

TRANSFERÊNCIA "IN VITRO" DE COLESTERIL-OLEATO ENTRE AS LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE ALTA E BAIXA DENSIDADES MEDIADA PELA PROTEÍNA DE TRANSFERÊNCIA DE ÉSTER DE COLESTEROL: EFEITOS DE MODIFICAÇÕES QUÍMICAS NAS LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE.

1996

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	C278t
V.	EX.
TOMBO	30473
PROC.	281197
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	23/05/97
N.º CPD	

CM-00098911-6

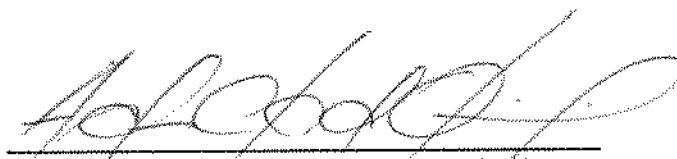
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

C278t Castilho, Lucia Nassi
Transferência "in vitro" de colesteril-oleato entre as lipoproteínas plasmáticas de alta e baixa densidades mediada pela proteína de transferência de éster de colesterol: efeitos de modificações químicas nas lipoproteínas de baixa densidade / Lucia Nassi Castilho. -- Campinas, SP: [s.n.], 1996.

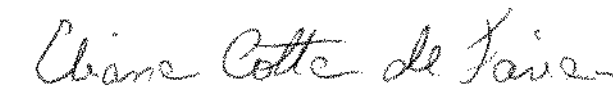
Orientador: Admar Costa de Oliveira
Co-orientador: Eder C. R. Quintão
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

I. Ésteres. 2. Colesterol. 3. Lipoproteína.
4. Aterosclerose. I. Oliveira, Admar Costa de.
II. Quintão, Eder C. R. III. Universidade Estadual de
Campinas Faculdade de Engenharia de Alimentos.
IV. Título.

BANCA EXAMINADORA



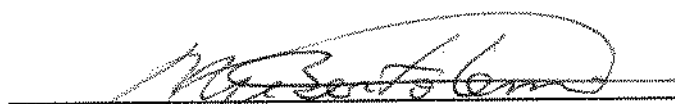
Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira
Orientador



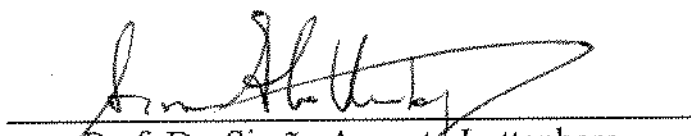
Profª. Drª. Eliana Cotta de Faria
Membro



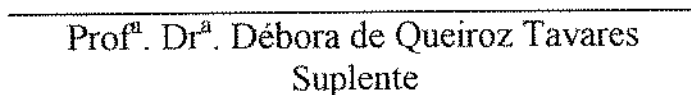
Profª. Drª. Helena Coutinho Franco de Oliveira
Membro



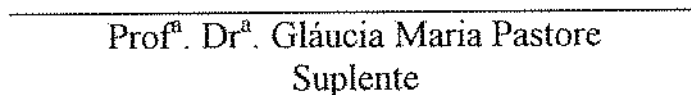
Prof. Dr. Marcelo Chiara Bertolami
Membro



Prof. Dr. Simão Augusto Lottenberg
Membro



Profª. Drª. Débora de Queiroz Tavares
Suplente



Profª. Drª. Gláucia Maria Pastore
Suplente

Aos meus pais pelo apoio, incentivo e carinho nos momentos mais difíceis da minha carreira.

À Fernanda e Gabriela pelo amor, paciência e incentivo constantes nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira pela confiança, orientação e apoio na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eder C. R. Quintão, Chefe do Laboratório de Lípidos da Faculdade de Medicina da USP pela sua constante orientação, pelo exemplo de rigor científico e pela possibilidade de executar o presente trabalho em seu Laboratório. Agradeço também seu apoio e amizade nesses 20 anos de convívio.

À Patrícia M. Cazita, que com sua dedicação e competência participou ativamente da execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio Sesso e sua equipe pela execução da microscopia eletrônica das lipoproteínas e por seu apoio na interpretação dos resultados.

Aos estatísticos Hélio José de Abreu e Eliani Guelli pela orientação e preparação das análises estatísticas.

