destas em forma de gotículas (Quintão 1992).

A apoB-100 é mediadora de ligação das LDL aos receptores B/E e apresenta uma afinidade menor ao receptor do que as apoE contidas nas VLDL e IDL plasmáticas. Estas lipoproteínas, portanto competem por afinidade pelo mesmo receptor caracterizando as elevadas concentrações de LDL plasmática (Mahley et al., 2006).

As lipoproteínas ricas em triglicérides (LRTG) são convertidas em lipoproteínas remanescentes (LPR) após passarem por processos graduais de hidrólise pela ação da lipoproteína lipase. Os QMrem são derivados dos QM sintetizados no intestino delgado. Os remanescentes de VLDL (VLDLrem) são derivados das VLDL sintetizadas no fígado (Kawakami et al., 2005).

As LPR, bem como as LDL oxidadas, são facilmente captadas pelos macrófagos na parede das artérias, promovendo a formação de células espumosas iniciando a lesão aterosclerótica. Os mecanismos pelos quais esses fenômenos ocorrem ainda estão em discussão. Tanaka (2004) descreve um receptor de apoB-48, que reconhece essa apoB-48 nas LPRTG e as incorpora aos macrófagos, derivados dos monócitos. O receptor de apoB-48 foi reconhecido por ser diferente dos receptor “scavenger” e do receptor de LDL, que incorporam a LDL modificada ao macrófago (Tanaka 2004).

Ensaio para lipoproteínas remanescentes de colesterol têm sido desenvolvidos, e o “Framingham Heart Study” relatou que os níveis dessas lipoproteínas são melhores preditoras de doença cardio vascular (DCV) do que os níveis de TG, particularmente em mulheres (McNamara et al. 1992). Em indivíduos com diabetes as elevações dos níveis de lipoproteínas remanescentes de colesterol são maiores do que os níveis de TG (Jacobson et al. 2007).

Metabolismo da HDL e Transporte Reverso de Colesterol

As HDL são LP heterogêneas com a função de remover CL dos tecidos extra-hepáticos o fígado. Transferem CE na presença de CETP para as lipoproteínas VLDL, IDL e LDL (Camera et al., 1999; Quintão 1992). Possuem na sua superfície apoE e C que recebem de outras LP (Mahley et al., 2006).

A HDL apresenta-se na forma de estruturas esféricas com diâmetro de 70 – 120 Å, densidade de 1,063 – 1,210 g/mL e compostas por 50% de lípides (25% PL, 15% CE, 5% AGL e 5% TG) e 50% de proteínas, sendo principalmente as apoA-I (65%) e A-II (25%) e menores quantidades de apoC e E. Apresentam duas subclasses principais: HDL₂ (d = 1,063 – 1,125 g/mL) e HDL₃ (d = 1,125 – 1,21 g/mL) (Mahley et al., 2006; Wang et al., 2004).

As HDL podem ser originadas de três fontes metabólicas: 1) fígado (Camera et al., 1999; Quintão 1992; Mahley et al., 2006), com a geração de HDL nascentes discoidais contendo fosfolípidos, apo AI; 2) intestino, através da síntese direta de HDL contendo apo AI (Mahley et al., 2006); 3) hidrólise de LP ricas em TG (como os QM, QMrem e VLDL), que durante o processo lipolítico liberam componentes da superfície, como apoA-I, PL e CL, que formam a HDL discoidal no plasma (Huuskonen et al., 2001) Mahley et al., 2006 Quintão 1992).

O efeito anti-aterogênico da HDL ocorre, em parte, por sua propriedade de transportar lípidos, principalmente o colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, o que é conhecido como transporte reverso do colesterol (TRC) (Lima et al., 2006).

A HDL nascente ou pré-beta HDL ao entrar no plasma e interstício (Quintão 1992) remove CL dos tecidos extra-hepáticos, através de adsorção passiva de colesterol da membrana celular e de outras LP, por um gradiente de concentração físico-químico ou por transporte facilitado, através de uma proteína fixadora da superfície celular, a adenosine-triphosphate-binding cassette protein ou proteína transportadora de adenosina trifosfato (ABCA1) (Kwiterovich, 2000). Para manter sua hidrofília diminuída com a saída de CL (Mahley et al., 2006), a lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) na HDL converte CL à CE, tendo a apoA-I o seu co-fator positivo. Com a formação de núcleos ricos em CE, as HDL tornam-se menos densas, com maior tamanho e mais esféricas dando origem às

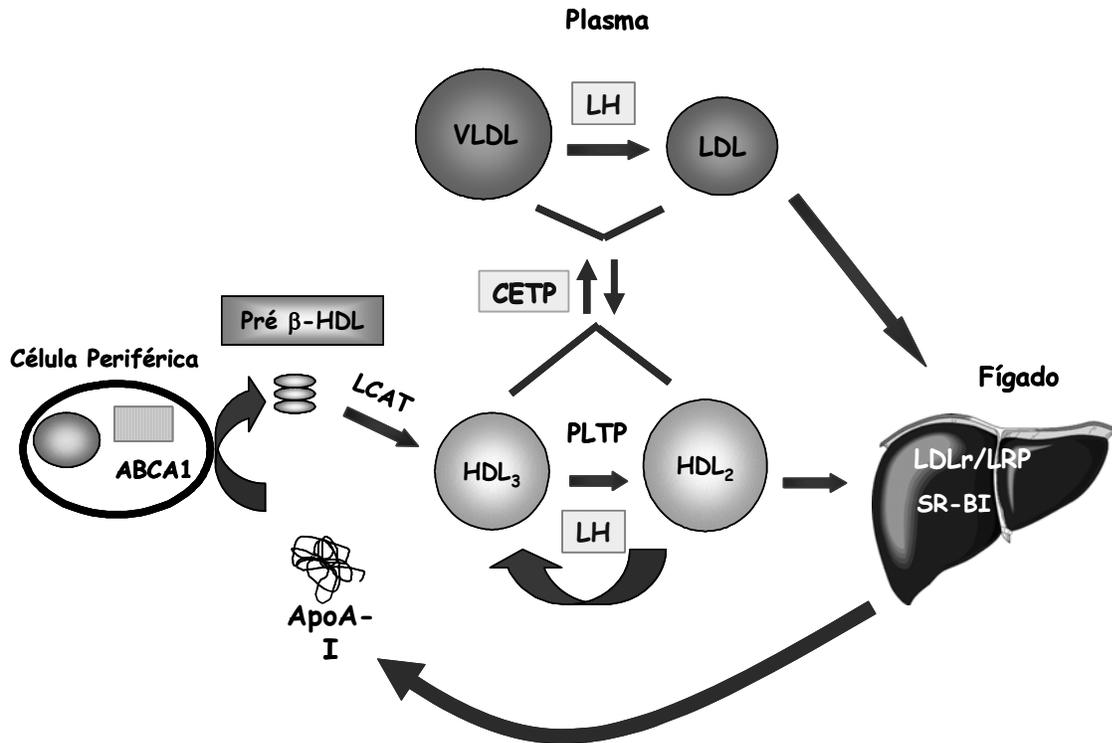
HDL₂. Nestas LP podem estar aderidas, apoA-I ou apoA-I e A-II (Mahley et al., 2006; Quintão 1992).

O fenômeno de remodelamento plasmático, o principal responsável pelo metabolismo dessa fração lipoprotéica, ocorre mais rapidamente do que o tempo de permanência da HDL na circulação (três a cinco dias) (Brinton, 2003). Um dos resultados do remodelamento das HDL por fatores como CETP, LH e PLTP é a formação de apoA-I pobre em lípidos que pode ser reincorporada na formação de novas HDL ou tem excreção renal. Uma vez formada, a apoA-I pobre em lípidos captará o colesterol celular através do ABCA-1, dando início à formação de uma nova HDL (Fredenrich et al., 2003). Assim, a geração de apoA-I pobre em lípidos é um fator determinante da taxa de efluxo do colesterol celular (Lima et al., 2006).

A fração HDL₂ transporta CE para o fígado via transporte reverso de colesterol que envolve duas etapas (Figura 1):

- Indireta, induzida por uma proteína de transferência (CETP), a qual transporta CE das HDL₂ para QM, QMrem, VLDL e LDL, em troca com o TG. Esta é a principal via (Mahley et al., 2006; Quintão 1992; Guerin et al., 2003; De Grooth et al., 2004);
- Direta, onde TG e PL da HDL₂ na circulação hepática hidrolisados pela LH modificam a composição e aumentam a massa protéica da HDL₂. Então o CE é transferido para o fígado através de receptores específicos (Quintão 1992), o receptor de varredura classe B, tipo 1 (SR-B1) (Mahley et al., 2006; Kwiterovich, 2000), que é abundantemente expresso no fígado e nos tecidos esteroideogênicos das adrenais e ovários (Yamashita et al., 2001; Kwiterovich, 2000). Esta HDL poderá também ser internalizada e degradada (Kwiterovich, 2000).

Por sua vez, as HDL₂ ricas em TG, continuamente hidrolisadas por LH, convertem-se em HDL₃, mais densas, que exercem a função de acceptoras de CL e reiniciam o ciclo de captação do colesterol no organismo (Mahley et al., 2006; Quintão 1992).



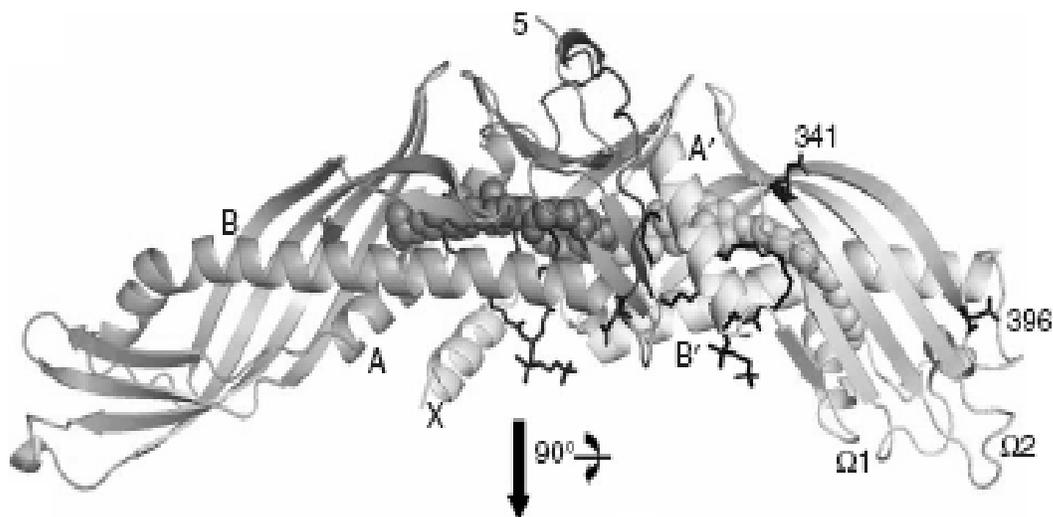
Modificado de Lima et al., 2006

Figura 1: Transporte Reverso de Colesterol

Outras propriedades ateroprotetoras importantes da HDL, além do TRC, têm sido descritas em diversos modelos experimentais e estudos epidemiológicos. Essas propriedades incluem: ações antioxidante e antiinflamatória, inibição da expressão de moléculas de adesão celular, ativação de leucócitos, indução da produção de óxido nítrico (NO), regulação da coagulação sanguínea e da atividade plaquetária e antiapoptótica (Assmann et al., 2003).

A proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) é também uma proteína de transferência de lípidos que tem como função promover o transporte de fosfolípidos das lipoproteínas ricas em TG para a HDL durante a lipólise das LTRG gerando as pré-beta HDL (Yamashita et al., 2001).

Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol (CETP)



Qiu et al, 2007.

Figura 2: Estrutura Tridimensional da CETP

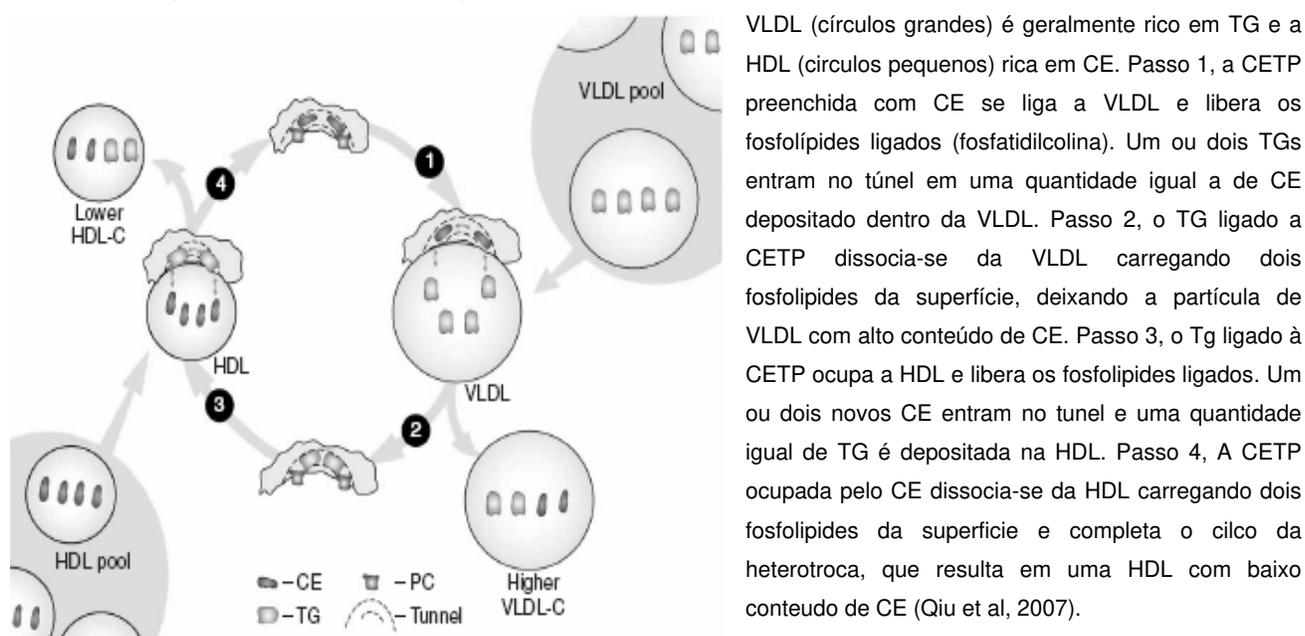
A CETP é uma glicoproteína hidrofóbica plasmática (Izem et al, 2001; Yamashita et al., 2001; Nagano et al., 2004) cujo gene está localizado no cromossomo 16 (16q12-16q21) (Drayna et al., 1987) sendo formada por 476 resíduos aminoácidos, com 45% de caráter apolar (Yamashita et al., 2001).

Apresentando uma forma de “boomerangue” alongado com dimensões de 135 Å x 30 Å x 35 Å, a CETP possui quatro unidades estruturais, sendo dois sítios de ligação de lípidos neutros e dois sítios de ligação para fosfolípidos (Figura 2) (Qiu et al., 2007). Estudos usando técnicas bioquímicas e proteínas de diversas fontes têm sugerido que 1mol de CETP liga 0.9-1.4mol de CE, 0.1-0.5 mol de TG e 1.3-1.7 mol de PL (Connolly et al. 1996; Clark et al., 2006).

O processo de transferência de lípidos é complexo e é principalmente dependente da concentração de CETP no plasma, assim como, da quantidade e da composição dos lípidos neutros nas lipoproteínasceptoras e doadoras. Além das trocas rápidas que ocorrem entre os quase equilibrados "pools" de LDL e HDL ricos em CE, as transferências no plasma prosseguem pela heterotroca (Figura 3) entre os “pools” não-equilibrados de HDL

(doadores de éster) e aceptores contendo-apoB, as lipoproteínas ricas em triglicérides (Mahley et al., 2006).

A CETP é expressa em vários tecidos em quantidades significativas nos humanos, macacos e coelhos (Mahley et al., 2006). As maiores fontes de RNA mensageiro da CETP em humanos são o fígado, o baço e o tecido adiposo (Izem et al, 2001; Yamashita et al., 2001), e em menores quantidades o intestino delgado, glândula adrenal, rim, coração e músculo esquelético. A CETP é também sintetizada por macrófagos, linfócitos B, adipócitos, hepatócitos e linhagens de células do hepatoma humano, como células HepG2 e CaCo-2 (Yamashita et al., 2001).



VLDL (círculos grandes) é geralmente rico em TG e a HDL (círculos pequenos) rica em CE. Passo 1, a CETP preenchida com CE se liga a VLDL e libera os fosfolípidos ligados (fosfatidilcolina). Um ou dois TGs entram no túnel em uma quantidade igual a de CE depositado dentro da VLDL. Passo 2, o TG ligado a CETP dissocia-se da VLDL carregando dois fosfolípidos da superfície, deixando a partícula de VLDL com alto conteúdo de CE. Passo 3, o Tg ligado à CETP ocupa a HDL e libera os fosfolípidos ligados. Um ou dois novos CE entram no túnel e uma quantidade igual de TG é depositada na HDL. Passo 4, A CETP ocupada pelo CE dissocia-se da HDL carregando dois fosfolípidos da superfície e completa o ciclo da heterotroca, que resulta em uma HDL com baixo conteúdo de CE (Qiu et al, 2007).

Figura 3: O mecanismo proposto para a heterotroca

A secreção de CETP está diretamente relacionada com o acúmulo intracelular de CE, sugerindo que esta proteína pode funcionar para manter a homeostasia intracelular de colesterol durante a diferenciação e a resposta a um excesso de colesterol acumulado (Yamashita et al., 2001; Guerin et al., 2002; Tsuji et al., 2004).

Nas dislipidemias o efeito da atividade de CETP sobre a estrutura e a composição da lipoproteína pode variar dependendo da elevação de aceptores para as lipoproteínas ricas em colesterol-éster ou de aceptores de lipoproteínas ricas em triglicérides (Zak et al., 2005).

As concentrações de CETP plasmáticas podem ser influenciadas pelo colesterol dietético (Izem et al, 2001; Yamashita et al., 2001), hiperlipidemia, hormônios e drogas. Sua atividade é modulada pela massa da CETP, pelo “pool” de LP aceptoras e por um inibidor na circulação (Izem et al, 2001), a proteína inibidora da transferência de lípidos (LTP).

A CETP apresenta um papel essencial no metabolismo de lípidos podendo afetar a suscetibilidade ou a resistência à aterosclerose (Mahley et al., 2006; van Oostrom et al., 2003; Vigna et al., 2004).

Teoricamente, a CETP induz a redução de CE na HDL e seu aumento em VLDL e LDL cria uma situação pró-aterogênica, portanto, sua deficiência seria considerada um estado anti-aterogênico. Porém, estudos recentes com Japoneses da área de Omagari, no Japão, que apresentavam HDL-C plasmático aumentado (Yamashita et al., 2001; Nagano et al., 2004) e homens japoneses-americanos, do Havaí com HDL plasmático maior que 40 mg/dL, em ambos os estudos com deficiência de CETP, mostraram elevada incidência de aterosclerose (Yamashita et al., 2001; Mahley et al, 2006).

Novas Funções da CETP

Salerno et al. (2007) mostraram em camundongos transgênicos para CETP e que super-expressam apoC-III que a elevação de níveis da apoC-III no plasma agrava a obesidade induzida por dieta e a expressão de níveis fisiológicos de CETP inverte este efeito adipogênico, sugerindo um novo papel da CETP na modulação da adiposidade. (Salerno et al., 2007).

A CETP funcionando como uma via alternativa para a captação de HDL-CE pelo fígado, foi descrita pelo grupo de Harder (2007), onde a expressão de CETP atenuou marcadamente o desenvolvimento da aterosclerose em ratos deficientes de SR-BI e alimentados com dieta aterogênica. A expressão do transgene humano de CETP protege ratos deficientes de SR-BI da aterosclerose, indicando uma nova função para a CETP (Harder et al., 2007).

Polimorfismos da CETP

Os polimorfismos TaqIB e I405V estão associados com reduzida atividade da CETP e aumento das concentrações plasmáticas de HDL-C (Bruce et al., 1998).

Na forma homozigótica para o raro alelo (genótipo VV) o polimorfismo I405V está associado com a redução da atividade da CETP, e com mudanças nas concentrações de HDL-C e LDL-C (Okumura et al. 2002; Boekholdt et al., 2004).

O polimorfismo I405V está localizado no exon 14 do gene da CETP, onde ocorre uma substituição de isoleucina para valina (Bruce et al., 1998). Estudos recentes associaram este polimorfismo ao aumento das concentrações de HDL-C (Isaacs et al., 2007). Boekholdt e Thompson (2003), fizeram uma meta-análise sobre polimorfismos da CETP, avaliando os efeitos do TaqIB e 405V sobre a massa e atividade da proteína e também com aumento das concentrações plasmáticas de HDL-C. A massa foi comparada somente para o polimorfismo I405V. O genótipo VV apresentou massa 0.19mg/dL menor do que o genótipo II e esta redução está associada com aumento na HDL-C.