Aos demais colegas do Laboratório de Lípidos da Faculdade de Medicina da USP: Aderson Damião, Alexandre Carrilho, Alice Shimabukuro, Ana Maria Lottenberg, Aytan Sipahi, Cláudia Mitsue Inuy, Edna Nakandakare, Jussara Rocha, Lila Harada, Márcia Carvalho, Márcia Bernik, Marisa Passarelli, Monica Neves, Rosibel Silva, Senária Eguti, Sérgio Catanozzi, Valéria Nunes, Wilson Medina pela colaboração e apoio constantes.

Aos Docentes e funcionários do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição pelo apoio.

Ao Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, através de seus representantes Prof. Dra. Maria de Fátima Sonatti e Prof. Dra. Helena Z.W. Grotto, pela possibilidade de concluir meus experimentos em São Paulo e, em especial, aos meus colegas da Disciplina de Bioquímica Clínica.

A todos os funcionários da Seção de Bioquímica Clínica do Laboratório de Patologia Clínica /HC/UNICAMP pela colaboração.

À Angélica, Heloísa, Litton, José Eduardo, José Omar, Maria Eugênia, Rita, Rosane pela amizade e apoio.

Ao André Schibuola pela paciência e constantes ensinamentos em computação.

À toda minha família pela compreensão, apoio e incentivo.

SUMÁRIO

Índice Geral	7
Índice de Tabelas	9
Índice de Figuras	10
Resumo	12
Abstract	14
Introdução	16
Objetivos	18
Revisão Bibliográfica	20
Material e Métodos	47
Resultados	58
Discussão	76
Conclusões	85
Referências Bibliográficas	86

ÍNDICE GERAL

Índice de Tabelas	9
Índice de Figuras	10
Resumo	12
Abstract.....	14
1 Introdução	16
2 Objetivos	18
3 Revisão Bibliográfica.....	20
3.1 Metabolismo das Lipoproteínas	20
3.2 Metabolismo de Quilomícrons	24
3.3 Metabolismo das VLDL e LDL	25
3.4 Metabolismo das HDL.....	27
3.5 Caracterização da CETP.....	28
3.6 CETP e metabolismo de lípides.....	31
3.7 CETP e aterosclerose.....	36
3.8 Modificações das lipoproteínas e aterogênese	38
4 Material e Métodos.....	47
4.1 Material	47
4.2 Métodos	48
4.2.1 Coleta de sangue.....	48
4.2.2 Isolamento das LDL.....	48
4.2.3 Marcação isotópica das HDL	49
4.2.4 Marcação isotópica das LDL	50
4.2.5 Acetilação das LDL	50
4.2.6 Oxidação das LDL.....	51
4.2.7 Determinação da composição química das lipoproteínas	51

4.2.8 Ensaio de transferência de éster de colesterol	52
4.2.9 Medida de diâmetro das LDL.....	54
4.3 Cálculos e Análise Estatística.....	55
4.3.1 Transferência de colesterol-oleato- ¹⁴ C de HDL para LDL ...	55
4.3.2 Transferência de colesterol-oleil-éter- ³ H de LDL para HDL..	55
4.3.3 Análise estatística	56
5 Resultados	58
5.1 Transferência de colesterol-oleato- ¹⁴ C de HDL para LDL normais e acetiladas.....	59
5.2 Transferência de colesterol-oleato- ¹⁴ C de HDL para LDL normais e oxidadas	60
5.3 Transferência de colesterol-oleil-éter- ³ H de LDL normais e oxidadas para HDL	61
5.4 Medida de diâmetro das LDL por microscopia eletrônica de transmissão	63
6 Discussão	76
7 Conclusões	85
8 Referências Bibliográficas	86

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - Experimento piloto de transferência de colesterol-oleato da HDL2 e HDL3 marcadas com colesteril - oleato - ¹⁴ C ou colesterol - ¹⁴ C.....	64
TABELA 2 - Composição química das lipoproteínas utilizadas no experimento de acetilação	64
TABELA 3 - Composição química das lipoproteínas utilizadas no experimento de oxidação	65