No “Rotterdam Study” (Isaacs et al., 2007), um estudo prospectivo com 7983 indivíduos, os portadores do alelo V tiveram aumento das concentrações de HDL-C em ambos os sexos, mas, somente em homens houve a diminuição do risco do infarto do miocárdio.

Com relação ao polimorfismo TaqIB, vários estudos relatam a associação entre as concentrações de HDL-C e o fragmento do polimorfismo no intron 1 do gene da CETP (Ordovas et al., 2000).

A presença ou ausência do sítio de restrição da TaqI aponta para três possíveis genótipos: B1B1, B1B2, e B2B2. Indivíduos com B1B1 têm baixos níveis de HDL-C comparados com os indivíduos com o alelo B2 (Mohrschladt et al., 2005).

Deficiência de CETP

A deficiência genética de CETP é causa de concentrações elevadas HDL-C em humanos, e, portanto, essa proteína é considerada chave no metabolismo de HDL (Rader, 2007; van der Steeg et al., 2007).

A deficiência de CETP é uma síndrome hereditária (Tall, 1993) que, embora seja rara, leva à disfunção não incomum na população japonesa (Inazu et al., 1994). Em homozigotos há uma marcada elevação das concentrações de HDL-C ($> 100\text{mg/dL}$) e possível proteção contra a DAC (Inazu et al., 1990). Heterozigotos têm um moderado aumento das concentrações de HDL-C. A diminuição da atividade da CETP resulta na diminuição do transporte de CE da HDL para as lipoproteínas que contem apoB. Como resultado, mais CE encontram-se na HDL e a razão entre colesterol total e HDL-C está reduzido. Presumidamente, neste estado, a combinação de quantidades reduzidas de LDL aterogênicas e aumento de HDL antiaterogênicas diminuem a susceptibilidade à aterosclerose (Mahley, 2006).

Indivíduos com deficiência em CETP possuem várias modificações na concentração, composição e funções de HDL e LDL. Humanos com deficiência de CETP, secundárias a diferentes mutações genéticas, apresentam níveis elevados de HDL plasmático, com subfrações de HDL₂ aumentada e HDL₃ mantida, e moderado aumento do colesterol total. A apo AI, CIII e E também estão elevadas e apo B normal ou pouco diminuída. Ocorrem alterações na quantidade de CE e TG das LP envolvidas no processo, gerando HDL ricas em CE e pobres em TG, enquanto as frações de VLDL e LDL apresentam reduzido CE. Estas mudanças podem causar prejuízo do efluxo de colesterol dos macrófagos carregados de lípidos pelas HDL saturadas, conforme demonstrado *in vitro* (Yamashita et al., 2001; Nagano et al., 2004).

A deficiência total ou crônica de CETP quebra a homeostase de lípidos circulantes e compromete a função de armazenamento do TG dos adipócitos. A ineficiente translocação de CE e TG mediado por CETP do retículo endoplasmático a seu local do armazenamento pode parcialmente explicar estes defeitos. Estudos em células adiposas relatam um novo papel para CETP no transporte e no armazenamento intracelular de lípidos. Coletivamente, estes achados são consistentes com a conclusão de que a deficiência de CETP faz com que o CE e o TG acumulem no RE, tendo por resultado o exagerado armazenamento de lípidos e o rompimento da sua via metabólica (Izem et al., 2007).

Entretanto, em células deficientes em CETP é observado que a taxa da biossíntese do colesterol é reduzida significativamente e que estas células eram incapazes de regular a biossíntese de esterol apropriadamente em resposta ao estímulo. Esta síntese diminuída do

colesterol é acompanhada da dependente diminuição da atividade do receptor de LDL e do aumento dependente dos níveis da proteína ABCA1. Estes dados sugerem fortemente que a deficiência da CETP quebra a homeostase do esterol induzindo uma detecção errônea do status do esterol da célula, talvez com a modificação de pools regulatórios do esterol no RE. Esses achados, que podem ser extrapolados ao tecido adiposo, sugerem um papel importante para CETP em regular as funções múltiplas dos adipócitos (Izem et al., 2007).

A atividade da CETP poderia determinar prejuízos na depuração LRTG, visto que o aumento desta atividade está associado com o grau de lipemia por aumento de aceptores. Por outro lado, estados de deficiência de CETP poderiam associar-se a maior remoção plasmática de LP no período pós-prandial (Syeda et al, 2003).

A composição dos ácidos graxos da dieta pode causar o aumento da sua atividade, demonstrado em experimentos no qual foi observado um aumento da atividade de CETP em dietas compostas por AG poliinsaturados (Tholstrup, et al., 2001).

Depois de mais de duas décadas de tratamento de pacientes, com doença arterial coronariana (DAC) com estatinas, é evidente que menos de 50% dos pacientes responderam favoravelmente, enquanto os outros continuam a desenvolver a DAC. Na maioria dos que não responderam ao tratamento, baixas concentrações de HDL-C plasmático foram encontradas. As estatinas aumentam o HDL-C em cerca de 10% e os fibratos em mais que 20%, mas novos medicamentos para aumentar o HDL-C estão sendo tentados. Desde a descoberta de que a deficiência da CETP resulta em um pronunciado aumento de HDL no plasma, a sua inibição tornou-se um novo alvo terapêutico (Stein e Stein, 2005).

Lipase hepática ou triacilglicerol lipase hepática



Ibara D, 2007

Figura 4: Estrutura Tridimensional da Lipase Hepática

A LH é uma glicoproteína que catalisa a hidrólise de TG e PL das lipoproteínas, apresentando capacidade de tri, di e monoglicéride-hidrolase, além de fosfolipase (Figura 4). A maior parte da LH é sintetizada e secretada pelo fígado e liga-se aos proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG) na superfície das células endoteliais dos sinusóides, além da superfície externa dos microvilos das células parenquimatosas do espaço de Disse (Ramsami et al., 2000).

A sua inibição lipolítica está associada à habilidade diferencial que têm as lipoproteínas de remover a LH de proteoglicanos, pois enquanto LDL e VLDL são incapazes de deslocar LH, a HDL facilmente o faz, com a participação de apoA-I (Ramsami et al., 2000).

Há evidências de que a LH desempenha ação importante na conversão de HDL₂ em HDL₃, reduzindo a concentração de PL e TG na sub-fração HDL₂ (Rao et al., 1982).

Devido aos múltiplos papéis desempenhados pela LH no metabolismo lipoprotéico, é difícil concluir neste momento qual é o seu potencial papel aterogênico. Considerando-se os dados disponíveis, poderia se afirmar que se a LH metaboliza a HDL e apresenta a sua

função diminuída, o efeito de aumentar os níveis de HDL-C não estaria associado a maior risco de causar aterosclerose (Thuren, 2000).

Polimorfismos da LH

Os níveis da expressão da atividade da LH podem ser influenciados por obesidade, colesterol intracelular, terapias que visam baixar as concentrações lipídicas e principalmente pelas variações genéticas. Aproximadamente 20-30% da variação individual da atividade parece estar relacionada a presença de polimorfismos comuns na região promotora do gene da lipase hepática (LIPC) (Eller et al., 2005; Rufibach et al., 2006).

O LIPC possui tamanho de 135 Kb, está localizado no cromossomo 15 (q15-q21) e codifica 449 aminoácidos, é composto por oito introns e nove exons (Hasham e Pillariseti 2006). Na região proximal o gene da LH contém quatro sítios polimórficos: -514T/C, -250A/G, -710C/T e -763G/A (Perret et al., 2002; Isaacs et al., 2004; Zhao et al., 2006) identificados na região 780 bp à montante do início da transcrição (Deeb et al., 2003) que podem influenciar as concentrações de lípidos e lipoproteínas plasmáticas (Andersen et al., 2003; Zhao et al., 2006).

Diversos estudos na literatura mostraram que a frequência do polimorfismo no LIPC o -514C/T tem a frequência de 17 a 27% em brancos, 44 a 54% em americanos africanos, 47% em hispânicos, 37% em coreanos e 50% em japoneses (Miljkovic-Gacic et al. 2006); o -205 G/A é de 20,3% em pacientes com DAC (Eller et al., 2005); o -710 T/C foi de 20,7% em homens saudáveis (Van't Hooft et al., 2000); o -763A/G é de 21% em pacientes com infarto do miocárdio (Andersen et al., 2003).

Considerando que grande parte dos resultados dos estudos de relação entre a atividade da HL e doença arterial coronariana (DAC) são produto da análise de pequenos grupos, casos-controles, e, portanto, controversos, Cohen et al. (1999) analisaram estatisticamente dois estudos com grande número de indivíduos. Jansen et al. (1997) encontraram maior frequência de DAC documentada por angiografia em 782 homens nos quais o alelo mutado (514T) era mais frequente. O estudo de Shoet et al. (1999) comparou um grupo de voluntários saudáveis com portadores de aterosclerose coronariana, também comprovada por angiografia. Os resultados indicaram que a prevalência do alelo -514T era

insignificante nos pacientes com DAC em relação aos controles. A análise estatística rigorosa, ao comparar os dados dos dois estudos, mostrou uma frequência idêntica deste alelo entre pacientes e controles; isto sugere que se houver alguma magnitude de risco atribuída a esse alelo, é mínima (Cohen et al., 1999). No entanto, Faggini et al. (2002) encontraram associação do polimorfismo de LH -514 C para T com placas ateroscleróticas instáveis, sendo que o genótipo CC mostrou maior incidência de eventos isquêmicos cerebro-vasculares do que pacientes CT/TT.

Deficiência de LH

A deficiência da lipase hepática é uma desordem associada com a falta da atividade da lipase hepática no plasma. Eles apresentam hiperlipidemia combinada com altos níveis de colesterol (250 a 1500 mg/dL) e triglicérides (395 a 8200 mg/dL), xantomas palmar e opacidade prematura das córneas (Maley et al., 2006). Os níveis de β -VLDL são aumentados e as frações de LDL e HDL possuem de três a cinco vezes os triglicérides aumentados (Maley et al., 2006).

A deficiência da LH origina HDL ricas em TG, que são bons substratos para a atuação da lipoproteína lipase (Alarcon et al., 2004). Quando apresenta atividade aumentada, a LH leva ao aumento da prevalência de partículas aterogênicas, LDL pequenas e densas, com maior risco para DAC. Este efeito foi observado em homens, comparados a mulheres pré-menopausadas e em indivíduos obesos, comparados a magros. Se a atividade de LH está reduzida, com os níveis de LDL-C normais ou reduzidos, pode haver prejuízo do TRC e do catabolismo de remanescentes, mas com baixo risco de aterosclerose (Zamboni et al., 2003).

Lipemia pós-prandial

O metabolismo lipídico pós-prandial refere-se a uma série de eventos metabólicos que ocorrem seguidas à ingestão de uma refeição contendo lípidos (Roche et al., 2000). A duração do período pós-prandial depende do balanço entre esvaziamento gástrico e remoção dos QMrem pelo fígado (Kenneth et al., 2001; Sanders et al., 2003). A absorção de lípidos induz a secreção de partículas intestinais, QM, que elevam acentuadamente os níveis

de TG plasmáticos (Lassel et al., 1999). Em indivíduos normolipidêmicos, a duração do processo estende-se de 4 a 6 horas, e em indivíduos com algum tipo de alteração no perfil de lípides, o período da lipemia pós-prandial pode ser de mais de 6 horas (Kenneth et al., 2001). Tal fato foi previamente relatado por Weintraub e colaboradores (1997), que verificaram a presença de QM e remanescentes no plasma de indivíduos normolipidêmicos e também hiperlipidêmicos após a ingestão de gordura. Nestes últimos, a presença é por período mais prolongado. Os quilomícrons remanescentes estão associados ao aumento do risco de desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardiovasculares (Sanders et al., 2003).

O período de lipemia pós-prandial pode ser mensurado através de dois métodos convencionais: administração intravenosa de lípides ou ingestão de gorduras na alimentação, o teste de tolerância à gordura (Kenneth et al., 2001).

A LPP tem sido associada com alterações quantitativas e qualitativas do perfil lipídico, as quais estão positivamente relacionadas com a progressão do risco de doença cardiovascular (Thomas et al., 2001). Tal fato ocorre por uma lenta remoção, acúmulo e deposição de QM e seus remanescentes, produzidos durante o período pós-prandial, nas paredes das artérias, determinando lesões ateroscleróticas (Kenneth et al., 2001; Lassel et al., 1999; Vigna et al., 2004).

A natureza da resposta pós-prandial apresenta efeitos pró-aterogênicos diretos e indiretos do metabolismo de LRTG. Uma elevada resposta da lipemia pós-prandial propõe diversos eventos metabólicos, incluindo a produção de QMrem aterogênicos, a formação de pequenas partículas aterogênicas de LDL e redução da concentração de frações HDL cardioprotetoras (Roche et al, 2000; Guerin et al., 2002; Hyson et al., 2003; Blackburn et al., 2003). Alguns autores sugerem que as elevadas concentrações de β -VLDL aterogênicas durante a LPA causam acúmulo de colesterol e formam células espumosas em macrófagos (Kenneth et al., 2001; Huff et al., 2003).

Atualmente, vários estudos sobre LPA têm sido utilizados para identificar o metabolismo de lípides em diferentes situações: com dietas compostas por diferentes quantidades, grau de saturação e comprimento da cadeia de ácidos graxos (AG) (Tholstrup et al., 2001, Thomas et al., 2001); durante o exercício físico (Thomas et al., 2001) e em diversas patologias, principalmente em diabete melito e dislipidemias.

Outras alterações que ocorrem na LPP ainda não estão bem esclarecidas, mas podem estar relacionadas principalmente com a atividade da LPL, LH, CETP (Thomas et al., 2001). A ativação da lipoproteína lipase é um fator que está diretamente ligada ao metabolismo de QM (Tholstrup et al., 2001; Humphries et al., 2004). Quanto à LH, a sua inibição ou deficiência leva a um prejuízo na remoção de QMrem pelo fígado (Kenneth et al., 2001).

O consumo de gorduras na dieta ativa as vias do transporte reverso de colesterol permitindo a remoção eficiente do colesterol das células, tanto quanto a rápida depuração das partículas de LP alimentares ricas em TG após a remodelação intravascular. Este mecanismo é anti-aterogênico em indivíduos normolipidêmicos. Pelo contrário, sabe-se que indivíduos com hipercolesterolemia e hiperlipidemia mista, a CETP pode ter um papel pró-aterogênico, pela geração de partículas LDL densas e aterogênicas (Lassel et al., 1999; Herron et al., 2004).

Em indivíduos normolipidêmicos, Lassel et al. (1999) propuseram que a CETP poderia mediar o transporte de CE durante a LPA por duas vias: 1) direta, com transferência de CE entre HDL e LP ricas em TG; 2) indireta, onde CE da HDL é primeiramente captado pela LDL e secundariamente transferido para os QM, demonstrando assim a capacidade potencial da LDL em doar CE.

Lipemia pós-prandial e aterogênese

Vários estudos relacionando a lipemia pós-prandial à espessura íntima-média da carótida (EIM-C) têm sido descritos (Bosquit et al. em 1999). Em 1998, Karpe et al., demonstraram uma correlação significativa e independente de EIM-c com concentrações de LDL-C e níveis de TG pós-prandial tardio em homens saudáveis de meia idade. Bosquit et al. (1999), em um grupo com características semelhantes, verificaram que o TG pós-prandial é um forte determinante de aterosclerose prematura, independente dos outros fatores de risco tais como hipertensão, tabagismo, hipercolesterolemia e aumento da idade, e do LDL colesterol. Karper et al. (2001) verificaram uma relação positiva entre EIM-c e o colesterol de partículas remanescentes, mostrando ser independente do TG e LDL-C plasmáticos.

Na fase pós-prandial devido a viabilidade limitada da LPL, ocorre uma competição que pode resultar em um acúmulo de LRTG (Alipour et al., 2007). Essa competição geralmente ocorre na hipertrigliceridemia do jejum de pacientes com síndrome metabólica, diabetes mellitus tipo 2 e hiperlipidemia familiar combinada (HLFC) (Lewis et al., 1991). Aproximadamente 40% de pacientes com DAC prematura têm seus lípidos, no jejum, normais (Genest et al., 1991), mas eles têm um retardo no “clearance” de lipoproteínas pós-prandial (Patsch et al., 1992; Weintraub et al., 1996).

Aumento das LRTG na resposta pós-prandial e o acúmulo de partículas remanescentes ricas em colesterol se mantém como marcador para DAC e aterogênese em sujeitos com ou sem diabetes (Karpe, 1994). Entretanto, a excessiva lipemia pós-prandial deve ser o mais importante contribuidor para DAC que pode ser assumido somente pelos valores de TG (Matikainen, 2007).

O aumento das LRTG na circulação tem efeitos adversos no metabolismo de HDL e LDL bem como na parede arterial (Blackburn, 2003). As LRTG podem atravessar diretamente a parede do vaso e causar disfunção endotelial e estresse oxidativo (Zhao et al., 2001; Guerin et al., 2002; Ceriello et al., 2002; Hyson et al., 2003; Sanders et al., 2003). Essas lipoproteínas têm a capacidade de promover o desenvolvimento de aterogênese severa, com a formação de células musculares lisas e macrófagos em células espumosas (Huff et al., 2003).

Outro aspecto de aterogenicidade da LPP é sua interação com o processo de trombose, onde elevada concentração de LP ricas em TG tem a habilidade de ativar o fator VII de coagulação, assim como o inibidor de ativação de plasminogênio (Roche et al., 2000).

Indivíduos com hiperalfalipoproteinemia (HALP) têm sido investigados como modelo experimental para avaliar a relação entre o HDL-C e a instalação da aterosclerose (Zhong, 1996). Mutações, variações alélicas e polimorfismos nas regiões codificadoras e regulatórias do gene da CETP têm sido descritos, e em grande parte das vezes, acompanhados de HALP, com pronunciadas alterações bioquímicas e funcionais de HDL e LDL (Yamashita et al., 2000).

Terapia de Reposição Hormonal – Tibolona

Usado frequentemente como alternativa à terapia de reposição hormonal tradicional, a determinação da influência da Tibolona no metabolismo de lipídeos no pós-prandial é importante. A Tibolona [(7 α , 17 α)-17-hydroxy-7-methyl-19-norpregn-5-en-20-yn-3-one] é um esteroide sintético com propriedades estrogênicas, androgênicas, e progestogênicas e é usado para prevenir sintomas da síndrome do climatério (Kicovic et al., 1982) e a osteoporose pós-menopausal (Bjarnason et al., 1996, Rymer et al., 1994, Lindsay et al., 1980).

Vários autores descrevem os efeitos benéficos da Tibolona nos triglicérides do jejum (Farish, 1999), onde há a diminuição de TG sem interferir no peso corporal e na pressão arterial (Wheba, 2000).

Objetivos

2. Objetivos

1- Investigar os efeitos da atividade da proteína de transferência de ésteres de colesterol ou das lipases, lipase hepática ou lipoproteína lipase, sobre o metabolismo pós-prandial de lipoproteínas plasmáticas em humanos com deficiência da proteína de transferência de ésteres de colesterol ou aumento e deficiência de lipases.

2- Descrever a trigliceridemia pós-prandial em ratos Wistar e em camundongos C57BL/6 de ambos os sexos, modelos animais sem a proteína de transferência de ésteres de colesterol, comparando-a à observada em humanos.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

Casuística

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, tendo o parecer n.º 681/2005. Os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética (ANEXO 1).

Foram triados para o estudo 100 indivíduos adultos saudáveis, e a partir desses, foram selecionadas 50 mulheres, entre controles e portadores de hiperalfalipoproteinemia (HALP) definida por uma concentração plasmática de HDL-C de valor percentil 90, ou seja, com valores de HDL-C iguais ou maiores que 68 mg/dL (de Faria et al. 2003, estudo de uma população local saudável não publicado). Foram excluídos diabéticos, portadores de nefropatias, de hepatopatias, pneumopatias, câncer, doenças crônicas debilitantes, tabagistas e etilistas.

Para tal, os voluntários foram submetidos a exame clínico no Ambulatório de Dislipidemias do Hospital de Clínicas da Unicamp onde foram determinados os índices de massa corporal (IMC), circunferência de cintura (CC), pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) e, então, encaminhados à Central de Coleta do Hospital das Clínicas à exames laboratoriais de triagem em jejum de 12h para afastar patologias renais, hepáticas, diabetes mellitus e demais patologias: colesterol total, HDL-C, LDL-C, VLDL-C, triglicérides, lipoproteína (a), glicose, hormônio tireo-estimulante (TSH), aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama glutamil transferase (GGT), uréia, creatinina, ácido úrico.

Os indivíduos com atividades reduzidas de CETP ou LH foram definidos respectivamente por valores de CETP e LH iguais ou inferiores a 4,5% de transferência de ésteres de colesterol (CETP) ou de 462 nmol de AGL/mL/hora (LH), e os com atividades altas definidos como de iguais ou superiores à 23,7% de transferência de ésteres de colesterol ou 4758 nmol AGL/mL/hora de LH (valores referentes aos percentis 10 e 90 de um grupo de 148 pacientes controle).

Os pacientes incluídos no protocolo retornaram em nova visita ao HC-Unicamp, em jejum de 12 horas, para o teste de tolerância à gordura. Assinaram, nesta fase, um termo de consentimento pós-informação conforme modelo em anexo 1.

Em uma terceira visita, após aproximadamente 10 dias do teste de tolerância a gordura, as participantes foram submetidas a uma coleta de sangue pré e pós heparina para a determinação das atividades das enzimas lipoproteína lipase e lipase hepática no plasma.

Na quarta visita os pacientes foram submetidos à ultra-sonografia de carótidas na Clínica de Imagem e Ultra-sonografia Diagnóstica, Campinas, SP, sendo responsável o médico radiologista Dr. Rui Nakamura.

Teste de tolerância à gordura

O teste foi realizado na sala de Procedimentos Especializados da Disciplina de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica ou no Laboratório de Lípidos do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental.

Foi iniciado com uma punção venosa com coleta de aproximadamente 25 mL de sangue (no tempo zero hora), após jejum de 12 horas, para a determinação de glicose, colesterol total, triglicérides, HDL-C, LDL-C, apo AI, apo B e colesterol e triglicérides de lipoproteínas ricas em TG.

Em seguida as voluntárias receberam uma refeição oral na forma de milk-shake (leite em pó NAN® - isento de lactose, da Nestlé, diluído em água) na dose de 40g/m² de superfície corporal. A ingestão da refeição padrão foi feita com duração de 10 minutos e com um volume médio aproximado de 400mL. A Tabela 1 mostra as características da refeição administrada.

Tabela 1 - Composição calórica e química da refeição administrada e da dieta ocidental recomendada para homens ou mulheres adultos de acordo com Recommendation Dietary Allowances (RDA), 1989.

Valor Calórico Total e Massa de Nutrientes	Refeição Mulher* 266g leite	Dieta Ocidental Mulher (por dia)	Refeição Homem ** 296g leite	Dieta ocidental Homem (por dia)
Valor Calórico Total	1335	2200	1489	2900
Lípides (g)	66	73-98	74	97-129
Carboidratos (g)	151	248-275	168	326-363
Proteínas (g)	33	55-138	37	73-181
AG Moninsaturados (g)	23	30-37	26	39-49
AG Polinsaturados (g)	13	15-21	14	20-27
AG Saturados (g)	26	29-38	29	38-50

Mulher adulta de 20 anos, 60 Kg peso corporal, 1,65 m de altura, 1,66 m² superfície corporal; **Homem adulto com 20 anos, 70 Kg peso corporal, 1,75 m de altura, 1,85 m² superfície corporal. AG = ácidos graxos.

Foram realizadas novas coletas de sangue (cerca de 15mL) nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas, após a administração da dieta, para as seguintes análises bioquímicas: respostas lipêmicas de colesterol, triglicérides, LDL-C, HDL-C, apolipoproteínas A-I e B100, ácidos graxos livres, fosfolípidos e colesterol e triglicérides de lipoproteínas ricas em TG.

Coleta de sangue Pré e Pós Heparina

As voluntárias retornaram ao HC-UNICAMP, após aproximadamente 10 dias do teste de tolerância a gordura, tiveram o sangue coletado após jejum de 12 horas e em seguida foi administrado 100UI/Kg de heparina (Liquemine®, Roche, São Paulo, SP) intravenosa. Após 15 minutos, foram coletados 5mL de sangue em tubo contendo EDTA.

Ultrassonografia “doppler” das artérias carótidas

Os sujeitos foram encaminhados à ultrassonografia *doppler* das carótidas no máximo de 15 dias após a realização do teste de tolerância a gordura. Para a medida do espessamento da camada íntima-média das artérias carótidas, os sujeitos foram examinados em posição deitada, com a cabeça elevada em cerca de 20 graus com rotação de 45 graus. A ultrassonografia doppler foi realizada através dos aparelhos ATL HDI 1500 e 3500 Ultrasound System (Advanced Technology Laboratories Ultrassound, Bothell, EUA) e Logic 400 (General Electric Healthcare, Milwaukee, EUA), com transdutores lineares de 6-9 MHz. O protocolo, em todos os casos, foi realizado pelo mesmo médico radiologista e consistiu de várias medidas longitudinais de segmentos das artérias carótidas comuns direita e esquerda (Carallo et al. 1999, Poredos 2004). Os resultados foram expressos como média aritmética das espessuras em milímetros das carótidas direita e esquerda.

Este procedimento foi realizado na Clínica de Imagem e Ultra-sonografia Diagnóstica, Campinas, SP, sendo responsável o Dr. Rui Nakamura, colaborador do estudo.

Ultracentrifugação preparativa seqüencial para isolamento de lipoproteínas ricas em triglicérides

Uma amostra de 4-5 mL de plasma, contendo EDTA 0,1% (10uL de EDTA 10%/mL de sangue) foi obtida no jejum e em todos os tempos após a refeição rica em gordura para obtenção de fração $d < 1,006$ g/mL, através de ultracentrifugação preparativa seqüencial (De Lalla et al., 1954), em ultracentrífuga Beckman - modelo L5-75B, Palo Alto, no rotor 50.3 Ti a 10°C e 40.000g, encontrada no Serviço de Bioquímica Clínica do

Departamento de Patologia Clínica. A fração foi obtida após 16 horas de ultracentrifugação a 40.000 rpm por aspiração da camada sobrenadante sob sistema à vácuo.

Nesta fração, para cada tempo, foram determinadas as concentrações de colesterol total e triglicérides.

As sub-frações 2 ($d=1.063-1.125$) e 3 ($d=1.125-1.21$) de HDL por microultracentrifugação (Airfuge, Beckman) (Thomas et al., 1977).

Processamento das amostras: de jejum e após sobrecarga de gordura

As análises bioquímicas foram realizadas no Serviço de Bioquímica do HC-UNICAMP e no Laboratório de Lípidos do Núcleo de medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

As amostras de soro e plasma, quando não foram processadas imediatamente, foram armazenadas em freezer -80°C .

O colesterol total, triglicérides, HDL-C, e glicose foram dosados por métodos enzimático-colorimétricos, em sistema de automação Modular Hitachi Roche. A fração VLDL-C foi estimada através da equação de Friedewald ($\text{TG}/5$).

A apo A-I e apo B100 foram mensuradas por nefelometria através da reação imunoquímica em sistema de semi - automação Array System 360 (Beckman).

Ácidos graxos livres (Elphick, 1968; Duncombe, 1964) e fosfolípidos (Yee and Jackson, 1978; Takayama et al., 1977; Baginski et al., 1972) e colesterol livre foram dosados por métodos enzimáticos colorimétricos utilizando reagentes comerciais da Waco (Osaka, Japão). Os ésteres de colesterol foram determinados pela diferença entre o colesterol total e o colesterol livre.

Determinação da Atividade da Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol

A atividade da CETP foi mensurada através da medida de transferência de CE de HDL marcada radioativamente para as lipoproteínas contendo apoB, segundo o método radiométrico exógeno (Lagrost et al., 1998). As partículas receptoras de CE (LDL e VLDL, $d < 1,063 \text{ g/mL}$) e as doadoras de CE (HDL, $d > 1,063 \text{ g/mL}$) foram obtidas por

ultracentrifugação seqüencial a partir de um *pool* de soros normolipidêmicos em ultracentrífuga, modelo L80/75B da Beckman (Beckman Instruments, Palo Alto, EUA), utilizando um rotor 50Ti. As HDL foram isotopicamente marcadas com [4-¹⁴C]-colesteril oleate (New England Nuclear, EUA) e purificadas por ultracentrifugação em gradiente descontínuo utilizando um rotor SW40 da Beckman.

Os ensaios de transferência de CE foram realizados em duplicata pela adição do doador marcado (¹⁴C-HDL diluída para 40 mg/dL de colesterol), do acceptor (VLDL+LDL diluídas para 200 mg/dL de colesterol), de tampão Tris pH 7,4 (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) e de soro como fonte de CETP. A mistura foi homogeneizada, incubada por 4 horas à 37°C, resfriada e precipitada com uma solução 1M de sulfato de dextrana e cloreto de magnésio (1:1). Após centrifugação por 15 minutos a 3000 rpm (4°C), o sobrenadante foi coletado para a contagem de radioatividade num contador de cintilação líquida Beckman modelo LS-5000 (Beckman Instruments, Palo Alto, EUA),

A porcentagem de transferência de EC é calculada pela equação: % transferência de EC = [1-(dpm amostra / dpm branco) x 100].

Determinação das Atividades de Lipoproteína Lipase e Lipase Hepática

As atividades da LPL e da LH foram obtidas por um método radiométrico através da medida da liberação de ácidos graxos livres resultantes da hidrólise de um substrato artificial de trioleína triciada (Ehnholm C. et al., 1998). O substrato foi preparado pela adição de trioleína fria [(1, 2, 3-Tris [cis-9-octadecenoleo]glicerol)] e trioleína radioativa [[(9,10³H) (N)-trioleína], atividade específica de 26,8 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, EUA) estabilizadas por uma solução de goma arábica a 5% (Sigma, St Louis, MO, EUA). A mistura foi submetida à sonicações alternadas, 8 vezes de 30 segundos em sonicador Branson Cell Disruptor (Branson Sonifier modelo 450, Danbury, EUA), com ponta de titânio de 1 cm de diâmetro. A albumina bovina sérica livre de ácidos graxos à 10% é acrescentada após a sonicação para quelar os ácidos graxos livres, e a LPL é inibida pela adição de 2M NaCl.

A reação foi incubada por 60 minutos à 37° C e interrompida com a adição de uma solução de metanol: clorofórmio: heptano (1,41: 1,25: 1; V/V/V), seguida de uma mistura

de bicarbonato de potássio/ácido bórico (pH=10,5). A radioatividade foi determinada num contador de cintilação líquida modelo LS-5000/ 75B (Beckman, Beckman Instruments, Palo Alto, EUA). A atividade de LPL foi calculada pela diferença entre as atividades de lipase total e LH e expressas como nmoles de ácidos graxos liberados/mL de plasma/ por hora.

Determinação da Proteína de Transferência de Fosfolípidos

A atividade da PLTP foi mensurada através da medida de transferência de [¹⁴C] fosfatidilcolina, entre lipossomas e HDL (Damen et al. 1982). Para preparar 1mL de lipossomas radioativamente marcados, secou-se, num frasco limpo, contendo 125µmol de fosfatidilcolina, ¹⁴C fosfatidilcolina e hidroxitolueno butilado. A mistura lipídica foi sonicada com tampão contendo NaCl (150mM), tris-HCl (10mM) e EDTA (1mM), pH7,4; repetindo por 3 vezes durante 5 minutos em gelo.

As amostras de plasma como fonte de PLTP (10µL) foram incubadas por 1 hora a 37°C com o lipossoma marcado radioativamente (125 nmol de FL), HDL (250µg de proteína) e tampão Tris, pH 7,4 (NaCl 150mM, Tris-HCl 10mM e EDTA 1mM), para um volume final de 400µL.

Os lipossomas foram precipitados com solução precipitante (500mM de NaCl, 125mM de MgCl₂ e 140U de heparina/tubo), e o sobrenadante coletado para determinar a medida da radiatividade.

A porcentagem de transferência de FL foi calculada através da equação: % de transferência de FL radioativo = (dpm amostra-dpm branco/dpm total-dpm branco) x 100.

Análises Moleculares: Extração de DNA

A extração de DNA genômico de leucócitos foi realizada em sangue periférico segundo o método de Salazar L.A. 1998.

O sangue total foi coletado em tubos contendo EDTA (10%, 0,1 mL). Em um tubo de microcentrífuga estéril, a 300 µL de sangue total foram adicionados igual volume de Iodeto de Sódio 6M, o que promoveu a lise celular. A mistura foi homogeneizada em

agitador de tubos por 20 segundos. Ao homogenato resultante foi acrescentada uma mistura recém preparada de 600 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (v/v, 24:1), para extração das proteínas e debris celulares. Homogeneizou-se em agitador de tubos por 20 segundos e centrifugou-se a 12.000 rpm (10700 x g) por 5 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, a fase aquosa (superior) foi cuidadosamente removida e transferida para outro microtubo estéril. Foram adicionados 400 µL de isopropanol gelado e incubados por 3 minutos para a precipitação do DNA genômico. Centrifugou-se à 12.000 rpm (10700 x g) por 5 minutos, à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com álcool isopropílico a 37% e centrifugado à temperatura ambiente, 12.000 rpm (10700 x g) por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado de DNA após secar a temperatura ambiente foi ressuspensão em 100 µL de tampão TE pH 8,0 (Tris-HCl 10mM; EDTA 0,1mM;), incubado por 10 minutos a 56°C e armazenado a -20°C.

A quantificação e a análise do grau de pureza (relação de absorvância de 260/ 280 nm) dos extratos de DNA foram realizados em espectrofotômetro após a diluição das amostras (1:50) em tampão TE. A integridade das moléculas de DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris a 90 mM, ácido bórico a 90 mM e EDTA a 2 mM) e corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). A separação eletroforética foi realizada à 100V por 45 minutos e a visualização das bandas de DNA em transiluminador sob a luz ultravioleta.

Genotipagem dos Polimorfismos

Polimorfismo -514C/T do Gene da Lipase Hepática

O -514C/T foi determinado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizada para amplificação de 285 pares de base dos fragmentos de DNA dos pacientes em estudos. A seqüência de pares de bases foi 5'-TCT AGG ATC ACC TCT CAA TGG GTC A-3' e 5'-GGT GGC TTC CAC GTG GCT GCC TAA G-3' seguindo as seguintes condições: Tampão Taq (10x), MgCl₂ (50mM), dNTP (5mM), TaqDNA Polimerase (5U/µL), água reagente tipo estéril A reação de PCR foi iniciada com a desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação à 95°C por 1 minuto, associação à 63°C por

30 segundos e extensão à 72°C por 30 segundos, e uma extensão final à 72°C por 7 minutos. Para a verificação da amplificação do produto de PCR foi verificada por eletroforese em gel de agarose à 2,0% em tampão TBE (Tris a 90 mM, ácido bórico a 90 mM e EDTA a 2 mM) e corado com brometo de etídeo (0,8 ug/mL). A separação eletroforética foi realizada a 100V por 45 minutos e a visualização das bandas de DNA em transiluminador sob a luz ultravioleta (Fumeron et al., 1995)

Para a digestão do produto de PCR foi utilizada com 1U da enzima de restrição NlaIII. A integridade das moléculas de DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 2,5% em tampão TBE (Tris a 90 mM, ácido bórico a 90 mM e EDTA a 2 mM) e corado com brometo de etídeo (0,5 ug/mL). A separação eletroforética foi realizada a 100V por 45 minutos e a visualização das bandas de DNA em transiluminador sob a luz ultravioleta. Os fragmentos da digestão foram 300 e 215 pb para o alelo C e 85 pb para T (Ji et al., 2002).

Polimorfismo I405V da Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol

Para a determinação do polimorfismo I405V, um fragmento de 142bp no exon 14 do gene da CETP foi amplificado pela PCR, com os seguintes iniciadores *sense*: 5' – TTGACTGCAGGAAGCTCTGGC - 3' - *antisense*: 5'-TATTTTTTTCACGGATGGGCA - 3'. Para a amplificação foram utilizados 100ng de DNA genômico, em volume de 50µL contendo 40pmol de cada oligonucleotídeo, 200µM de dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 10 mM de Tris pH8,4 e 0,25U de Taq DNA polimerase. A PCR foi iniciada com a desnaturação à 95°C por 5 minutos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto em um ciclo inicial, seguida de 35 ciclos de desnaturação à 95°C por 15 segundos, hibridação à 60° por 30 segundos e polimerização à 72°C por 30 segundos. Finalmente, polimerização a 72° por 5 minutos. O produto amplificado de PCR foi digerido a 37°C durante 1 hora, com 2U de enzima de restrição Msp1, em solução tampão contendo 50 mM Tris-HCl, em pH=8,0, 10mM MgCl₂ e 50mM de NaCl. Os fragmentos da digestão foram 308bp e 268pb para o alelo I e V respectivamente (Gunadson et al., 1999).

Polimorfismo TaqIB da Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol

O polimorfismo TaqIB da CETP foi identificado conforme a descrição de FUMERON et al. (1995). Um fragmento de 535 bp do intron 1 do gene da CETP foi amplificado pela PCR com os seguintes iniciadores, *sense e antissense*: 5'-CACTAGCCCAGAGAGAGGAGTGCC-3' e 5'-CTGAGCCCAGCCGCACACTAAC-3'. Para a amplificação foram utilizados 100ng do DNA genômico, em um volume final 50µL contendo 40pmol de cada oligonucleotídeo, 200µM de dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 10mM de Tris pH 8,4 e 0,25U de Taq DNA polimerase. A PCR foi iniciada com a desnaturação a 95°C por 3 minutos. Posteriormente foram realizados mais 30 ciclos de desnaturação, a 95°C por 30 segundos, hibridação a 60°C por 30 segundos e polimerização a 72°C por 45 segundos. Finalmente um ciclo de polimerização a 72°C por 5 minutos. O produto da PCR foi digerido a 65°C por 2 horas, com 4U de enzima de restrição TaqI, em solução tampão contendo 50mM de Tris-HCl, pH 8,0; 10mM de MgCl₂; 50mM NaCl. O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídeo em tampão Tris-Borato-EDTA, durante 1 hora a 90V. Os fragmentos da digestão foram 174 e 361 bp para o alelo B1 e 535 bp para o alelo B2.

Para garantir que não houve contaminação nos processos acima descritos, foi utilizado um controle negativo composto de um mix para cada conjunto de reação (contendo todos os reagentes, exceto o DNA), amplificado junto com as reações teste.

As análises dos polimorfismos TaqIB e I405V da CETP foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Lípidos USP/Ribeirão Preto, com a coordenação de Dr José Ernesto dos Santos.

Polimorfismo do gene da Apolipoproteína E

A amplificação dos 244 pares de base (pb) do fragmento localizado no exon 4 do gene da ApoE e foi realizado num termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc, EUA). Os amplímeros direto e reverso foram 5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3' e 5'-ACAGAATTTCGCCCCGTGGTACAC-3', conforme descrito por Emi e colaboradores (Emi et al, 1998). A reação de amplificação foi realizada com 100ng de DNA genômico,

150 μ M de cada DNTP (desoxinucleotídeos), tampão 10X PCR (25mM Tris-HCl, 2,5mM MgCl₂, 50mM KCl, pH 8,3), 10% DMSO (dimetilsulfóxido), 15pmol de cada amplímero e 0,75U de Taq DNA polimerase para um volume final de 25 μ L. a reação de PCR foi iniciada com a desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, associação a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, e uma extensão final a 72°C por cinco minutos. O produto de PCR (10 μ L) foi digerido com 5U de enzima de restrição HhaI (Invitrogen, EUA) a 37°C por 3 horas em solução tampão contendo 50mM Tris-HCl, pH 8,0; 10mM MgCl₂; 50 mM NaCl. O produto de digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 4% (50% agarose e 50% agarose 1000, Invitrogen, EUA) contendo brometo de etídio em tampão Tris-Borato-EDTA por 1h a 90V. Os fragmentos da digestão foram visualizados num sistema de documentação de gel Alpha Imager TM 1220 (Alpha Innotec Co, EUA) para a identificação das bandas correspondentes aos polimorfismos: homozigotos E2/2 (91 e 83 pb); E3/3 (91, 48, 35 pb) E4/4 (72, 48, 35 pb); heterozigotos E2/3 (91, 83, 48,35 pb), E2/4 (91,83,72,48,35 pb), E3/4 (91,72,48,35 pb) (Hixson e Vernier, 1990).

A genotipagem da ApoE foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro-Unicamp sob coordenação de Dra. Joyce M. A. Bizzacchi

Teste de Tolerância à Gordura em Ratos e Camundongos

Ratos Wistar - peso médio de 200g

Com o animal sedado, coletas de sangue caudal foram realizadas no jejum de 12h e após a gavagem com creme de leite (1,33 mL/100g de peso) a cada 2h até completar 10h.

O soro foi separado por centrifugação de 10min a 1000rpm em temperatura ambiente e depois aliquoteado e estocado a -20°C até as realização das análises de triglicérides (método enzimático – Roche).

Camundongos C57BL/6 - peso médio de 30g

Com o animal sedado, coletas de sangue caudal foram realizadas no jejum de 12h e após a gavagem de creme de leite (1,33 mL/100g de peso) a cada 1h até completar 6h.