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - Ensaio de transferência de colesterol-oleato - ^{14}C da HDL para LDL	53
FIGURA 2 - Medida de diâmetro da LDL por microscopia eletrônica de transmissão	57
FIGURA 3 - Eletroforese em gel de agarose da LDL normal, acetilada e oxidada	66
FIGURA 4 - Cinética da transferência de colesterol-oleato da HDL ₂ (4A) e da HDL ₃ (4B) para LDL normal e acetilada	67
FIGURA 5 - Transferência percentual de colesterol-oleato das HDL (HDL ₂ e HDL ₃) para as LDL normal e acetilada.....	68
FIGURA 6 - Transferência percentual de colesterol-oleato de HDL ₂ e HDL ₃ para as LDL (normal e acetilada)	68
FIGURA 7 - Cinética da transferência de colesterol-oleato das HDL em conjunto para aLDL normal ou acetilada.....	69
FIGURA 8 - Cinética da transferência de colesterol-oleato das HDL ₂ e HDL ₃ para o conjunto de LDL (normal e acetilada)	69
FIGURA 9 - Cinética da transferência de colesterol-oleato da HDL ₂ (9A) e HDL ₃ (9B) para LDL normal e acetilada	70

FIGURA 10 - Transferência percentual de colesterol-oleato das subpopulações de HDL (HDL ₂ e HDL ₃) para LDL normal e oxidada.....	71
FIGURA 11 - Transferência percentual de colesterol-oleato das HDL ₂ e HDL ₃ para o conjunto de LDL (normal e oxidada).....	71
FIGURA 12 - Transferência percentual de colesterol-oleato das lipoproteínas doadoras (HDL ₂ e HDL ₃) para as lipoproteínas receptoras (LDL normal e oxidada).....	72
FIGURA 13 - Cinética da transferência de colesterol-oleil-éter da LDL normal e oxidada para a HDL ₂ (13A) e para HDL ₃ (13B)	73
FIGURA 14 - Transferência percentual de colesterol-oleil-éter da LDL normal e oxidada para o conjunto de HDL (HDL ₂ e HDL ₃)	74
FIGURA 15 - Transferência percentual de colesterol-oleil-éter das LDL (normal e oxidada) para a HDL ₂ e HDL ₃	74
FIGURA 16 - Fotografias da microscopia eletrônica de transmissão das LDL normal, oxidada e acetilada (respectivamente 16A, 16B e 16C)	75

RESUMO

O transporte reverso de colesterol é um dos mecanismos que podem explicar a relação inversa entre os níveis plasmáticos de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e a incidência de doença aterosclerótica no homem. Por esse processo, o colesterol dos tecidos periféricos, inclusive da parede arterial, é removido das membranas celulares pelas HDL, esterificado pela lecitina-colesterol-aciltransferase e, posteriormente, captado pelo fígado (transporte reverso direto de colesterol). O colesterol celular também é removido por via indireta, ou seja, pela transferência do colesterol esterificado das HDL para as lipoproteínas que contêm apo B (lipoproteínas de muito baixa e baixa densidade, respectivamente VLDL e LDL) as quais são captadas por receptores específicos hepáticos. Essa etapa é mediada pela proteína de transferência de éster de colesterol (CETP).

As lipoproteínas de baixa densidade são quantitativamente as mais importantes lipoproteínas carreadoras de colesterol. Elas estão positivamente associadas ao desenvolvimento da aterosclerose e, desta forma, altas concentrações de LDL plasmáticas e/ou modificações químicas destas lipoproteínas, como a oxidação, são condições relacionadas diretamente ao aumento da incidência da doença aterosclerótica.

Com o objetivo de avaliar a atividade da CETP frente a modificações químicas induzidas artificialmente nas LDL, foram feitos experimentos de medida de transferência de éster de colesterol radioativamente marcado entre as lipoproteínas.

Lipoproteínas obtidas a partir de "pool" de plasma de indivíduos normais, foram modificadas "in vitro" por acetilação ou oxidação e foram incubadas com HDL₂ e HDL₃ previamente marcadas com éster de colesterol radioativo, na

presença de CETP contida na fração do plasma de $d > 1,21 \text{ g/mL}$. Após vários períodos de incubação, as lipoproteínas foram reisoladas por precipitação das LDL com sulfato de dextrana/ MgCl_2 e a radioatividade medida no sobrenadante.

Os resultados obtidos mostraram diminuição média significativa na transferência de éster de colesterol das subpopulações de HDL (HDL_2 e HDL_3 em conjunto) para as LDL modificadas por acetilação ($p=0,0001$) ou por oxidação ($p=0,0088$), quando comparadas às respectivas LDL normais. A diminuição encontrada na porcentagem de transferência das HDL para a LDL acetilada foi de 1,8 vezes e para a LDL oxidada foi de 1,5 vezes em relação às respectivas LDL normais.