O plasma foi separado por centrifugação de 10min a 1000rpm em temperatura ambiente e depois aliqotado e estocado a -20°C até as realização das análises de triglicérides (método enzimático – Roche).

Análises estatísticas

Foram aplicadas análises descritivas e testes comparativos: Mann-Whitney, Qui-quadrado ou Wilcoxon; ANCOVA foi usada para pareamento dos grupos.

A taxa fracional de aquisição (TFA) foi mensurada pelas inclinações ascendentes monofatoriais e a taxa fracional de remoção (TFR) pelas inclinações descendentes monofatoriais, utilizando-se a análise de regressão linear do coeficiente angular (Montgomery, 1982)

Foram realizadas medidas de redução das curvas após a inspeção visual destas individualmente e nos grupos medidas das áreas sob as curvas (AUC) e das áreas incrementais sob as curvas (AUIC) pelo método trapezóide.

Os coeficientes de correlação (r^2) foram estimados pelo teste de Spearman.

Análises de regressão linear multivariada foram realizadas com utilização do critério de stepwise para a seleção de variáveis.

Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$ e os programas utilizados foram SPSS e SAS.

Resultados

4. Resultados

Trabalho Científico 1 - *Case Report* – será submetido ao *Menopause*

**TIBOLONE TREATMENT REVERSED INCREASED POSTPRANDIAL LIPEMIA
IN A POST-MENOPAUSAL WOMAN WITH CETP, HL AND LPL
DEFICIENCIES**

Urban A^a; Nakamura RT^b; Bizzacchi JMA^c, de Faria E.C.^{a,d}

^aClinical Pathology, ^bRadiology and ^c Internal Medicine Departments, ^dDislipidemia Out-Patient Service, HC, State University of Campinas, São Paulo, Brazil

Correspondence:

Eliana C de Faria

Mailing address:

Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Clinical Pathology Department, FCM, University of Campinas, São Paulo

Barão Geraldo

CEP: 13084-971 – Campinas, SP, Brazil

Telephone: 0055 19 352187064

FAX: 0055 19 35219434

E-mail: cotta@unicamp.br

ABSTRACT

Tibolone, a synthetic steroid with estrogenic, androgenic, and progestogenic properties relieves climacteric symptoms and prevents postmenopausal bone loss. The effects of Tibolone treatment (2.5mg/day) for one year on postprandial lipid metabolism was demonstrated in a healthy 53y post-menopausal woman with cholesterol ester transfer protein, hepatic and lipoprotein lipase deficiencies probably due to compound heterozygosity of TaqIB, I405V cholesterol ester transfer protein (CETP) and -514C/T hepatic lipase (HL) polymorphisms. Hyperalphalipoproteinemia was present and coexisted with postprandial fat intolerance. She presented apolipoprotein E E3/E3 genotype. A group of three pre-menopausal asymptomatic control women (38 to 41 y) participated in this study. The lipid metabolism markers were measured at baseline and after a three year interval and the negative differences were in cholesterol (C), triglycerides (TG), VLDL-C, apoB100 and HDL-C. Increased postprandial lipemia was probably due to increased VLDL production and decreased CETP exchange of VLDL-TG. Carotid intima-media thickness (IMT) increased more than for the expected age gap. Tibolone treatment reversed postprandial hyperlipemia in post-menopausal women. This could indicate increased intravascular lipid metabolism. Tibolone has been described as a drug that reduces TG and cholesterol as well as cardiovascular risk markers (7). As far as we know, this is the first documented report that describes an association between reversal of fat intolerance and Tibolone treatment in women.

CASE REPORT

At the age 53 a women (PJR) was admitted at the Nefrology Department of the State Hospital at the University of Campinas, São Paulo, Brazil (04/08/98), as a kidney donor to her son. At this time she was hydrated, afebrile, normotense, with a cardiac frequency equal to 64 beats/ min, and no clinical signs or symptoms of diseases. She was not using any medications but presented irregular menstrual bleeding, hot flushes and irritability. She had been treated for one year before with Elamax[®], 1 pill a day (estradiol valerate 2mg and ciproterone acetate 1mg).

After the successful kidney donation (09/02/98) the patient was referred to the Dislipidemia. Out-patient Service for a follow up of hyperalphalipoproteinemia (HDL-C= 68mg/dL, 90th percentile from a previous healthy population (n=1700). The patient's parents, brothers, sisters and children presented lipid profiles in the recommended ranges and were asymptomatic.

A few months later she was selected to participate in a postprandial research protocol. At this time the fasting laboratory tests (03/17/2004) were as shown in Table 1 and all within reference ranges. An oral fat tolerance test (OFTT) was performed beginning by venous puncture after a 12-h fast followed by ingestion of a milkshake prepared with lactose-free powdered milk (NAN[®], Nestlé, São Paulo, Brazil). The liquid meal contained fat (25%), dextromaltose (55%), protein (14%), and vitamins and minerals (6%), providing 40g of fat per square meter of body surface, and was given over a period up to 8h. Serial blood samples were collected at 2, 4, 6, and 8 h after the meal ingestion. Measurements were performed on samples from all time points. Triglycerides (TG), and cholesterol (Chol) in serum and in triglyceride-rich lipoproteins (TRL) (separated by sequential ultracentrifugation) were determined by a standard enzymatic methods (Roche) in and automated analytical system. The oral fat tolerance test revealed fat intolerance as compared to matched control women (n=3). (Figure 1 A, B, C, D and E). She presented very augmented and persistent triglyceridemia, cholesterolemia, cholesterol and triglycerides in triglyceride-rich lipoproteins. Searching for the cause of hyperalphalipoproteinemia we determined the activities of several proteins involved in lipid metabolism CETP, post-heparin HL and LPL and PLTP by radiometric methods: most of the results were under the 10th percentile values obtained from a healthy local population

(n=129), CETP 4.5 %; HL 754 $\mu\text{molFFA}/\text{mL}/\text{h}$; LPL 401 $\mu\text{molFFA}/\text{mL}/\text{h}$ except for PLTP 4.7 %. As compared to CTL, CETP, HL, LPL was lower and PLTP higher respectively (-79%), (-88%), (-61%) and (+13%).

Some polymorphisms of CETP and HL were determined respectively using RT-PCR, Fumeron et al. (1995), Gunadson et al., (1999) and Ji et al., (2002) (15,16,17). To exclude the effect of the allele 2 apolipoprotein E was genotyped as well (1,2). The E3/E3 genotype, similar to CTL, was not the cause of fat intolerance.

In order to observe precocious atherosclerotic complications the carotid intima-media thickness (3) was determined by doppler ultrasound twice (03/2004 and 11/2007). A higher value, after correcting for age and sex (4), than in CTL was observed, with an increase of 15% when compared to reference values. There was an increase of IMT after treatment.

The recent patient's hormone profile was FSH: 103 mUI/mL (25.8-138.8 mUI/mL), estradiol: 16.10 ng/mL (until 54.7 ng/mL) and Progesterone: 0.09 ng/mL (0.1-0.8 ng/mL) indicating a good hormonal balance after Tibolone and she was clinically asymptomatic.

The treatment was basically clinical and conservative with one year follow -up. In 2006 she started treatment with Tibolone, 2.5mg/day. In 2007 she was submitted to another OFTT and carotid IMT that revealed striking differences from the first OFTT (Table 1), with a significant improvement of fat intolerance, but not carotid in IMT.

Table 1 - Clinical and fasting biochemical data before tibolone (bt) treatment, after tibolone (at) and in controls (ctl)

SUBJECTS/ PARAMETERS	BT (2004)	AT (2007)	CTL (n=3) (2004)	BT x CTL (%)	AT x CTL (%)	BT x AT (%)
Age (y)	53	57	38	39	50	8
Sex (M/F)	F	-	F	-	-	-
BMI (Kg/m ²)	23	24	24	-3	-1	4
WC (cm)	78	82	79	-1	4	5
SBP (mmHg)	120	120	100	20	20	0
DBP (mmHg)	70	70	60	17	17	0
Carotid IMT (mm)	0.79	1.0	0.52	52	92	21
CETP (%)	4.2	ud	20	-79	-	-
HL (nmol NEFA/mL/h)	227	nd	1948	-88	-	-
LPL (nmol NEFA/mL/h)	656	nd	1696	-61	-	-
PLTP (%)	7.4	nd	7	13	-	-
CETP TaqI (B1B2+B2B2) (%)	B1B2	B1B2	67	nd	nd	nd
CETP I405V (IV+VV) (%)	IV	IV	67	nd	nd	nd
HL -514CT (%)	CT	CT	67	nd	nd	nd
ApoE (E3/E3) (%)	APOE/3E3	nd	100	nd	nd	nd
CHOL (mg/dL)	156	137	157	4	-13	-12
TG (mg/dL)	91	70	54	69	30	-23
HDL-C (mg/dL)	69	62	53	30	17	-10
HDL ₂ -C (mg/dL)	21	57	11	91	418	171
HDL ₂ -TG (mg/dL)	11	27	6	83	350	145
HDL ₃ -C (mg/dL)	53	31	40	33	-23	-42
HDL ₃ -TG (mg/dL)	16	18	12	33	50	13
LDL-C (mg/dL)	88	62	90	-2	-31	0
LDL SIZE (LDL/ApoB)	1.21	1.05	1.23	-2	-1.6	-13
VLDL-C (mg/dL)	18	14	11	64	27	-22
NHDL-C (mg/dL)	94	75	103	-9	-27	-20
NEFA (mmol/L)	0.38	nd	0.6	-35	-	-
PL (mg/dL)	242	nd	210	15	-	-
APOA-I (mg/dL)	180	180	148	22	22	0
APOB-100 (mg/dL)	73	59	66	9	-11	-19

Data as medians; ND= not determined; UD undetectable; Apo, apolipoprotein; BMI, body mass index; CE, cholesteryl ester; CETP, activity of cholesteryl ester transfer protein; CHOL, total cholesterol; DBP, diastolic blood pressure; HDL₂ and HDL₃, high-density lipoprotein subfractions; IMT, carotid intima-media thickness; LPL, activity of lipoprotein lipase; NEFA, non-esterified fatty acid; NHDL-chol, non-high-density lipoprotein cholesterol; PL, phospholipids; PLTP, activity of phospholipid transfer protein; SBP, systolic blood pressure; TG, triglycerides; WC, waist circumference. Reference ranges: CETP 16±2 - HL 2871±418 - LPL 2570±187 - PLTP 21±6.

We observed a reduction of 12% in cholesterol and 23% in triglycerides after treatment with tibolone. Although HDL-C did not change, ApoAI increased (22%), cholesterol and triglycerides in HDL₂ were respectively 3.5 to 4 times higher after treatment with tibolone, but HDL₃-C decreased by 23%.

LDL estimated particle size (1.6%), LDL-C (31%), NHDL-C (27%), apoB100 (11%) all reduced after treatment with tibolone.

There was an increase of carotid IMT (21%) probably due to the increase of age.

The figure below shows the observed variations before and after treatment in comparison to controls.

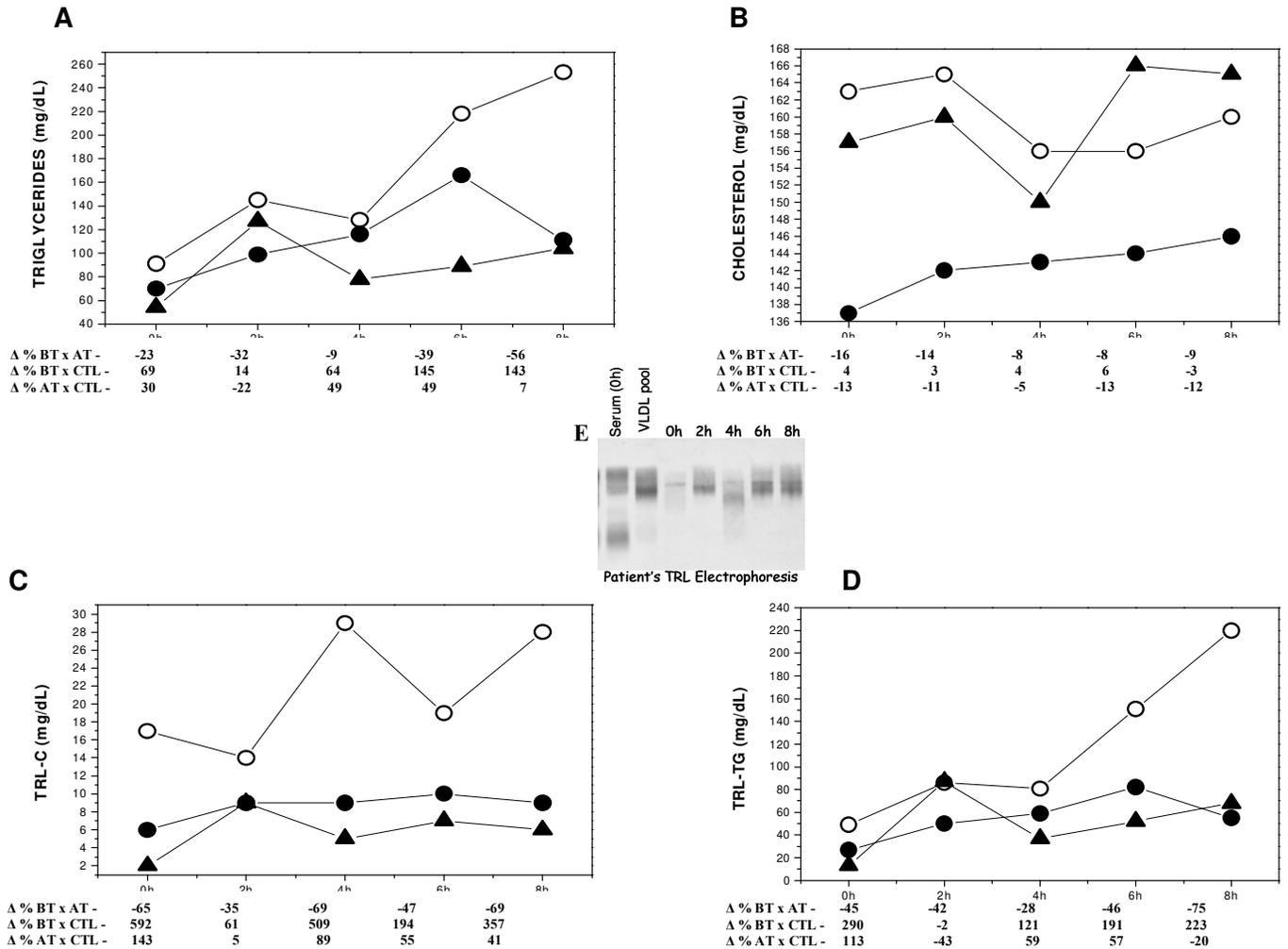


Figure 1: A - Postprandial plasma triglycerides; B - Plasma cholesterol; C - Cholesterol in triglycerides rich-lipoproteins; D - Triglycerides in triglycerides rich-lipoproteins in a patient before tibolone, after tibolone and in controls; E - Electrophoresis of triglycerides rich-lipoproteins; BT, open circle; AT, solid circle; CTL, solid triangle

Panel A presents the reduction of triglycerides with the higher percent difference in the 6th and 8th hour after the meal. Panel B displays the cholesterol response, a drastic reduction after treatment when compared with controls.

TRL-C and TRL-TG also reduced after treatment with the Tibolone, corroborating the fact that the reduction of the risks of the delayed postprandial lipemia (panel C and D). TRL electrophoresis (panel E) presents the appearance of a late TRL fraction by the 6th hour.

DISCUSSION

A relief of physical symptoms of menopause was mentioned as the reason for starting hormone therapy more often than to protect against osteoporosis (25% relative to 15%), or to prevent stroke or a heart attack (10%), or to reduce the risk of developing Alzheimer's disease (2%) (5).

As a frequently used hormone-like alternative to traditional hormone replacement therapy (HRT), it is valuable to determine the influence of Tibolone on postprandial lipid metabolism.

Tibolone [(7 α , 17 α)-17-hydroxy-7-methyl-19-norpregn-5-en-20-yn-3-one] is a synthetic steroid with estrogenic, androgenic, and progestogenic properties and is used to prevent climacteric symptoms (6) and postmenopausal bone loss (7,8,9). Several authors described the beneficial effects of Tibolone on fasting triglycerides (10) but to our knowledge this is the first study of post-alimentary lipemia. Tibolone was shown to decrease TG without interfering in body weight and blood pressure (11).

In this case report we describe fat intolerance. The enzymatic activities of post-heparin LPL and hepatic lipases were reduced. Hyperalphalipoproteinemia was explained by CETP and HL deficiencies. Clinically, patients with HL and LPL deficiencies present postprandial lipemia may present baseline hypertriglyceridemia or postprandial hyperlipemia (12).

The observed decrease in HDL-C could be explained by the action of Tibolone on HL although we have not determined post-heparin HL activity in 2007 (13) .

An important finding in this patient is the absence of signals of premature coronary artery disease. The observed increases in carotid IMT are not explained by age indicating augmented cardiovascular risk.

Our clinical, laboratory and radiological analyses support postprandial increased lipemia caused by the, CETP, HL and LPL deficiencies. We postulate that is probably triggered by the estrogen insufficiency (clinically described). When the patient was treated with Tibolone the lipemia improved drastically. Postprandial lipemia increases cardiovascular risk by producing TRL remnants that can deposit on arterial wall, by increasing coagulability decreasing fibrinolysis (14).

This is as well the first report showing Tibolone improving postprandial lipemia.

Because of the atherogenic consequences of fat intolerance detailed clinical and radiological examination should be performed in situations of estrogen deficiency to treat it correctly and to prevent hyperlipidemia. It is expected that more frequently these cases are diagnosed and perceived a more adequate treatment will be started with less risk for the patients. Also atherosclerosis prevention should be implemented in these patients in all clinical settings.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is part of the master thesis of AU. We are grateful to Juliana Tentor for recruiting of patients, to Fernanda D Santiago for apoE genotyping and to Mirian R. G. Danelon for the outstanding technical support. This work was developed in part by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

- 1- Emi M, Wu LL, Robertson MA, Myers RL, Hegele RA, Williams RR, White R, Lalouel JM. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. *Genomics*, 3 (4), 373-379: 1988.
- 2- Hixson JE, Vernier, DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with Hha I. *J. Lipid res.*, 31: 545-548, 1990.
- 3- Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2007 Jan 30;115(4):459-67.
- 4- Junyent M, Gilabert R, Núñez I, Corbella E, Vela M, Zambón D, Ros E. Carotid ultrasound in the assessment of preclinical atherosclerosis. Distribution of intima-media thickness values and plaque frequency in a Spanish community cohort *Med Clin (Barc)*. 2005 Dec 3;125(20):770-4.
- 5- Kaufert P, Boggs PP, Ettinger B, Woods NF, Utian WH. Women and menopause: beliefs, attitudes, and behaviors. The North American Menopause Society 1997 Menopause Survey. *Menopause*. 1998 Winter;5(4):197-202.
- 6- Kicovic PM, Cortes-Prieto J, Luisi M, Franchi F. 1982 Placebo-controlled cross-over study of the effects of Org OD 14 in menopausal women. *Reproduccion*. 6:81-91.
- 7- Bjarnason N, Bjarnason K, Haarbo J, Christiansen C. 1996 Tibolone: prevention of bone loss in late postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 81:2419 -2422.
- 8- Rymer J, Chapman MG, Fogelman I. 1994 Effect of Tibolone on postmenopausal bone loss. *Osteoporosis Int*. 4:314 -319.
- 9- Lindsay R, Hart DM, Krasewski A. 1980 Prospective double-blind trial of synthetic steroid (Org OD 14) for preventing postmenopausal osteoporosis. *Br Med J*. 280:1207-1209.

- 10- Farish E, Barnes JF, Fletcher CD, Ekevall K, Calder A, Hart DM. Effects of Tibolone on serum lipoprotein and apolipoprotein levels compared with a cyclical estrogen/progestogen regimen. *Menopause*. 1999 Summer;6(2):98-104.
- 11- Wheba S, Machado RB, Fernandes CE, Ferreira JAS, de Mello NR, Aldrighi JM, Baracat EC. Aspectos Clínicos E Metabólicos de Mulheres Na Pós-Menopausa Tratadas com Tibolona. *RBGO*; 2000
- 12- Ritsch A, Drexel H, Amann FW, Pfeifhofer C, Patsch JR. Deficiency of cholesteryl ester transfer protein. Description of the molecular defect and the dissociation of cholesteryl ester and triglyceride transport in plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Dec;17(12):3433-41.
- 13- von Eckardstein A, Crook D, Elbers J, Ragoobir J, Ezeh B, Helmond F, Miller N, Dieplinger H, Bennink HC, Assmann G. Tibolone lowers high density lipoprotein cholesterol by increasing hepatic lipase activity but does not impair cholesterol efflux. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003 Jan;58(1):49-58.
- 14- Weintraub MS, Grosskopf I, Rassin T, Miller H, Charach G, Rotmensch HH, Liron M, Rubinstein A, Iaina A.. Clearance of chylomicron remnants in normolipidaemic patients with coronary artery disease: case control study over three years. *BMJ*. 1996; Apr 13;312(7036):936-9.
- 15- Fumeron F, Betoulle D, Luc G, Behague I, Ricard S, Poirier O, Jemaa R, Evans A, Arveiler D, Marques-Vidal P, et al. Alcohol intake modulates the effect of a polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein gene on plasma high density lipoprotein and the risk of myocardial infarction. *J Clin Invest*. 1995 Sep;96(3):1664-71.
- 16- Gudnason V, Kakko S, Nicaud V, et al., Humphries S on behalf of the EARS Group. Cholesteryl ester transfer protein gene effect on CETP activity and plasma high-density lipoprotein in European populations. *Eur J Clin Invest*. 1999;29:116–28.