A via inversa, ou seja, transporte de éster de colesterol da LDL oxidada para as subpopulações de HDL, apresentou um aumento médio significativo ($p=0,0005$) de cerca de 2 vezes, quando comparado à LDL normal.

A diminuição da transferência de colesterol esterificado (CO) das HDL para as LDL modificadas contribui para que estas lipoproteínas aterogênicas ganhem menos colesterol do que as LDL não modificadas. Por outro lado, a maior transferência de colesterol-oleato das LDL oxidadas para as HDL, resulta na redistribuição do colesterol oxidado para uma fração lipoprotéica antiaterogênica. Como o destino metabólico das LDL modificadas é a captação por macrófagos na parede arterial (ateroma) e o das LDL e das HDL normais é o hepatócito (excreção de colesterol do corpo), os resultados mostraram que a CETP favoreceu a redistribuição do colesterol plasmático para as lipoproteínas íntegras, antiaterogênicas, indicando um possível papel antiaterogênico da CETP o que também foi recentemente descrito em um estudo populacional.

ABSTRACT

Reverse transport of cholesterol is a mechanism that possibly explains an inverse correlation between high density lipoprotein (HDL) levels and the incidence of atherosclerosis. In this process peripheral cholesterol tissue, including that of the arterial wall, is removed from cellular membranes by HDL, esterified by lecithin-cholesterol-acyltransferase and thereafter taken up by the liver (direct reverse transport of cholesterol). Cellular cholesterol is also transported by an indirect way, that is, by means of the transfer of esterified cholesterol from HDL to the lipoproteins that contain apo B (low and very low density lipoproteins, respectively, VLDL and LDL) and that is internalized by specific hepatic receptors. This step is mediated by the cholesterol ester transfer protein (CETP).

Low density lipoproteins quantitatively are the most important carriers of cholesterol. They are positively associated with the development of atherosclerosis, and in this way, high concentrations of plasma LDL and chemical modification of these lipoproteins are conditions directly related to atherogenesis.

In order to study the activity of CETP on LDL particles chemically modified, experiments were made to measure the transfer of radioactive cholesteryl ester between lipoproteins.

Lipoproteins obtained from the plasma pool of normal individuals were modified "in vitro" by acetylation or oxidation, and were incubated with HDL₂ and HDL₃ containing radioactive cholesteryl ester in the presence of CETP from plasma fraction of $d > 1.21 \text{ g/mL}$. After various incubation periods, the lipoproteins were isolated again by precipitation of LDL with dextran sulfate/MgCl₂ and the radioactivity measured in the supernatant.

The results obtained showed a significant average diminution in the transfer of cholesteryl ester from HDL₂ and HDL₃ to the LDL modified by acetylation or

by oxidation, when compared to the normal LDL. In the inverse direction that is, the transport of oxidized LDL cholesteryl ester to the subpopulations of HDL presented a significant average increase, when compared to normal LDL.

The diminished transfer rate of esterified cholesterol (CO) from HDL to the modified LDL brings about a significantly smaller enrichment of the latter with cholesterol. On the other hand, the faster transfer rate of CO from oxidized LDL to HDL lessens the atherogenic potential of the former lipoproteins.

Taking into account that modified LDL is bound to accumulate into the arterial wall whereas normal LDL and HDL are preferentially taken up by the hepatocyte, the data suggest that CETP plays a beneficial role favoring the excretion of cholesterol from the body, which is in agreement with a recent epidemiological study suggesting an antiatherogenic role of CETP.

1 INTRODUÇÃO

As lipoproteínas plasmáticas são complexos macromoleculares formados principalmente por lipídeos e proteínas, sendo responsáveis pela distribuição dos lipídeos de origem exógena (dieta) e endógena (fígado) para os tecidos.

NICHOLS & SMITH mostraram em 1965 a existência da transferência recíproca de éster de colesterol e triacilgliceróis entre lipoproteínas, em incubações de plasma humano. Essa descoberta passou a ter grande interesse no sentido de se entender a dinâmica do processo “in vivo” e o mecanismo que propicia a troca de lipídeos não polares de uma lipoproteína para outra, num meio aquoso como o plasma. Estudos feitos nos últimos 15 anos revelaram a existência de uma proteína específica (Cholesteryl Ester Transfer Protein - CETP) capaz de transferir lipídeos neutros entre lipoproteínas no plasma de várias espécies, inclusive no do homem.