17- Ji J, Herbison CE, Mamotte CD, Burke V, Taylor RR, van Bockxmeer FM. Hepatic lipase gene -514 C/T polymorphism and premature coronary heart disease. *J Cardiovasc Risk*. 2002 Apr;9(2):105-13.

Trabalho Científico 2 – será submetido ao *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*

**DIFFERENCES AND SIMILARITIES OF POSTPRANDIAL LIPEMIA IN
RODENTS AND HUMANS**

Urban A¹, Oliveira RA², de Faria EC¹. ¹Depto de Patologia Clínica, e Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, Universidade Estadual de Campinas, SP; ²Departamento de Estatística, Instituto de Matemática e Estatística, Universidade de São Paulo, Brazil

to whom correspondence should be addressed:

Eliana Cotta de Faria

Mailing address:

Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Departamento de Patologia Clínica, FCM-UNICAMP

Caixa Postal 6111 - Barão Geraldo

CEP: 13084-971 – Campinas, SP, Brazil

Telephone: 0055 19 35217387

FAX: 0055 19 35219434

E-mail: cotta@unicamp.br

Introduction

The postprandial lipid metabolism includes a series of metabolic events that occur following the ingestion of a fat rich meal (1). In normolipidemic individuals, the duration of the process is extended to 4 to 6 hours with an absorption triglyceride peak at 2h (2), and in individuals with alteration in the lipid profile, the period is larger than 6 hours (2). Postprandial lipemia can be measured through two conventional methods either by ingestion of fats (fat tolerance test) (2) or the intravenous administration of radio labeled lipids.

The pathophysiology of postprandial lipemia is not yet entirely clarified and possibly, the response to dietary fat is a polygenic phenomenon (3). It is suggested that limiting fat intake to approximately 30g on each eating occasion would minimize postprandial lipemia (4).

Although many studies show postprandial lipemia in humans, in animal models like rat and mice, largely used to study the mechanisms of atherogenesis, there is a lack of consistent information on the behavior after an oral fat challenge.

Previous studies in our laboratory additionally have described post-alimentary lipemia in humans with very peculiar differences between sexes (5).

The objective of the present study was to characterize and compare the post-alimentary triglyceride profile of two members of the Muridae family the Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) and C57BL/6 mice (*Mus musculus*) plus compare them to the well described profile obtained in humans.

Methods

Thirty-one males and twelve females Wistar (w) rats and ten C57BL/6 males and nine females mice (c), were obtained from the Multidisciplinary Center of Biological Investigation (CEMIB), State University of Campinas (UNICAMP), all 8 weeks old, weighing on average 190 ± 6 g (w) and 24 ± 0.7 g (c), respectively, were used in this study. The animals were housed (4 animals per cage) in a temperature-controlled room (22°C) with 12-h light-dark cycles and received a standard rodent diet (Nuvital, Curitiba, PR, Brazil) and water *ad libitum*. All animals underwent an oral fat tolerance test. They were lightly anesthetized with ether for tail blood collection after a 12h fast and after ingestion of

a milk cream (Batavo[®],Brazil) by gavage. Serial blood samples were collected at 2, 4, 6, 8 and 10h after the ingestion in rats and 1, 2, 3, 4, 5 and 6h in mice. The liquid meal contained fat (17%), protein (4%) and carbohydrates (4%), providing 2g fat/Kg (w and c).

In humans the test began by venous puncture after a 12-h fast followed by ingestion of a milkshake prepared with lactose-free powdered milk (NAN, Nestlé, São Paulo, Brazil). The liquid meal contained fat (25%), dextromaltose (55%), protein (14%), and vitamins and minerals (6%), providing 40 g of fat per square meter of body surface, and was given over a period up to 10 min. Serial blood samples were collected at 2, 4, 6, and 8 h after ingestion.

Measurements were performed on samples from all time points or from the TG peak and/or 8 h. The serum triglycerides (TG) were determined by a standard enzymatic method (GK/GPO/Roche) in an automated system (humans) or in a microplate method (animals). The incremental areas under the curves (AUC) were calculated by the trapezoidal rules and the acquisition and removal rates (AR and RR) were calculated as the slopes of the curves from 0 to peak time and from peak time to 0h respectively. The TG peaks they had been classified in early peak (high value until 4h) and late peak (high value after 4h).

The human and rodent experimental protocols were respectively approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (Biology Institute, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil) and by the Ethics Committee of the School of Medicine of the State University of Campinas, São Paulo.

Results

In figure 1 the postprandial triglyceridemia in Wistar rats and C57BL/6 mice and humans are shown.

Male and female Wistar rats showed differences in triglycerides at all times but male and female C57BL/6 mice shown differences at 0h, 1 and 6 hours after ingestion of a milky cream. The male Wistar presented a higher late TG peak frequency (84%), that was different another groups (female Wistar 16%, C57BL/6, in both sex, don't showed a late peak) ($p < 0.002$).

When male Wistar rats and male C57BL/6 mice were compared there was a difference at 6h only. However the females, Wistar rats and C57BL/6 mice, were different at 0, 4 and 6h.

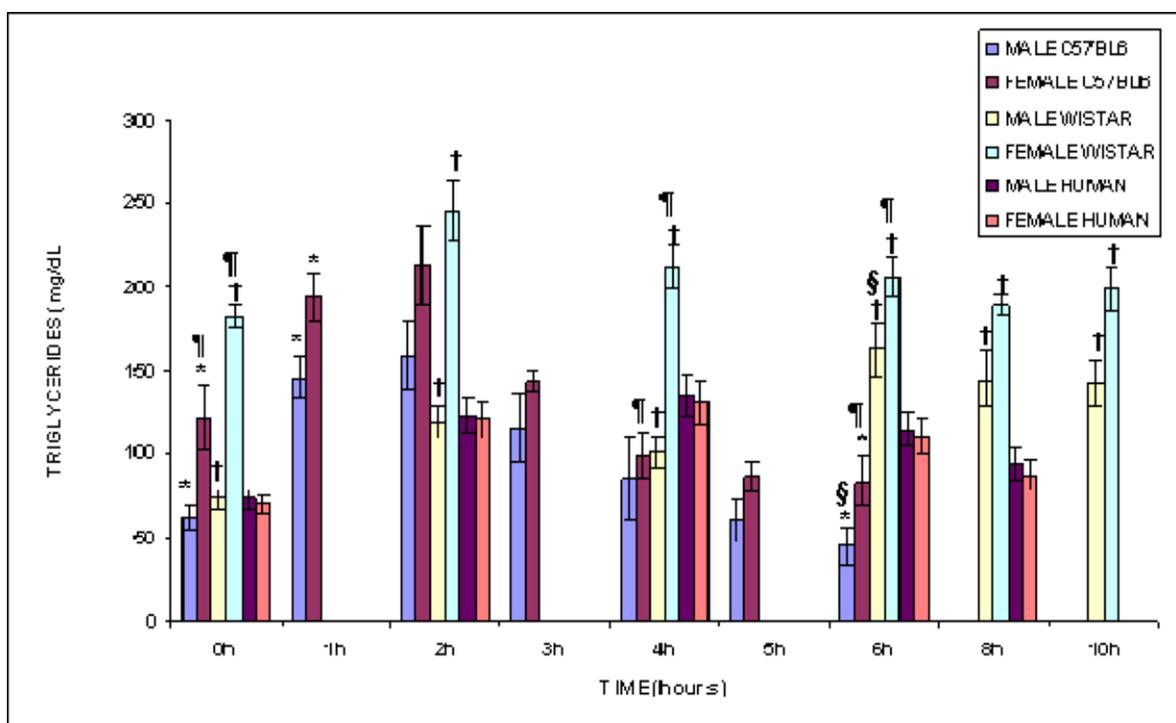


Figure 1: Postprandial triglyceridemia in rats, mice and humans

Data as means±sem; Mann-Whitney tests: *males and females: C57BL/6 mice ($p < 0.03$); † males and females: Wistar rats ($p < 0.002$); § male rats and male mice ($p \leq 0.001$); ¶ differences between female rats and female mice ($p \leq 0.01$).

Table 1 presents the postprandial triglyceride responses in percentage of baseline variation, area under curves and acquisition/removal rates in wistar rats, C57/BL6 mice and human

Table 1 - Postprandial triglycerides responses in Wistar rats, C57/BL6 mice, men and women:

Groups/ Postprandial data	Percentage of baseline (0h) variation								Areas Under curves (mg/dLh)		Acquisition/removal rates (mg/d/h)	
	1h	2h	3h	4h	5h	6h	8h	10h	AUC TG	AUIC TG	ARTG	RR TG
Wistar Male (31)	-	86 ^a	-	70 ^a	-	158 ^a	127 ^a	125 ^a	1269 ± 105 ^e	539 ± 97 ^h	18±3	21±3 ^l
Wistar Female (12)	-	35 ^b	-	19 ^b	-	17 ^b	11	15	2085 ± 102 ^e	257 ± 91 ^h	30±8	201±21 ^l
CL57BL/6 Male (10)	59 ^c	96 ^c	118 ^c	105	54	76	-	-	619 ± 84 ⁱ	249 ± 92	68±10	50±14
CL57BL/6 Female (9)	91 ^d	108 ^d	51	30	31	38	-	-	839 ± 54 ⁱ	107 ± 88	86±15	46±6
Men (31)	-	79 ^e	-	87 ^e	-	66 ^e	32 ^e	-	1051 ± 74 ^j	402 ± 46 ^k	24 ± 3	19 ± 3
Women (29)	-	57 ^f	-	78 ^f	-	44 ^f	26 ^f	-	734 ± 46 ^j	238 ± 29 ^k	16 ± 2	12 ± 2

Groups (n). ; Diet chow intake: 15g/day; water intake:30mL/day. weight of rats: 190 ± 6g and mice: 24 ± 0.7g; Percentage of baseline (0h) variation, areas under curves (AUC) and incremental areas under curves (AUIC); Wilcoxon test: *a, b, c* and *d*: differences from 0h. *a*<0.0001, *b*<0.03, *c*<0.008, *d*<0.02, *e*<0.001, *f*<0.003. Mann-Whitney test; *g*<0.0001, *h*<0.04, *i*<0.003, *j*<0.002, *k*<0.004, *l*<0.0001.

Discussion

The present study presents striking differences in postprandial triglycerides patterns between rats and mice and by sexes. The TG responses to the meal were not correlated to the animal baseline body weight or fat load in all animal groups or baseline triglycerides. The responses in mice were closer to the ones in men.

All the groups have shown AUC TG difference. Only Wistar group and Humans the AUIC was different.

The female Wistar group has shown a bigger removal rate when compared with the males.

It is evident that postprandial lipemia may contribute to increased progression of CVD (cardiovascular disease).TG-rich lipoproteins are involved in atherosclerosis and thrombosis. Triglyceride (TG), remnant-like particle cholesterol (RLP-C) and RLP-TG increase after a fat load and could contribute to endothelial dysfunction and

atherothrombosis (3, 6). Humans and animals in western civilizations are potentially in a postprandial state continuously for up to 16–20 h per day (7).

The rat has been a mainstay of physiological and metabolic research since the development of the first defined rat strain at the Wistar Institute in the 1920s (8).

The normal rat, like the dog, is typically resistant to the development of atherosclerosis, and this has led to the notion that the rat is not a suitable subject for cardiovascular research. This idea is correct in respect to the “normal” rat but is not necessarily correct in the case of genetic models of CVD that have been developed over recent years. The situation is similar to that seen in the human population, where some individuals are at high risk for CVD and others are highly resistant, and the normal rats provide a valuable negative control in experimental studies (9).

The lipid metabolism of the normal rat and mice is primarily based on HDL, rather than on LDL, as in humans, certainly contributing to their resistance to atherogenesis (9).

We demonstrated that mice and female rats presented TG responses similar to the ones observed in men (5) and were more fat resistant than male rats. As well, late TG responses were observed in rats as opposed to mice shown by a 5 fold higher late TG peak frequency in rats. Thus after an oral fat load rats are prone to respond in a pro-atherogenic manner by either facilitating the saturation of lipolytic pathways, reducing the clearance capacity of cholesterol-rich lipoproteins, or exacerbating the permeability and retention of cholesterol in arterial vessels (10, 11). Besides that male rats were fat intolerant as compared to rat females. Differently mice TG responses were equal in both sexes.

A few other studies in the literature (12), showed the peak of triglycerides in 2nd hour after the administration of 10mL/Kg of lipidic emulsion composed of 200g/L of soybean oil, 12g/L of egg yolk lecithin, and 22,5g/L of glycerol and given through gavage.

In a study on drugs that improve the gastric emptying in diabetic, Wistar rats had been used as controls. The fat tolerance test was performed through olive oil orally administered at 10 ml/kg and the TG peak was also in 2nd h (13).

Probably differences in the absorption patterns due to the quality and the amount of supplied fat and different experimental methodologies applied explain these discrepancies but the mechanisms that regulate these divergent responses need to be better understood.

The divergences between responses by sexes and species observed in this study will be object of subsequent studies in our laboratory as well as the implications of these different postprandial lipemia patterns on resistance to endothelial dysfunction and atherogenesis.

Aknowledgements

This study is part of the master thesis of AU. We are grateful to Mirian R. G. Danelon and Aparecida Souza for the outstanding technical support. This work was developed in part by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

1. Roche H.M, Gibney M.J. The impact of postprandial lipemia in accelerating atherothrombosis. *Journal Cardiovascular Risk*. 2000. 7 (5): 317-24.
2. Kenneth CW, Cooper AD. Postprandial lipoprotein and atherosclerosis. *Frontiers in Bioscience*. 2001; 6 (1): d332-54.
3. Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Daskalopoulou SS, Mikhailidis DP, Cokkinos DV. Clinical relevance of postprandial lipaemia; *Curr Med Chem*. 2005;12 (17):1931-45.
4. Sanders TA. Dietary fat and postprandial lipids; *Curr Atheroscler Rep*. 2003; 5 (6): 445-51.
5. Tentor J, Harada LM, Nakamura RT, Gidlund M, Castilho LN, Cotta de Faria E. Sex-dependent variables in the modulation of postalimentary lipemia. *Nutrition*. 2006 Jan;22(1):9-15. Epub 2005 Oct 12.
6. Norata GD, Pirillo A, Catapano AL. Modified HDL: biological and physiopathological consequences. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006 Jul;16(5):371-86.
7. Mangat R, Su J, Scott PG, Russell JC, Vine DF, Proctor SD. Chylomicron and apoB48 metabolism in the JCR:LA corpulent rat, a model for the metabolic syndrome. *Biochem Soc Trans*. 2007; 35 (Pt 3):477-81.
8. Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH. *The laboratory rat*. New York Academic Press, 1979.
9. Russell JC, Proctor SD. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol*. 2006 Nov-Dec;15(6):318-30.
10. Mamo JC, Watts GF, Barrett PH, Smith D, James AP, Pal S. Postprandial dyslipidemia in men with visceral obesity: an effect of reduced LDL receptor expression? *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 281 (3):E626-32.

11. Chan DC, Watts GF, Barrett PH, Mamo JC, Redgrave TG. Markers of triglyceride-rich lipoprotein remnant metabolism in visceral obesity. *Clin Chem*. 2002; 48 (2):278-83.
12. Suzuki Y, Unno T, Kobayashi M, Nozawa A, Sagesaka Y, Kakuda T. Dose-dependent suppression of tea catechins with a galloyl moiety on postprandial hypertriglyceridemia in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2005; 69 (7):1288-91.
13. Xie W, Xing D, Zhao Y, Su H, Meng Z, Chen Y, Du L. A new tactic to treat postprandial hyperlipidemia in diabetic rats with gastroparesis by improving gastrointestinal transit. *Eur J Pharmacol*. 2005 Mar 7;510(1-2):113-20.

Trabalho Científico 3

**A MODERATE INCREASE IN HUMAN PLASMA CHOLESTERYL ESTER
TRANSFER PROTEIN ACTIVITY DOES NOT CHANGE *IN VIVO*
POSTPRANDIAL LIPEMIA**

**Aline Urban¹, Ruy Nakamura², Rogério Oliveira³, Juliana Tentor¹, Eliana C. de
Faria¹**

Deptos. de Patologia Clínica¹ e de Radiologia² e Núcleo de Medicina Experimental,
Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, SP, ³Departamento
de Estatística, Instituto de Matemática e Estatística, Universidade de São Paulo - Brazil

to whom correspondence should be addressed:

Eliana Cotta de Faria

Mailing address:

Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Departamento de Patologia Clínica, FCM-UNICAMP

Caixa Postal 6111 - Barão Geraldo

CEP: 13084-971 – Campinas, SP, Brazil

Telephone: 0055 19 35217387

FAX: 0055 19 35219434

E-mail: cotta@unicamp.br

Abstract

CETP inhibition results in increased cholesteryl ester and apoE contents in HDL and increased triglyceride (TG) and decreased cholesteryl ester in the non-HDL plasma fraction. To characterize the effects of high activity CETP *in vivo* postprandial TG metabolism, we determined plasma lipid concentrations of TG rich-lipoproteins in 6 women with high activity CETP (CETPh) (CETPh ≥ 23.8) and 14 controls (CETP $\geq 4.6\%$ and $\leq 23\%$) up to 8h after an oral fat load (40 g of fat/m² of body surface area) were studied. In CETPh reduced postprandial triglyceride rich-lipoprotein metabolism was present. This study strongly supports that high levels of activity do not shown a pivotal role for CETP in postprandial intravascular lipid metabolism of humans *in vivo*. Further work is needed to better understand their effects on atherosclerosis clinical manifestations.

Keywords: post-prandial lipemia; cholesteryl ester transfer protein, hyperalphalipoproteinemia; carotid intima-media thickness

List of abbreviations: HDL-cholesterol, high CETP, post-prandial lipemia

Introduction

It is well established that during reverse cholesterol transport (RTC) cholesteryl ester transfer protein (CETP) is essential in neutral lipid exchange among lipoproteins. The relationship between CETP and lipoprotein metabolism is very complex and in different metabolic backgrounds depends largely on the concentration of HDL and/or triglyceride-rich lipoproteins.

One of the major mechanisms whereby HDL protects against atherosclerosis is that of RTC from atherosclerotic lesions macrophages to the liver, with subsequent excretion of cholesterol in the bile and with intravascular lipoprotein remodeling. It is anti-atherogenic in normolipidemics individuals but with hypercholesterolemia and mix hiperlipidemia, the CETP can have a pro-atherogenic role, due to presence of dense, small and atherogenic particle LDL generation (1, 2, 3).

The importance of plasma CETP in lipoprotein metabolism was demonstrated by the discovery of CETP-deficient subjects with severe hyperalphalipoproteinemia (HALP) (4). Genetic CETP deficiency is the most important and common cause of HALP in the Japanese (5).

CETP deficiency is considered a physiological state of impaired RCT, which may possibly lead to the development of atherosclerosis despite high HDL cholesterol concentrations.

CETP deficiency are disregarded on their actions on postprandial lipemia (LPP) a state that has been associated with quantitative and qualitative alterations of the lipid profile, positively related to the progression of the risk cardiovascular (6)

Triglyceride-rich lipoproteins (TRL) are converted into remnants lipoproteins (RLP) after a gradual hydrolysis process for the action of the lipase lipoprotein (7). The postprandial lipemia elicits diverse metabolic and atherogenic events including the chylomicrons remnant production, the formation of small LDL particles and reduction of the concentration of cardioprotectives fractions HDL (8,9). The post-prandial pro-atherogenic effects on the metabolism of TRL can be direct or indirect.

Other alterations that can occur are not totally clear and they can be related mainly to the activities of the CETP, LH, LPL, (5). The activation of the lipoprotein lipase is a factor that is directly linked to chylomicron and VLDL catabolism (9,10).

However, the pathophysiological significance of CETP in terms of atherosclerosis has been controversial. Genetic disorders of HDL metabolism are rare, resulting in difficult assessment of their atherosclerosis risk. Ultrasound imaging of carotid arteries has provided a tool to assess the sub-clinical risk in hereditary hyperalphalipoproteinemia.

The objective of this work was to verify the effects of cholesterol ester transfer protein activity on postprandial triglyceride metabolism in women, presenting high levels of CETP activity. These increases could provide the opportunity to elucidate the metabolic role of CETP on postprandial triglyceride-rich lipoproteins metabolism.

Material and methods

Twenty volunteer women, asymptomatic, normolipidemic as defined by NCEP (11), aged 27 to 37 y, with high levels of CETP activity (n=6) was selected through activity above their respective 90th percentile values (n=148) and 14 controls with CETP activity above their respective 10th percentile values and below their 90th percentile values).

They answered a questionnaire containing information on diet, physical exercise, uses of tobacco, alcohol, and familial history of coronary heart disease.

All individuals underwent an oral fat tolerance test. The test began by venous puncture after a 12-h fast followed by ingestion of a milkshake prepared with lactose-free powdered milk (NAN[®], Nestlé, São Paulo, Brazil). The liquid meal contained fat (25%), dextromaltose (55%), protein (14%), and vitamins and minerals (6%), providing 40g of fat per square meter of body surface, and was given over a period up to 10min. Serial blood samples were collected at 2, 4, 6, and 8 h after ingestion. Measurements were performed on samples from all time points.

Triglyceride-rich lipoproteins, at a density lower than 1.006 g/L, were isolated by sequential ultracentrifugation for 16 h at 4°C and 40 000rpm in a Beckman centrifuge (model L5-75B, Beckman, Palo Alto, CA, USA). Cholesterol (Chol) and triglycerides (TG) in sera and in TRL particles were measured by enzymatic-colorimetric methods at all times (Hitachi Modular, Roche, Mannheim, Germany); LDL-Chol and HDL-Chol were analyzed by a homogeneous direct enzymatic-colorimetric method. Fasting HDL subfractions (HDL₂ and HDL₃) were obtained by sequential micro-ultracentrifugation of the supernatants that were obtained after precipitation of lipoprotein containing apolipoprotein (Apo) B-100 with

dextran sulfate with posterior quantification of Chol and TG by enzymatic-colorimetric methods. ApoA-I, ApoB-100, and lipoprotein(a) were analyzed by nephelometry. Non-esterified fatty acids (NEFAs), phospholipids (PLs), and free cholesterol (FC) were determined through enzymatic-colorimetric methods (Waco, Osaka, Japan). Cholesteryl esters (CEs) were estimated by the difference between Chol and FC.

Lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (HL) activities were measured in fasted post-heparin plasma samples on the basis of fatty acid release by using a radiolabeled triolein emulsion as the substrate and NaCl (1 M) as the LPL inhibitor, with results expressed as nanomols of NEFA per milliliter per hour (12).

CE transfer protein (CETP) activity was determined by an exogenous assay that measures the transfer of radiolabeled CE between a normal donor pool of ¹⁴CE-HDL and an unlabeled acceptor mixture of very low-density lipoproteins (VLDL) plus LDL over 4 h by using plasma as the CETP source, and results are expressed as percentages of CE transferred (13). The PL transfer protein (PLTP) was measured by an exogenous radiometric method using PL liposomes as the substrate (14).

Assays for CETP, PLTP and lipase activities were conducted in triplicate. Interassay coefficients of variation were 12%, 15%, 9%, and 8% respectively for CETP, PLTP, LPL, and HL, respectively.

The common carotid intima-media thickness (IMT) was measured by ultrasonography using the HDI 500 Ultrasound System equipment (ATL Ultrasound, Bothell, WA, USA), with a 7- to 12-MHz color Doppler probe. The carotid IMT was calculated as the mean of five measurements in the far wall from the left and right common carotid arteries according to a standardized method (15,16). Individual results were expressed in millimeters as an average of the left and right carotid IMT.

The Apo E genotype was performed according Emi, 1988 (17).

All were in accordance with the research ethics committee of the School of Medicine of the State University of Campinas, São Paulo.

Statistical Analysis

Observational analysis was used for TG curves. The trapezoidal method was used for estimation of the AUCs and AUICs. Slopes of the individual curves were determined by linear regression analysis and expressed as the acquisition rate, from 0h to TG peak, and as the removal rate, from peak to the time with the lowest TG concentration as the summary measurements of curves.

Secondarily a hierarchical multiple linear regression analysis with stepwise criteria for selection of variables was used to assess the influence of CETP on postprandial lipemia. Results are expressed as coefficients of determination (R^2) that represent percentages of variation in the dependent variables (TG, TRL-TG, TRL-CHOL, CETP, AUCs, AUICs, AR and RR TG AUC, AUIC, acquisition rate, and removal rate).

The significance level was 5% and borderline values >5 and 10%.

Results

The groups were completely paired according to biochemical and anthropometric data: CETP was 1.7 higher in the CETPh group as expected. But LPL, HL and PLTP were similar. Apo E genotyping was similar ($p=0.348$).

The multivariate analysis indicated that CETP activity influenced postprandial TG 6h (partial R-square = 0.3151, $p=0.0367$, $n=20$).

The correlation coefficients between average common carotid intima-media thickness and clinical and biochemical data in women with high cholesteryl ester transfer protein activity if it only showed significant with NEFA 2h ($r=0.836$, $p=0.038$)

Fasting parameters

Clinical, anthropometric and fasting biochemical data from subjects are shown in Table 1. The subjects are adult asymptomatic women and the groups are paired except for CETP activity.

Table 1 - Clinical and fasting biochemical data of individuals with high (h) activity of cholesteryl ester transfer protein (CETP) and of controls (CTL)

VARIABLES/GROUPS	CETPh (n=6)	CTL (n=14)
Age (y)	34 ± 3	29 ± 2
Sex (M/F)	F	F
BMI (Kg/m ²)	23 ± 1	22 ± 0.5
WC (cm)	75 ± 2	73 ± 2
SBP (mmHg)	116 ± 2	111 ± 2
DBP (mmHg)	77 ± 2	72 ± 2
Carotid IMT (mm)	0.57 ± 0.02	0,50 ± 0,01
CETP (%)	27 ± 1[†]	16 ± 1[†]
HL (nmol NEFA/mL/h)	2067 ± 218	2090 ± 276
LPL (nmol NEFA/mL/h)	2495 ± 152	2387 ± 264
PLTP (%)	9 ± 1	9 ± 1
CETP TaqIB (B1B2+B2B2)	50%	92%
CETP I405V (IV+VV)	100%	83%
APOE (E3/E3+E3/E4)	100%	93%
FC (mg/dL)	40 ± 5	49 ± 4
CE (mg/dL)	110 ± 11	107 ± 6
CHOL (mg/dL) 0h	151 ± 14	156 ± 8
TG (mg/dL) 0h	56 ± 6	64 ± 8
HDL-C (mg/dL) 0h	50 ± 3	51 ± 2
HDL ₂ -C (mg/dL)	11 ± 1	13 ± 1
HDL ₂ -TG (mg/d/L)	6 ± 2	6 ± 1
HDL ₃ -C (mg/dL)	36 ± 2	38 ± 2
HDL ₃ -TG (mg/dL)	15 ± 2	16 ± 3
LDL-C (mg/dL) 0h	93 ± 9	94 ± 6
LDL SIZE (LDL/ApoB)	1 ± 0.04	1,3 ± 0.04
VLDL-C (mg/Dl) 0h	11 ± 1	13 ± 2
NHDL-C (mg/dL) 0h	101 ± 11	105 ± 7
NEFA (mmol/L) 0h	0,7 ± 0.1	0,8 ± 0,1
PL (mg/dL) 0h	197 ± 13	211 ± 11
APOA-I (mg/dL) 0h	134 ± 7	145 ± 7
APOB-100 (mg/dL) 0h	66 ± 6	72 ± 5

Data as mean±SE; Apo, apolipoprotein; BMI, body mass index; CE, cholesteryl ester; CETP, activity of cholesteryl ester transfer protein; CHOL, total cholesterol; DBP, diastolic blood pressure; SBP, systolic blood pressure; FC, free cholesterol; HDL2 and HDL3, high-density lipoprotein subfractions; IMT, carotid intima-media thickness; LPL, activity of lipoprotein lipase; NEFA, non-esterified fatty acid; NHDL-chol, non-high-density lipoprotein cholesterol; PL, phospholipids; PLTP, activity of phospholipid transfer protein; SBP, systolic blood pressure; TG, triglycerides; WC, waist circumference. P values: [†]CETPh vs CTL – Mann-Whitney, p≤0.001.

As shown below (Fig. 1) the high CETP and controls do not shown significant differences

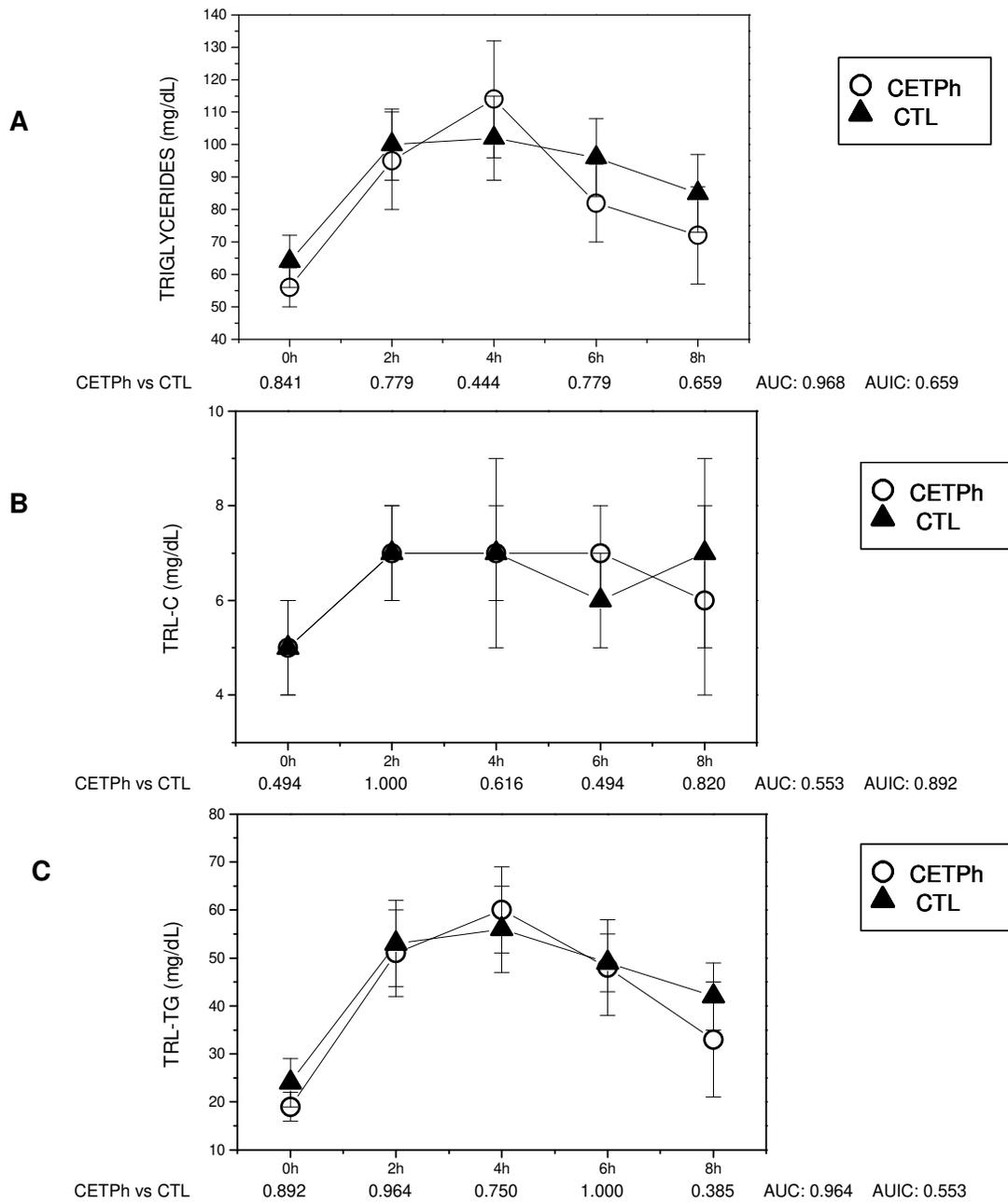


Figure 1 - Postprandial lipemia of individuals with high (h) activity of cholesteryl ester transfer protein (CETP) and of controls (CTL)

Data as means \pm sem. C, cholesterol, TG, triglycerides, TRL, triglycerides-rich lipoproteins, AUC, area under curve, AUCIC, area under incremental curve. Triangle solid, CETPh and Circle open, controls. Mann-Whitney test with Ancova CETPh vs CTL.

The significant correlation observed in this study was Caroti IMT with BMI ($r=0.928$, $p=0.008$ in the subjects of high CETP group).

Discussion

This is the first study that shows moderately high activity of CETP in humans and TG metabolism.

The role of CETP during postprandial lipemia (PPL) is not completely understood. Recently low CETP activity in humans was associated with reduced postprandial lipemia. Other groups showed a positive correlation between TG and CETP. But one study described in low CETP activity subjects a constellation of increased TG and high HDL during PPL.

Controversies exist about the role of CETP in atherosclerosis, especially with regard to the effect of genetic variants that alter the activity and concentration of this protein and its regulation of HDL-C. Studies of these genetic variants may be important, particularly since CETP inhibitors were and are still being tested as potential therapeutic agents for raising plasma HDL concentrations. CETP inhibitors significantly raise plasma HDL-C concentration; however, clinical trials of one CETP inhibitor, torcetrapib, have been discontinued due, in part, to the lack of athero-protective effects.

Nascent high-density lipoprotein (HDL) picks up cholesterol from cells in the periphery and is then converted into cholesteryl ester (CE)-rich HDL through the action of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT). In normal lipoprotein metabolism, HDL CE can be transferred to triglyceride-rich lipoproteins through the activity of plasma CE transfer protein (CETP) (18). In subjects with a deficiency of CETP, the conversion of HDL to very-low-density lipoprotein (VLDL) and intermediate-density lipoprotein (IDL) is blocked, leading to delayed catabolism of HDL CE, with consequent marked increases in the concentrations of HDL cholesterol and apolipoprotein A-I (19).

Normal high-density lipoprotein (HDL) metabolism comprises the action of hepatic lipase on triglyceride-rich HDL results in the production of small phospholipid-rich HDL species (ie, HDL3) (20). Hepatic lipase deficiency therefore delays the catabolism of triglyceride-rich HDL (ie, HDL2), resulting in modest elevations in HDL cholesterol and apolipoprotein A-I (21). and in variable elevations in total cholesterol and triglycerides.

Genetic deficiency of hepatic lipase also impairs the metabolism of very-low-density lipoproteins (VLDLs) and intermediate-density lipoproteins (IDLs), leading to their accumulation in plasma (22). The individuals with high activity of CETP had presented, on average, activity of $25 \pm 1,8\%$ of cholesterol ester transference, and in jejum, they possess TG of 56 ± 6 mg/dL and HDL-C of 50 ± 3 mg/dL, Col and TG of the TRL had not presented difference statistics when comparative to the control group. This suggests that the activity of the CETP is facilitating to the cholesterol flow for the RTC increasing the exchange of CE of the HDL for the lipoproteins that apoB TG contains in exchange for (Tall, 1986), making with that the rich lipoproteins in triglicérides quickly are caught by the hepatics receivers (Tall, 1986).

Recently Tsai et al, 2008, showed that genetic variants that were associated with higher CETP activity and lower HDL-C were associated with an increased prevalence of coronary artery calcification (CAC), but that the genetic variants associated with lower CETP activity and higher HDL-C were not associated with less CAC suggesting that modulating CETP activity may be beneficial in a select subset of individuals.

The present study revealed no differences in carotid IMT between controls and high CETP carriers but the positive significant association of postprandial TG with CETP activity suggests a regulatory role of CETP on the postprandial period.

The mechanisms underlying these results demand subsequent studies in view of the varied and complex genetic background in humans.

Moderate increases of CETP activity do not modify oral fat tolerance suggesting the need of a metabolic background with a limier value of CETP activity for the positive regulation of postprandial triglycerides by CETP.

This model demonstrates an absence of a CETP effect on trglyceride-rich lipoprotein during its moderate increase, probably due the lack of changes in the reverse cholesterol transport as described here; as well there was an absence of a direct effect of this transfer protein on triglyceride-rich lipoprotein metabolism.

Confirmatory studies will be necessary to further understand the action of CETP on human triglyceride-rich lipoprotein metabolism.

Aknowledgements

This study is part of the master thesis of AU. We are grateful to Mirian R. G. Danelon and Aparecida Souza for the outstanding technical support. This work was developed in part by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- 1 - Lassel TL, Guerin M, Auboiron s, et al. Evidence for a cholesteryl ester donor activity of LDL particles during alimentary lipemia in normolipidemic subjects. *Atherosclerosis* 1999; 147: 41-48.
- 2 - Herron KL, Lofgren IE, Sharman M, et al. High intake of cholesterol results in less atherogenic low-density lipoprotein particles in men and women independent of the response classification. *Metabolism* 2004; 53 (6): 823-30.
- 3 - Inazu A, Koizumi J, Mabuchi H. Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2000 Aug;11(4):389-96.
- 4 - Glueck CJ, Fallat RW, Millett F, Gartside P, Elston RC, Go RCP. Familial hyperalphalipoproteinemia: studies with eighteen kindreds. *Metabolism.* 1975;24:1243-1259.
- 5 - Koizumi J, Mabuchi H, Yoshimura A, Michishita I, Takeda M, Itoh H, Sakai Y, Sakai T, Ueda K, Takeda R. Deficiency of serum cholesteryl-ester transfer activity in patients with familial hyperalphalipoproteinaemia. *Atherosclerosis.* 1985 Dec;58(1-3):175-86
- 6 - Thomas T.R., Horner KE, et al. Effect of exercise and medium-chain fatty acids on postprandial lipemia. *Journal of Applied Physiology* 2001; 90 (4) 1239-46.
- 7 - Hyson D, Rutledge JC, Berglund L. Postprandial lipemia and cardiovascular disease. *Curr Atharoscler Rep* 2003; 5 (6): 437-44.
- 8 - Blackburn P, Cote M, Lamarche B, et al. Impact of postprandial variation in triglyceridemia on low-density lipoprotein particle size. *Metabolism* 2003; 52 (11): 1379-86.
- 9 - Tholstrup T, Sandstrom AB, Holmer g. Effect of 6 dietary fatty acids on the postprandial lipid profile plasma fatty acids lipoprotein lipase and cholesterol ester transfer actives in healthy young mem. *American Journal of Clinical Nutrition* 2001; 73: 198-208.

10 - Humphries SE, Morgan L. Genetic risk factors for stroke and carotid atherosclerosis: insights into pathophysiology from candidate gene approaches. *Lancet Neurol* 2004; 3 (4): 227-35.

11 - National Cholesterol Education Program (NCEP). Executive summary of the third report of NECP Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. *JAMA* 2001;285:2486–97.

12 - Ehnholm C, Kuusi T. Preparation, characterization and measurement of hepatic lipase. *Methods Enzymol* 1986;129:716 –38.

13- Lagrost L. Determination of the mass concentration and the activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Methods Mol Biol* 1998;110:231– 41. 1982;712:444 –52.

14 - Damen J, Regts J, Scherphof G. Transfer of [14C] phosphatidylcholine between liposomes and human plasma high density lipoprotein. Partial purification of a transfer-stimulating plasma factor using a rapid transfer assay. *Biochim Biophys Acta* 1982;712:444 –52.

15- Carallo C, Irace C, Pujia A, De Franceschi MS, Crescenzo A, Motti C, et al. Evaluation of common carotid hemodynamic forces. Relations with wall thickening. *Hypertension* 1999;34:217–21.

16 - Poredos P. Intima-media thickness: indicator of cardiovascular risk and measure of the extent of atherosclerosis. *Vasc Med* 2004; 9(1):46-54.

17-Emi M, Wu LL, Robertson MA, Myers RL, Hegele RA, Williams RR, White R, Lalouel JM. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. *Genomics*, 3 (4), 373-379: 1988.

18. Havel RJ, Kane JP. Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The*

Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 1995:1841-1851.

19. Breslow JL. Familial disorders of high-density lipoprotein metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 1995:2031-2052.

20. Breslow JL. Familial disorders of high-density lipoprotein metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 1995:2031-2052.

21. Connelly PW, Hegele RA. Hepatic lipase deficiency. Crit Rev Clin Lab Sci. 1998;35:547-572.

22. Rader DJ. Lipid disorders. In: Topol EJ, ed. Textbook of Cardiovascular Medicine. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998:59-90.