Atualmente, sabe-se que a atividade dessa proteína está relacionada diretamente ao complexo mecanismo do transporte reverso de colesterol que se inicia com o efluxo de colesterol livre dos tecidos para as HDL e continua com a esterificação deste pela ação da enzima lecitina-colesterol-aciltransferase (LCAT) no plasma. A partir daí, ocorre um processo de transferência do éster de colesterol para as lipoproteínas de baixa densidade (VLDL e LDL), mediado pela CETP, redirecionando o colesterol de origem celular para o fígado, onde será metabolizado a ácidos biliares, excretado, ou novamente incorporado às lipoproteínas.

A literatura é controversa a respeito do processo de transferência de éster de colesterol e sua relação com o risco de desenvolvimento da aterosclerose. Se, por um lado, esse processo leva mais colesterol esterificado para o fígado, por outro lado, acarreta aumento da sua concentração em partículas aterogênicas

como as lipoproteínas de muito baixa e baixa densidade (VLDL e LDL). MAROTTI et alii (1993), trabalhando com camundongos transgênicos expressando altos níveis de CETP de macacos, mostraram que esses animais são mais suscetíveis a desenvolver aterosclerose após ingestão de dieta rica em gordura e colesterol do que animais controles que não expressavam CETP. Por outro lado, ZHONG et alii (1996) mostraram que japoneses com deficiência genética de CETP apresentam aumento da incidência da doença coronariana.

O processo de transferência consiste da troca contínua de ésteres de colesterol das HDL por ésteres de colesterol (“exchange”) ou por triacilgliceróis (“heteroexchange”) provenientes de outras lipoproteínas. Vários fatores interferem nesse processo como por exemplo jejum, as concentrações de apolipoproteína E, alterações estruturais das lipoproteínas tais como oxidação e glicação. Assim, estudos de alterações na composição e na estrutura das lipoproteínas e seu reflexo na transferência de lipídeos, e consequentemente no transporte reverso de colesterol, são importantes para a compreensão de distúrbios do metabolismo das lipoproteínas ligados à aterogênese.

Sabe-se que as LDL infiltram-se para o interstício da parede arterial normal e acumulam-se em quantidades que são reguladas pela integridade do endotélio, da lâmina elástica interna e da composição química da íntima. O aumento do número de partículas de LDL no interstício, secundário a sua alta concentração plasmática, e a tendência das LDL de ligar-se a proteoglicanos podem aumentar seu tempo de residência no interstício, levando à maior probabilidade de sua oxidação por radicais livres gerados pelo próprio endotélio, pelas células do músculo liso ou por macrófagos. LDL pequenas e densas, que são sinais característicos do aumento de risco para a aterosclerose, são mais capazes de atravessar o endotélio e, coincidentemente, mais suscetíveis à oxidação do que outras subpopulações de LDL, como já foi demonstrado “in vitro” (CHAIT et alii, 1993).

A acetilação da LDL, embora não seja observada “in vivo”, é um modelo de modificação química classicamente utilizado desde a década de 70 para o estudo do comportamento metabólico de lipoproteínas anômalas, como por exemplo, na elegante série de trabalhos de Brown e Goldstein, que lhes conferiu o Prêmio Nobel de Medicina, em 1985. Essa modificação artificial precedeu a demonstração de alterações naturais que ocorrem nas LDL tornando-as aterogênicas, como a oxidação e a glicação.

Diversas situações clínicas como diabete, hipercolesterolemia, insuficiência renal crônica, tabagismo, e a presença de variantes genéticas de LDL, como LDL pequenas, podem acelerar a oxidação da LDL.

Uma das propriedades associadas às LDL extensivamente oxidadas é a sua capacidade de serem reconhecidas por receptores “scavengers” das células fagocitárias, resultando em contínuo acúmulo intracelular de colesterol esterificado e na formação das células espumosas, que são os sinais característicos da lesão aterosclerótica.

2 OBJETIVOS

Foi objetivo do presente trabalho avaliar a interação entre dois importantes processos fisiopatológicos: a atividade da CETP plasmática e as modificações químicas das lipoproteínas de baixa densidade. Para tanto, produzimos artificialmente LDL acetiladas e oxidadas para estudar o potencial da CETP em modificar os fluxos de éster de colesterol entre essas lipoproteínas modificadas e as HDL que são lipoproteínas antiaterogênicas.

Estudando essas interações, propusemo-nos a responder às seguintes perguntas:

- 1) Modificações químicas nas partículas receptoras (LDL modificada por acetilação ou oxidação) alteram o processo de transferência de éster de colesterol mediado pela CETP quando incubadas com HDL₂ e HDL₃ ?
- 2) Nas LDL oxidadas “in vitro” pode a CETP modificar sua aterogenicidade, promovendo alteração de seu conteúdo de éster de colesterol ?
- 3) Qual das subpopulações de HDL (HDL₂ ou HDL₃) é melhor doadora/receptora de éster de colesterol no processo de transferência, mediado pela CETP em incubações com LDL ?
- 4) As possíveis alterações no processo de transferência de éster de colesterol entre lipoproteínas plasmáticas podem ser explicadas por eventual mudança no tamanho das partículas quimicamente modificadas ?

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS

As lipoproteínas plasmáticas (LP) são complexos macromoleculares compostos por lipídeos e proteínas. Os componentes apolares (triacilgliceróis - TAG e colesterol esterificado - CE) constituem o núcleo hidrofóbico e os polares (fosfolipídeos, colesterol livre e proteínas) constituem uma monocamada superficial que confere estabilidade à partícula em meio aquoso. Embora esta estrutura geral seja a mesma para todas as lipoproteínas, é importante salientar que encontramos no plasma um amplo espectro de partículas que variam em sua composição e conseqüentemente em tamanho, densidade e carga elétrica. Estas diferenças permitem uma classificação das lipoproteínas baseadas em critérios eletroforéticos e de ultracentrifugação. Assim podemos identificar 5 principais classes de LP, além de várias subfrações de acordo com suas densidades (ATKINSON & SMALL, 1986; GOTTO et alii, 1986) :

- a) Quilomicrons (QM) são as partículas com densidade menor que 0,95 g/mL e de tamanho entre 750 - 12000 Å
- b) Lipoproteínas de densidade muito baixa ("Very Low Density Lipoproteins" - VLDL) são as partículas com densidade menor que 1,006g/mL, com tamanho variando entre 300 - 800 Å
- c) Lipoproteínas de densidade intermediária ("Intermediate Density Lipoproteins" - IDL) com densidade entre 1,006 - 1,019 g / mL e tamanho entre 250 -350Å
- d) Lipoproteínas de densidade baixa ("Low Density Lipoproteins" - LDL) com densidade entre 1,019 -1,063 g/mL e tamanho entre 180 - 250Å
- e) Lipoproteínas de alta densidade ("High Density Lipoproteins" - HDL), geralmente subfracionada em HDL₂ com densidade entre 1,063 - 1,125 g / mL e

tamanho entre 90 - 120 Å e, HDL₃ com densidade entre 1,125 - 1,210 g / mL e tamanho entre 50 - 90Å.

Os QM e VLDL são as maiores lipoproteínas, essencialmente transportadoras de triacilgliceróis, sendo os QM responsáveis pelo transporte dos TAG de origem intestinal e as VLDL pelos TAG de origem hepática.

As IDL praticamente não são detectadas no plasma de indivíduos normais, pois representam uma etapa intermediária na transformação das VLDL em LDL que ocorre no compartimento vascular devida, principalmente, à ação da lipoproteína lipase (LLP) (ECKEL & WITTE, 1989; EISENBERG, 1986).

As LDL, derivadas das VLDL, são as principais LP transportadoras de colesterol no homem. Cerca de 60 a 70% do colesterol total do plasma encontra-se nesta fração, sendo que 3/4 deste estão sob a forma esterificada (GOTTO et alii, 1986).

As HDL contém 50% de proteína e os outros 50% de fosfolipídeos e colesterol e apenas traços de triacilgliceróis.

As proteínas das LP, denominadas apolipoproteínas (apoLP), são classificadas em 4 grupos principais designados pelas letras A,B,C,E. Elas não são apenas importantes para a solubilização dos lipídeos mas também para a regulação do seu metabolismo, atuando como cofatores de enzimas-chave e mediando a interação das LP com receptores celulares responsáveis pela remoção das partículas do plasma (QUINTÃO et alii, 1989). Diferem entre si sob vários aspectos: peso molecular, solubilidade em meio aquoso, atividade biológica (ativação e inibição enzimática) e reconhecimento por receptor.