Discussão Geral

5. Discussão Geral

A resposta pós-prandial apresenta efeitos pró-aterogênicos diretos e indiretos no metabolismo de lipoproteínas ricas em triglicérides (Tanaka, 2004). Algumas alterações que ocorrem na lipemia pós-prandial ainda não estão bem esclarecidas na literatura, mas estão relacionadas principalmente com a atividade da CETP, LH e LPL (Tentor et al., 2006). Essas proteínas são muito discutidas no transporte reverso de colesterol e principalmente no desenvolvimento da aterosclerose. Em alguns casos, a CETP promove aterosclerose, (Plump et al., 1999; Hayek et al., 1995), enquanto em outros a CETP tem propriedades claramente anti-aterogênicas (Hayek et al., 1995; Foger et al., 1999) em alguns trabalhos a atividade da LH possui papel anti-aterogênico (Fan et al., 2007) e pró-aterogênico (Jansen et al., 2002). Por esse motivo estudamos as respostas lipêmicas no período pós-prandial, pois informações sobre os efeitos destas proteínas, no período pós-prandial, são escassos na literatura.

O estudo do período pós-prandial foi realizado através do acompanhamento de parâmetros do metabolismo após uma refeição oral, única, líquida e rica em gordura, durante 8h.

Foram analisados lípides, lipoproteínas e apolipoproteínas.

Pessoas com HDL-C aumentados geralmente possuem uma excelente capacidade de realizar o “clearance” de TG (Patsch et al., 1983), o que não ocorre em indivíduos com baixa atividade da CETP, que apesar de possuírem altos níveis de HDL-C (HDL₂ e ₃ significativamente maiores), apresentaram, paradoxalmente, lipemia pós-prandial tardia com o pico de TG em 8h quando comparados com os controles, que mostraram pico de TG em 4h, como também relatado por Patsch (1981).

Na baixa atividade da CETP houve um aumento nas lipoproteínas ricas em TG e Col após a administração da dieta, uma diminuição no tamanho da LDL, quando estipulado pela razão LDL/ApoB, sugerindo a formação de partículas mais suscetíveis à oxidação, sendo assim, mais aterogênicas (Packard, 2003). Inazu, 2007, mostrou resultados opostos onde a baixa atividade de CETP por deficiência genética, em indivíduos japoneses, diminuiu a formação de lipoproteínas ricas em TG.

Previamente, a resposta de lipemia pós-prandial foi diminuída em sujeitos com baixa atividade de CETP associado com o polimorfismo TaqIB2 em um caso de heterozigoto para a deficiência de CETP (Gudnason et al., 1999; Hirayama et al., 2000). Neste trabalho, foram estudados indivíduos com deficiência em CETP que possuíam atividades da CETP de 75% e 25% maiores em B1B2 e B2B2 respectivamente, em relação ao homozigoto B1B1. As concentrações de HDL-C foram 11% menores em heterozigotos e 7% maiores em indivíduos portadores de B2B2. Em indivíduos heterozigotos apresentaram 56% de aumento nas LRTG-C e 160% nas LRTG-TG em relação aos homozigotos sem mutação.

Quando comparados aos homozigotos I405V, os indivíduos que possuem a mutação IV apresentam uma atividade da CETP 13% menor, aumento de 20% no HDL-C e 10% no TG e redução de 18% na LDL-C e 7% no colesterol. Nos indivíduos com a mutação VV a atividade foi reduzida para 55%, houve redução também de 37% de TG, 14% de LDL-C e aumento de 10% no colesterol e 55% na HDL-C. Estes indivíduos possuem o genótipo E2E3 para APOE o que indica que as alterações da lipemia pós-prandial ocorridas não podem ser inferidas pelo efeito da deficiência de CETP.

No polimorfismo -514C/T do gene da lipase hepática, na paciente com deficiência múltipla de CETP, LH e LPL, a presença do alelo T na heterozigose fez com que a atividade da LH fosse diminuída.

Os indivíduos com alta atividade de CETP apresentaram, em média, atividade de $25 \pm 1,8\%$ de transferência de ésteres de colesterol, e em jejum, possuem TG de 56 ± 6 mg/dL e HDL-C de 50 ± 3 mg/dL, Col e TG das LRTG não apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo controle. Isso sugere que a atividade da CETP está facilitando o fluxo de colesterol pelo TRC aumentando a troca de CE das HDL para as lipoproteínas que contém apoB em troca de TG (Tall, 1986), fazendo com que as lipoproteínas ricas em triglicérides sejam rapidamente captadas pelos receptores hepáticos (Tall, 1986).

O aumento moderado de atividade da CETP deste estudo poderia ainda estar numa faixa de atuação fisiológica, que foi insuficiente para alterar HDL-C e frações e, portanto, não interferiu no metabolismo, nem da HDL e nem das LRTG. Novos estudos serão necessários para determinar qual seria a atividade da CETP capaz de reduzir as concentrações de HDL-C.

Em humanos a baixa atividade de LH tem sido associada ao aumento de DAC. (Klaus et al., 2001; Hirano et al., 1995). Outros estudos concluem que a diminuição da LH não influencia no risco de DAC (Shohet et al., 1999).

Uma função pró-aterogênica da LH tem sido sugerida da correlação inversa entre a lipase hepática e os níveis de HDL-C e a correlação positiva com LDL pequena e densa (Zambon et al., 1998).

No relato de caso descrevemos uma intolerância à gordura. As atividades das LPL e LH estão reduzidas. A hiperalfalipoproteinemia pode ser explicada pela deficiência da CETP e LH. Clinicamente, pacientes com deficiência de LPL apresentam maior lipemia pós-prandial e podem apresentar hipertrigliceridemia basal (Risch, 1997).

Usado freqüentemente como alternativa à terapia de reposição hormonal tradicional, a determinação da influência da Tibolona no metabolismo de lipídeos no pós-prandial é importante. A Tibolona é um esteroide sintético com propriedades estrogênicas, androgênicas, e progestogênicas e é usado para prevenir sintomas da síndrome do climatério (Kicovic et al., 1982) e a osteoporose pós-menopausal (Bjarnason et al., 1996, Rymer et al., 1994, Lindsay et al., 1980).

Diversos autores descrevem os efeitos benéficos da Tibolona nos triglicérides do jejum (Farish, 1999). O uso da Tibolona faz com que ocorra a diminuição de TG sem interferir no peso corporal e na pressão sanguínea (Wheba, 2000).

A lipemia alta apresentada pela paciente provavelmente é devida à insuficiência estrogênica associada às deficiências de lipases e de CETP. Após o tratamento com Tibolona, a lipemia melhorou drasticamente apontando um efeito anti-aterogênico potente da droga. Em nosso entedimento não há relatos na literatura descrevendo este efeito.

Com o enfoque de explorar o período pós-prandial em espécies de animais muito utilizados experimentalmente em estudos metabólicos, foram realizados testes de tolerância à gordura em ratos Wistar e camundongos C57BL/6, de ambos os sexos.

Foram utilizados ratos Wistar 31 machos (utilizados de um outro estudo do período pós-prandial) e 12 fêmeas e camundongos C57BL/6 (10 machos e 9 fêmeas).

Em resultados preliminares, observamos que o Wistar macho apresenta um padrão de absorção de gordura tardio, onde o pico de TG ocorre na 6^a.

Os camundongos C57BL/6 apresentam um padrão de absorção semelhantes ao dos Wistar fêmeas, onde o pico de TG ocorreu na segunda hora após a administração da sobrecarga de gordura que se assemelham aos resultados obtidos em humanos saudáveis.

O peso corporal basal dos camundongos e a carga de gordura administrada não se correlacionaram com as respostas de TG.

Conclusões

6. Conclusões

Relato de caso 1

A Tibolona teve efeitos anti-aterogênicos importantes melhorando o perfil lipídico e atenuando a lipemia pós-prandial em uma mulher pós-menopausada, apesar das deficiências múltiplas de CETP, LH e LPL.

Trabalho Científico 2

Os camundongos e as fêmeas Wistar apresentam perfil de lipemia pós-prandial similar aos humanos. As respostas à dieta rica em gordura não se correlacionaram ao peso corporal basal ou a quantidade de gordura administrada.

Os ratos machos foram mais resistentes à dieta que os camundongos. O perfil triglicéridêmico observado em ratos foi oposto ao de camundongos, mostrando uma frequência de pico tardio 5 vezes maior.

Comparando sexos observamos que machos Wistar foram mais intolerantes à gordura que fêmeas. Em camundongos as respostas foram iguais em ambos os sexos

Serão necessários mais estudos para que os mecanismos que regulam estas respostas divergentes sejam explicados. As implicações destes diferentes padrões de lipemia pós-prandial, a resistência à disfunção endotelial e aterogênese, serão objetos de estudos subsequentes nas duas espécies.

Trabalho Científico 3

Mulheres jovens assintomáticas e portadoras de atividades plasmáticas altas CETP apresentaram metabolismo pós-prandial de lípidos similar ao das mulheres controle, sugerindo que em contexto metabólico não patológico as vias de regulação da lipemia pós-prandial pela CETP são saturáveis.

Referências Bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

Alarcon SB, Oliveira HC, Harada LM, Nunes VS, Kaplan DB, Quintao EC, De Faria EC. Moderate hyperalphalipoproteinaemia in a Brazilian population is related to lipoprotein lipase activity apolipoprotein A-I concentration age and body mass index. *Clin Sci (Lond)*. 2004; 106 (1): 11-7.

Alipour A, Elte JWF, van Zaanen HCT, Rietveld AP, Cabezas MC. Postprandial inflammation and endothelial dysfunction. *Biochem Soc Trans*. 2007; Jun 35(Pt 3):466-9.

Andersen RV, Wittrup HH, Tybjærg-Hansen A, Steffensen R, Schnohr P et al. Hepatic lipase mutations, elevated high-density lipoprotein cholesterol, and increased risk of ischemic heart disease: the Copenhagen City Heart Study. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41(11):1972-82.

Andrei C, Sposito, Raul D. Santos, Rosangela F. Amâncio, Jose A.F. Ramires, M. John Chapman, Raul C. Maranhão. Atorvastatin enhances the plasma clearance of chylomicron-like emulsions in subjects with atherogenic dyslipidemia: relevance to the in vivo metabolism of triglyceride-rich lipoproteins. *Atherosclerosis*. 2003; 166: 311-21.

Assmann G, Nofer JR. Atheroprotective effects of highdensity lipoproteins. *Annu Rev Med*. 2003; 54: 321-41.

Baginski E, Epstein E, Zak B. The measurement of serum total phospholipids. *Ann Clin Lab Scienc*. 1972; 2: 255-67.

Barzilai N, Atzmon G, Schechter C, Schaefer EJ, Cupples AL, Lipton R, et al. Unique lipoprotein phenotype and genotype associated with exceptional longevity. *J. Am. Med. Assoc*. 2003; 290: 2030-40.

Bjarnason N, Bjarnason K, Haarbo J, Christiansen C. 1996 Tibolone: prevention of bone loss in late postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 81:2419 –2422.

Blackburn P, Cote M, Lamarche B, et al. Impact of postprandial variation in triglyceridemia on low-density lipoprotein particle size. *Metabolism*. 2003; 52 (11): 1379-86.

Blackburn P, Lamarche B, Couillard C, et al. Postprandial hyperlipidemia: another correlate of the "hypertriglyceridemic waist" phenotype in men. *Atherosclerosis* 2003; 171 (2): 327-36.

Boekholdt MS, Kuivenhoven JA, Kees GH, Wouter JJ, Kastelein JJP, Van Tol A. CETP gene variation: relation to lipid parameters and cardiovascular risk. *Curr. Opin. Lipidol*. 2004; 15, 393–8.

Boekholdt MS, Thompson JF. Natural genetic variation as a tool in understanding the role of CETP in lipid levels and disease. *J. Lipid Res*. 2003; 44: 1080-93.

Bosquit S, Ruotolo G, Tang R, et al. Alimentary lipemia postprandial triglyceride-rich lipoproteins and common carotid intima-media thickness in healthy middle-aged men. *Circulation* 1999; 100: 723-8

Brewer JR. Focus on high-density lipoproteins in reducing cardiovascular risk. *Am. Heart J*. 2004; 148: S14-8.

Brinton EA. Lipid abnormalities in the metabolic syndrome. *Curr Diab Rep*. 2003; 3(1): 65-72.

Bronzert TJ, Brewer HB Jr. New Micromethod for Measuring Cholesterol in Plasma Lipoprotein Fractions. *Clin Chem*. 1977; Nov;23(11):2089-98.

Brousseau ME, Schaefer EJ, Wolfe ML, Bloedon LT, Digenio AG, Clark RW, Mancuso JP, Rader DJ. Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol. *N Engl J Med*. 2004; 350: 1505-15.

Bruce C, Beamer LJ, Tall AR. The implications of the structure of the bactericidal/permeability-increasing protein on the lipid-transfer on the lipid-transfer function of the cholesteryl ester transfer protein. *Curr Opin Struct Biol* 1998; 8: 426-51.

Camera R, Ordovás J M, et al. Hiperlipemias: Clínica e Tratamento 1999; Cap 1 Ed Doyma Barcelona Espanha.

Carallo C, Irace C, Pujia A, De Franceschi MS, Crescenzo A, Motti C, et al. Evaluation of common carotid hemodynamic forces Relations with wall thickening. Hypertension. 1999; 34: 217-21.

Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, Quagliario L, Piconi L, Bais B, Da Ros R, Motz E. Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. Circulation. 2002; 106:1211-8.

Chan DC, Watts GF, Barrett PH, Mamo JC, Redgrave TG. Markers of triglyceride-rich lipoprotein remnant metabolism in visceral obesity. Clin Chem. 2002 Feb;48(2):278-83.

Clark RW, Ruggeri RB, Cunningham D, Bamberger MJ. Description of the torcetrapib series of cholesteryl ester transfer protein inhibitors, including mechanism of action. J Lipid Res. 2006; 47: 537-52.

Cohen JC, Vega GL, Grundy SM. Hepatic lipase: new insights from genetic and metabolic studies. Curr Opin Lipidol. 1999; 10: 259-67.

Connolly DT et al. Physical and kinetic characterization of recombinant human cholesteryl ester transfer protein. Biochem J. 1996; 320: 39-47.

Cotrell DA, Marshall BJ, Falko JM. Therapeutic approaches to dyslipidemia in diabetes mellitus and metabolic syndrome. Curr Opin Cardiol. 2003; 18 (4):301-8.

Damen J, Regts J, Scherphof G. Transfer of [¹⁴C]phosphatidylcholine between liposomes and human plasma high density lipoprotein. Partial purification of a transfer-stimulating plasma factor using a rapid transfer assay. Biochim Biophys Acta. 1982 Sep 14;712(3):444-52.

De Grooth GJ, Klerkx AH, Stroes ES, et al. A review of CETP and its relation to atherosclerosis. J Lipid Res. 2004; 45:1967-74.

De Grooth GJ, Smild TJ, Van Wissen S, et al. The relationship between cholesteryl ester transfer protein levels and risk factor profile in patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2004; 173 (2): 261-7.

De Lalla OF, Gofman JW. Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins. *Methods Biochem Anal*. 1954; 1: 459-78.

Deeb SS, Zambon A, Carr MC, Ayyobi AF, Brunzell JD. Hepatic Lipase and dyslipidemia: interactions among genetic variants, obesity, gender, and diet. *J Lipid Res*. 2003; 44:1279-86.

Drayna D, Jarnagin AS, McLean J, Henzel W, Kohr W, Fielding C, Lawn R. Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer protein cDNA. *Nature*. 1987; 327: 632-4.

Duncombe WG. Quantitative determination of non-esterified fatty acids in serum. *Clin Chim Acta*. 1964; 9: 122.

Ehnholm C, Kuusi T. Preparation characterization and measurement of hepatic lipase. *Methods Enzymol*. 1986; 129: 716-38.

Eller P, Schgoer W, Mueller T, Tancevski I, Wehinger A, Ulmer H, et al. Hepatic Lipase polymorphism and increase risk of peripheral arterial disease. *J of Inter Med*. 2005; 258: 344-8.

Elohick MD. Quantitative determination of non- esterified fatty acids in serum. *Journal of Clinical Pathology*. 1968; 21: 567.

Emi M, Wu LL, Robertson MA, Myers RL, Hegele RA, Williams RR, White R, Lalouel JM. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. *Genomics*, 3 (4), 373-379: 1988.

Föger B, Chase M, Amar MJ, et al. Cholesteryl ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoproteins and reduces aortic atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase transgenic mice. *Biol Chem*. 1999; 274(52):36912-20.

Faggini E, Zamboni A, Puato M, Deeb SS, Bertocco S, Sartore S, Crepaldi G, et al. Association between the -514 C->T polymorphism of the hepatic lipase gene promoter and unstable carotid plaque in patients with severe carotid artery stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 18 40(6): 1059-66.

Fan YM, Lehtimäki T, Rontu R, Ilveskoski E, Goebeler S, Kajander O, Mikkelsen J, Perola M, Karhunen PJ. Age-dependent association between hepatic lipase gene C-480T polymorphism and the risk of pre-hospital sudden cardiac death: the Helsinki Sudden Death Study. *Atherosclerosis.* 2007 Jun;192(2):421-7

Farish E, Barnes JF, Fletcher CD, Ekevall K, Calder A, Hart DM. Effects of Tibolone on serum lipoprotein and apolipoprotein levels compared with a cyclical estrogen/progestogen regimen. *Menopause.* 1999 Summer;6(2):98-104.

Fredenrich A, Bayer P. Reverse cholesterol transport, high-density lipoproteins and HDL cholesterol: recent data. *Diabetes Metab.* 2003; 29(3): 201-5.

Friedewald WT, Levy RY, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol without the use of preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry.* 1972; 18: 499-502.

Fumeron F, Betoulle D, Luc G, Behague I, Ricard S, Poirier O, Jemaa R, Evans A, Arveiler D, Marques-Vidal P, et al. Alcohol intake modulates the effect of a polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein gene on plasma high density lipoprotein and the risk of myocardial infarction. *J Clin Invest.* 1995 Sep;96(3):1664-71.

Genest JJ, McNamara JR, Salem DN, Schafer EJ. Prevalence of risk factors in men with premature coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1991; Jun 1;67(15):1185-9.

Gidlund M, Damasceno NR, Lindoso JA, Abdalla DS, Goto H. Monoclonal antibodies against low density lipoprotein with various degrees of oxidative modifications. *Braz J Med Biol Res.* 1996; 29: 1625-8.

Gudnason V, Kakko S, Nicaud V, et al., Humphries S on behalf of the EARS Group. Cholesteryl ester transfer protein gene effect on CETP activity and plasma high-density lipoprotein in European populations. *Eur J Clin Invest.* 1999;29:116–28.

Guerin M, Egger P, Soudat C, et al. Cholesteryl ester flux from HDL to VLDL-1 is preferentially enhanced in type IIB hyperlipidemia in the postprandial state. *J Lipid Res* 2002; 43 (10): 1652-60.

Halkes CJ, van Dijk H, de Jaegere PP, Plokker HW, van Der Helm Y, Erkelens DW, Castro Cabezas M. Postprandial increase of complement component 3 in normolipidemic patients with coronary artery disease: effects of expanded-dose simvastatin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; Sep;21(9):1526-30.

Harder C, Lau P, Meng A, Whitman SC, McPherson R. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) expression protects against diet induced atherosclerosis in SR-BI deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; Apr;27 (4):858-64.

Hasham SN e Pillarisetti S. Vascular lipases, inflammation and atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 2006; 372(1-2): 179-83.

Hayek T, Masucci-Magoulas L, Jiang X, et al. Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. *J Clin Invest.* 1995; 96:2071-4.

Herron KL, Lofgren IE, Sharman M, et al. High intake of cholesterol results in less atherogenic low-density lipoprotein particles in men and women independent of the response classification. *Metabolism* 2004; 53 (6): 823-30.

Hirano K-I, Yamashita S, Kuga Y, Sakai N, Nozaki S, Kihara S, Arai T, Yanagi K, Takami S, Menju M, et al. Atherosclerotic disease in marked hyperalphalipoproteinemia: combined reduction of cholesteryl ester transfer protein and hepatic triglyceride lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1849–1856.

Hirayama S, Kobayashi J, Taira K, et al. Marked elevation in serum apolipoprotein E in a case of heterozygous cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Clin Chim Acta* 2000;301:55–64.

Hixson JE, Vernier, DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *Hha* I. *J. Lipid res.*, 31: 545-548, 1990.

Huff MW. Dietary cholesterol cholesterol absorption postprandial lipemia and atherosclerosis. *Can J Clin Pharmacol.* 2003; 10 Suppl A: 26A-32A.

Humphries SE, Morgan L. Genetic risk factors for stroke and carotid atherosclerosis: insights into pathophysiology from candidate gene approaches. *Lancet Neurol.* 2004; 3 (4): 227-35.

Huuskonen J. et al. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis.* 2001; 155(2): 269-81.

Hyson D, Rutledge JC, Berglund L. Postprandial lipemia and cardiovascular disease. *Curr Atharoscler Rep.* 2003; 5 (6): 437-44.

Ibara D. Overview and Structure (online) www.cs.stedwards.edu acessado em 13/10/2007.

Inazu A, Brown ML, Hesler CB, Agellon LB, Koizumi J, Takata K, et al. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med.* 1990; Nov 1;323(18):1234-8.

Inazu A, Jiang X-C, Haraki T, et al. Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by two prevalent mutations as a major determinant of increased levels of high density lipoprotein cholesterol. *J. Clin Invest.* 1994; 94:1872-82.

Isaacs A, Sayed-Tabatabaei FA, Hoffman A, Oostra BA, Klungel OH, et al. The cholesteryl ester transfer protein I405V polymorphism is associated with increased high-density lipoprotein levels and decreased risk of myocardial infarction: the Rotterdam Study *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2007; 14(3):419-21.

Isaacs A, Sayed-Tabatabael AF, Njajou OT, Witteman JCM, Duijn, CM. The -514C/T hepatic lipase promoter region polymorphism, and plasma lipids: a meta-analysis *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(8): 3858-63.

Izem I, Morton RE. Cholesteryl ester transfer protein biosynthesis and cellular cholesterol homeostasis are tightly interconnected. *Journal of Biology and Chemistry.* 2001; 276 (28): 26534-41.

Izem L, Morton RE. Possible role for intracellular cholesteryl ester transfer protein in adipocyte lipid metabolism and storage. *Biol Chem.* 2007; Jul 27;282(30):21856-65.

Jacobson TA, Miller M, Schaefer EJ. Hypertriglyceridemia and cardiovascular risk reduction. *Clinical Therapeutics.* 2007; May;29(5):763-77.

Jansen H, Verhoeven AJ, Weeks L, Kastelein JJ, Halley DJ, van den Ouweland A, Jukema JW, Seidell JC, Birkenhager JC. Common C-to-T substitution at position -480 of the hepatic lipase promoter associated with a lowered lipase activity in coronary artery disease patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; Nov17(11):2837-42.

Jansen H, Verhoeven AJM, Sijbrands EJJ. Hepatic lipase: a pro or anti-atherogenic protein? *J Lipid Res* 2002; 43: 1352-62.

Ji J, Herbison CE, Mamotte CD, Burke V, Taylor RR, van Bockxmeer FM. Hepatic lipase gene -514 C/T polymorphism and premature coronary heart disease. *J Cardiovasc Risk.* 2002 Apr;9(2):105-13.

Kaplan DB, Schreiber R, Oliveira HC, Harada LM, Nakamura RT, Pinheiro HP, Tentor J, Cruz ML, De Faria EC. Cholesteryl ester transfer protein gene mutations in Brazilian hyperalphalipoproteinemia. *Clin Genet.* 2006; 69 (5): 455-7.

Karpe F, Bosquit S, Tang R, et al. Remnant lipoproteins are related to intima-media thickness of the carotid artery independently of LDL cholesterol and plasma triglycerides. *J Lipid Res.* 2001; 42: 17-21.

Karpe F, Faire U, Mercuri M, et al. Magnitude of alimentary lipemia is related to intima-media thickness of the common carotid artery in middle-aged men. *Atherosclerosis*. 1998;141: 307-14.

Karpe F, Steiner G, Uffelman K, Olivecrona T, Hamsten A. Postprandial lipoproteins and progression of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1994; 106:83–97.

Kawakami A. et al. Remnant lipoproteins and atherogenesis. *J Atheroscler Thromb*. 2005;12(2):73-6.

Kenneth CW, Cooper AD. Postprandial lipoprotein and atherosclerosis. *Frontiers in Bioscience*. 2001; 6 (1): d332-54.

Kicovic PM, Cortes-Prieto J, Luisi M, Franchi F. 1982 Placebo-controlled cross-over study of the effects of Org OD 14 in menopausal women. *Reproduction*. 6:81–91.

Klaus DA, Brandauer K, Schmidt N, Nau B, Schneider JG, Mentz S, Keiper T, Schaefer JR, Meissner C, Kather H. Low hepatic lipase activity is a novel risk factor for coronary artery disease. *Circulation*. 2001; 104:3057–62.

Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Daskalopoulou SS, Mikhailidis DP, Cokkinos DV. Clinical relevance of postprandial lipaemia. *Curr Med Chem*. 2005;12(17):1931-45.

Kwiterovich PO. The metabolic pathways of high-density lipoprotein low-density lipoprotein and triglycerides: A current review. *Am J Cardiol*. 2000; 21 86(12A):5L-10L.

Lassel TL, Guerin M, Auboiron s, et al. Evidence for a cholesteryl ester donor activity of LDL particles during alimentary lipemia in normolipidemic subjects. *Atherosclerosis*. 1999; 147: 41-8.

Lewis GF, O'Meara NM, Soltys PA, Blackman JD, Iverius PH, Pugh WL, Getz GS, Polonsky KS. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991; 72: 934-44

Lindsay R, Hart DM, Krasewski A. 1980 Prospective double-blind trial of synthetic steroid (Org OD 14) for preventing postmenopausal osteoporosis. *Br Med J*. 280:1207–1209.

Lima ES, Couto RD. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. *J Bras Patol Med Lab*. 2006; 2 (3): 169-78.

Maggi FM, Raselli S, Grigore L, Redaelli L, et al. Lipoprotein remnants and endothelial dysfunction in the postprandial phase. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. 2004; 89 (6): 2946-50.

Mahley RW, Weisgraber KH, Farese RV. Disorders of lipid metabolism. *Williams Textbook of Endocrinology* 2006; Ed W B Saunders 10^a ed Cap 34: 1642-91.

Mahley RW, Rall SC Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2000;1:507-37.

Mamo JC, Watts GF, Barrett PH, Smith D, James AP, Pal S. Postprandial dyslipidemia in men with visceral obesity: an effect of reduced LDL receptor expression? *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; Sep;281(3):E626-32.

Mangat R, Su J, Scott PG, Russell JC, Vine DF, Proctor SD. Chylomicron and apoB48 metabolism in the JCR:LA corpulent rat, a model for the metabolic syndrome. *Biochem Soc Trans*. 2007 Jun;35(Pt 3):477-81

Mann C.J. Mechanism of plasma cholesteryl ester transfer in hyper triglyceridemia. *Journal of Clinical Investigation*. 1991; 88: 2059-66.

Matikainen N, Mänttari S, Westerbacka J, Vehkavaara S, et al. Postprandial lipemia associates with liver fat content. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Aug;92(8):3052-9.

McNamara JR, Jenner JL, Li Z, et al. Change in LDL particle size is associated with change in plasma triglyceride concentration. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:1284-90.

Miljkovic-Gacic I, Bunker CH, Ferrell RE, Kammerer CM, Evans RE, Patrick AL, et al. Lipoprotein subclass and particle size differences in Afro-Caribbeans, African Americans, and white Americans: associations with hepatic lipase gene variation. *Metab Clin Experim*. 2006; 55: 96-102.

Mohrschladt MF, Beer F.S, Hofman M.K., Krabben M, Westendorp R.G.J., Smelt A.H.M. TaqIB polymorphism in CETP gene: the influence on incidence of cardiovascular disease in statin-treated patients with familial hypercholesterolemia. *European Journal of Human Genetics*. 2005; 13:877-82

Nagano M, Yamashita S, Hirano K, et al. Molecular mechanisms of cholesteryl ester transfer protein deficiency in Japanese. *Journal of Atheroscler Thromb*. 2004; 11 (3): 110-21.

Norata GD, Pirillo A, Catapano AL. Modified HDL: biological and physiopathological consequences. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006; Jul;16(5):371-86.

Okumura, K., Matsui, H., Kamiya, H., Saburi, Y., Hayashi, K., Hayakawa, T., Differential effect of two common polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein gene on low-density lipoprotein particle size. *Atherosclerosis*. 2002; 161: 425-31.

Ordovas JM, Cupples A, Corella D et al: Association of cholesteryl ester transfer protein-TaqIB polymorphism with variations in lipoprotein subclasses and coronary heart disease risk. *The Framingham Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1323– 1329.

Patsch JR, Karlin JB, Scott LW, Smith LC, Gotto AMJ. Inverse relationship between blood levels of high density lipoprotein subfraction 2 and the magnitude of postprandial lipemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 ;80:1449-53.

Patsch JR, Miesenbock G, Hopferwieser T, Muhlberger V, Knapp E, Dunn JK, Gotto Jr AM, Patsch W. *Arterioscler Thromb*. 1992; 12: 1336-45.

Patsch W, Kuisk I, Glueck C, Schonfeld G. Lipoproteins in familial hyperalphalipoproteinemia. *Arteriosclerosis*. 1981; Mar-Apr;1(2):156-61.

Perret B, Mabile L, Martinez L, Tercé F, Barbaras R, Collet X. Hepatic lipase: structure/function relationship, synthesis, and regulation. *J Lipid Res*. 2002; 43:1163-69.

Plump AS, Masucci-Magoulas L, Bruce C, et al. Increased atherosclerosis in apoE and LDL receptor gene knock-out mice as a result of human cholesteryl ester transfer protein transgene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1105–10.

Poredos P. Intima-media thickness: indicator of cardiovascular risk and measure of the extent of atherosclerosis. *Vasc Med.* 2004; 9(1):46-54.

Qiu X, Mistry A, Ammirati MJ, Chrnyk BA, Clark RW, Cong Y, et al. Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules. *Nat Struct Mol Biol.* 2007 Feb;14(2):106-13.

Quintão E, et al. *Colesterol e Aterosclerose 1992*; Ed Qualitymark - Rio de Janeiro.

Rader DJ. Mechanisms of Disease: HDL metabolism as a target novel therapies. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine.* 2007; 4 (2):102-9.

Ramsamy TA, Boucher J, Brown RJ, Yao Z, Sparks DL. HDL regulates the displacement of hepatic lipase from cell surface proteoglycans and the hydrolysis of VLDL triacylglycerol. *J Lipid Res.* 2003; 44: 733-41.

Rao SN, Cortese C, Miller NE, Levy Y, Lewis B. Effects of heparin infusion on plasma lipoproteins in subjects with lipoprotein lipase deficiency Evidence for a role of hepatic endothelial lipase in the metabolism of high-density lipoprotein subfractions in man. *FEBS Lett.* 1982; 150: 255-9.

Roche H.M, Gibney M.J. The impact of postprandial lipemia in accelerating atherothrombosis. *Journal Cardiovascular Risk.* 2000; 7 (5): 317-24.

Rufibach LE, Duncan SA, Battle M, Deeb SS. Transcriptional regulation of the human hepatic lipase (LIPC) gene promoter. *J Lipid Res.* 2006; 47(7):1463-77.

Rymer J, Chapman MG, Fogelman I. 1994 Effect of Tibolone on postmenopausal bone loss. *Osteoporosis Int.* 4:314 –319.

Salerno AG, Silva TR, Amaral ME, Alberici LC, Bonfleur ML, Patricio PR, Francesconi EP, Grassi-Kassisse DM, Vercesi AE, Boschero AC, Oliveira HC. Overexpression of apolipoprotein CIII increases and CETP reverses diet-induced obesity in transgenic mice. *International Journal of Obesity*. 2007; 31: 1586-95.

Sanders TA. Dietary fat and postprandial lipids. *Curr Atheroscler Rep*. 2003; 5 (6): 445-51.

Shohet RV, Vega GL, Anwar A, Cigarroa JE, Grundy SM, Cohen JC. 1999. Hepatic lipase (LIPC) promoter polymorphism in men with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1975–1978.

Sorlí JV, Corella D, Francés F, Ramírez JB, González JI, Guillén M, Portolés O. The effect of the APOE polymorphism on HDL-C concentrations depends on the cholesterol ester transfer protein gene variation in a Southern European population. *Clin Chim Acta*. 2006 Apr;366(1-2):196-203.

Stein EA, Myers GL. Lipídeos apolipoproteínas e lipoproteínas. *Tietz Fundamentos de Química Clínica* 1998; Ed Guanabara Koogan 4ªed Cap 22: 364-88.

Stein O, Stein Y. Lipid transfer proteins (LTP) and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2005; 178: 217-30.

Syeda F, Senault C, Delplanque B, Le Roy B, Thaminy A, et al. Postprandial variations in the cholesteryl ester transfer protein activity, phospholipid transfer protein activity and plasma cholesterol efflux capacity in normolipidemic men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2003 Feb;13(1):28-36.

Takayama M. A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. *Clin Chim Acta*. 1977; 79: 93-8.

Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *Journal of Lipid Research*. 1993;34:1255-74.

Tall AR. Plasma lipid transfer proteins. *Journal of Lipid Research*. 1986; (27):361-7.

Tanaka A. Postprandial hyperlipidemia and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2004; 11(6):322-9.

Tegos TJ, Kalodiki e, et al. The genesis of atherosclerosis and risk factors: A review. *Angiology.* 2001; 52 (2): 89-98.

Tentor J, Harada LM, Nakamura RT, Gidlund M, Castilho LN, Cotta de Faria E. Sex-dependent variables in the modulation of postalimentary lipemia. *Nutrition.* 2006; Jan;22(1):9-15.

The World Health Report 2002 and Cardiovascular Diseases — Prevention and Control
Who CVD Strategy 2001/2002.

Tholstrup T, Sandstrom AB, Holmer G. Effect of 6 dietary fatty acids on the postprandial lipid profile plasma fatty acids lipoprotein lipase and cholesterol ester transfer actives in healthy young mem. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2001; 73: 198-208.

Thomas TR, Horner KE, et al. Effect of exercise and medium-chain fatty acids on postprandial lipemia. *Journal of Applied Physiology.* 2001; 90 (4): 1239-46.

Thuren T. Hepatic lipase and HDL metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2000; 11(3):277-83.

Tsuji M, Ishii J, et al. Atherosclerosis and Metabolic disease *Rinsho Byori.* 2004; 52 (2): 126-35.

van der Steeg WA, Hovingh, GK, Klerkx AHEM, et al. Cholesteryl ester transfer protein and hyperalphalipoproteinemia in Caucasians. *Journal of Lipid Research.* 2007; 48:674-82.

Van Oostrom AJ, Sijmonsma TP, Verseyden C. Postprandial recruitment of neutrophils may contribute to endothelial dysfunction. *Journal of Lipid Research.* 2003; 44 (3): 576-83.

Van't Hooft FM, Lundahl B, Ragogna F, Karpe F, Olivecrona G, Hamsten A. Functional characterization of 4 polymorphism in promoter region of hepatic lipase gene, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(5): 1335-9.

Vigna GB, Delli Gatti C, Fellin R. Endothelial function and postprandial lipemia. *Nutr Metabolism Cardiovascular Disease*. 2004; 14 (3): 121-7.

Wang M, Briggs MR. HDL: the metabolism, function, and therapeutic importance. *Chem Rev*. 2004; 104(1): 119-37.

Weintraub M, Charach G, Grosskopf I. Disturbances in dietary fat metabolism and their role in the development of atherosclerosis. *Biomedical & Pharmacotherapeutic*. 1997; 51: 311-3.

Weintraub MS, Grosskopf I, Rassin T, Miller H, Charach G, Rotmensch HH, Liron M, Rubinstein A, Iaina A.. Clearance of chylomicron remnants in normolipidaemic patients with coronary artery disease: case control study over three years. *BMJ*. 1996; Apr 13;312(7036):936-9.

Wheba S, Machado RB, Fernandes CE, Ferreira JAS, de Mello NR, Aldrighi JM, Baracat EC. Aspectos Clínicos E Metabólicos de Mulheres Na Pós-Menopausa Tratadas com Tibolona. *RBGO*; 2000.

Yamashita S, Maruyama T, Hirano K, Sakai N, Nakajima N, Matsuzama Y. Molecular mechanisms lipoprotein abnormalities and atherogenicity of hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis*. 2000; 152 (2): 271-85.

Yamashita S, Sakai, Hirano K, et al. Roles of plasma lipid transfer proteins in reverse cholesterol transport. *Frontiers in Bioscience*. 2001; 6 (1): d366-87.

Yee HY, Jackson B. A semi-automated and manual method for determining the total phospholipid phosphorus in amniotic fluid. *Microchemistry Journal*. 1978; 23:460-5.

Young CE. et al. High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease. *Cardiol Rev*. 2004 ; 12(2) :107-19.

Zak Z, Gautier T, et al. Effect of cholesteryl ester transfer protein (CETP) expression on diet-induced hyperlipidemias in transgenic rats. *Atherosclerosis*. 2005; 178: 279-86.

Zambon A, Bertocco S, Vitturi N, Polentarutti V, Vianello D, Crepaldi G. Relevance of hepatic lipase to the metabolism of triacylglycerol-rich lipoproteins. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31(Pt 5):1070-4.

Zambon A, Deeb SS, Hokanson JE, Brown BG, Brunzell JD. Common variants in the promoter of the hepatic lipase gene are associated with lower levels of hepatic lipase activity, buoyant LDL, and higher HDL2 cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1723–1729.

Zhang C, Lopez-Ridaura R, Rimm EB, Rifai N, Hunter DJ, Hu FB. Interactions between the -514C/T polymorphism of the hepatic lipase gene and lifestyle factors in relation to HDL concentrations among US diabetic men. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81: 1429-1435.

Zhao S, Xie X, Nie S. The -250G/A polymorphism in the human hepatic lipase gene promoter affects blood lipids in Chinese. *Clin Clim Acta.* 2006; 365(1-2): 149-52.

Zhao SP, Liu L, Gao M, Zhou QC, Li YL, Xia B. Impairment of endothelial function after a high-fat meal in patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2001; 12: 561-5.

Zhong SE. A Increased coronary heart disease in japanese-american men with mutation in the Cholesteryl Ester Transfer Protein gene despite increased HDL levels. *The Journal of Clinical Investigation.* 1996; 97: 2917-23.

Anexos

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Eu, _____, fui informado, em detalhes, sobre o estudo intitulado “**Lipemia pós-prandial na deficiência humana da proteína de transferência de ésteres de colesterol ou da lipase hepática e em roedores**”. Eu entendo que minha participação é totalmente voluntária (sem qualquer forma de pagamento) e não constitui numa exigência condicional desta Instituição para que eu possa doar sangue, realizar exames laboratoriais, internamentos ou ser acompanhado ambulatorialmente.

O objetivo deste estudo é avaliar o período após a alimentação. Os resultados de todos os meus exames me serão comunicados por escrito.

Todos os dados pertencentes à minha participação neste estudo serão documentados e mantidos em segredo pelo grupo da pesquisa envolvido e, os resultados da pesquisa forem publicados, não serei identificado publicamente. Eu estou consciente de que não estou correndo nenhum risco de vida ou prejuízo à minha saúde física ou moral. Entendo também que podem ocorrer efeitos negativos leves próprios ao uso desta refeição e à punção venosa.

Por ser a minha participação totalmente voluntária, posso desistir do estudo a qualquer momento sem que isto resulte em qualquer penalidade ou perda dos benefícios desta instituição.

Se eu tiver alguma dúvida ou opinião com relação ao estudo, aos meus direitos, à minha participação, ou se quiser relatar um evento adverso ou desconforto, eu devo entrar em contato com a equipe médica do Ambulatório de Dislipidemias do qual sou paciente.

Concordo em cumprir as indicações do grupo que monitoriza e conduz este estudo e estou ciente de que vou obter os benefícios possíveis da atenção médica oferecida pelo mesmo.

Concordo que meu material biológico poderá ser estocado para futuros estudos:

() Sim () Não

Nome do paciente: _____

Assinatura: _____ Data: _____

_____/_____/_____

Endereço: _____

Telefones: _____ Assinatura do primeiro autor e equipe de médicos e pesquisadores responsáveis pelo projeto:

Aline Urban: _____

Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria / Departamento de Patologia Clínica / NMCE: (19) 3521-7064/ 3521-7231/
Dra. Vera S. Castanho /Ambulatório de Dislipidemias: (19) 3521-7755 /3521-8109 – Comitê de Ética em Pesquisa: (19) 3521-8936.

ANEXO 2



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 27/02/07.

(PARECER PROJETO: Nº 681/2005)

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “EFEITOS DAS VARIAÇÕES NA ATIVIDADE DA PROTEÍNA DE TRANSFERÊNCIA DE COLESTERIL ESTER SOBRE O METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS RICAS EM TRIGLICÉRIDES: ESTUDO *IN VIVO* EM MULHERES ADULTAS”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Aline Urban

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a Emenda que altera do título para “**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA REDUÇÃO E DO AUMENTO NAS ATIVIDADES DA PROTEÍNA DE TRANSFERÊNCIA DE ÉSTERES DE COLESTEROL E DA LIPASE HEPÁTICA SOBRE O METABOLISMO PÓS ALIMENTAR DE LIPOPROTEÍNAS RICAS EM TRIGLICÉRIDES: ESTUDO *IN VIVO* EM HUMANOS**”, bem como o adendo que acrescenta a medida da lipase hepática utilizando plasma pós heparina, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

Homologado na II Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de fevereiro de 2007.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br