A apoLP AI é o principal componente das HDL, estando presente também nos QM, VLDL e seus remanescentes mas não é encontrada nas LDL. É sintetizada no fígado e intestino e sofre alterações intracelulares antes de atingir o plasma (GORDON et alii, 1982). Existem, descritas na literatura, no mínimo 10 variantes genéticas que podem ou não ter repercussão clínica, desde a ausência de apo AI,

característica da doença de Tangier (ZANNIS et alii, 1982), até outras alterações na composição de aminoácidos que aparentemente são inócuas. Esta apoLP ativa a enzima lecitina-colesterol-aciltransferase (LCAT) que é responsável pela esterificação do colesterol no plasma.

A apoLP AII é encontrada nas mesmas classes de lipoproteínas que a apoLP AI, mas em menores concentrações e pouco se sabe sobre sua função fisiológica. A apoLP AII, da mesma forma que a apo AI, tem pequena afinidade pelos componentes lipídicos das lipoproteínas e pode deslocar-se facilmente entre elas.

A apoLP B está presente nos QM, VLDL, IDL e LDL. Sua principal característica é seu alto peso molecular (PM), estimado entre 250 a 500 kDa, e sua baixa solubilidade, o que impede seu deslocamento entre as LP. Dessa forma, a presença permanente de apo B na lipoproteína permite acompanhar suas transformações na circulação. Existem dois tipos principais de apo B que se originam de um mesmo gene: apo B 100, de PM mais elevado, é sintetizada exclusivamente no fígado e, portanto, presente nas VLDL, IDL e, especialmente nas LDL, delas derivadas (KANE, 1983). A apo B 48, que tem PM mais baixo, é sintetizada somente no intestino e está presente nos QM e seus remanescentes. As apo B são glicoproteínas ligadas covalentemente a carboidratos. A apo B48 compreende a porção aminoterminal da apo B 100. Sua biossíntese no intestino é regulada em fase pós-transcricional pela troca de um único nucleotídeo do códon 2353 do mRNA que codifica a apo B. Essa troca de bases promove a substituição do códon CAA, que corresponde ao aminoácido glutamina, pelo códon UAA que termina a tradução (HIGUCHI et alii, 1988).

A LDL é reconhecida por receptores B-E, também chamados receptores de LDL, que identificam a apo B mas que têm alta afinidade pelas apo E, também presentes nas LDL (GRUNDY, 1984). Quando ocorrem modificações químicas

na apo B, as LDL deixam de ser reconhecidas pelos seus receptores específicos, tornando-se mais pró-aterogênicas.

As apoLP C são subdivididas em CI, CII e CIII e estão presentes na superfície de QM, VLDL e HDL. As apo C são as de menor PM (6000-8000 Da) e deslocam-se facilmente entre as LP. Por exemplo, no jejum encontram-se predominantemente nas HDL; durante a absorção de lipídeos, as HDL fornecem apo C para os QM que, ao sofrerem lipólise, retornam as apo C para as HDL. A apo CI ativa a LCAT (SOUTAR et alii, 1975), facilitando a formação de éster de colesterol, e por meio da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP), este será deslocado para os remanescentes de lipoproteínas ricas em triglicerídeos. A apo CII é a principal ativadora da enzima lipoproteína lipase (LLP) (La ROSA et alii, 1970) e sua ausência causa severa hiperquilomicronemia (BRECHERINDGE et alii, 1978). Nesta condição não ocorre aterosclerose precoce, provavelmente pelo fato de não serem gerados remanescentes de QM, que seriam as lipoproteínas potencialmente aterogênicas (ZILVERSMIT, 1979). A apo CIII tem papel antagonista ao da apo CII, sendo sua principal ação a de inibir a lipoproteína lipase, diminuindo a captação dos remanescentes das lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (SCHAEFER et alii, 1985).

As apoLP E são glicoproteínas encontradas em todas as lipoproteínas circulantes, sendo sintetizadas no fígado e em tecidos extra-hepáticos (DRISCOLI & GETZ, 1984). Existem várias isoformas da apo E resultantes da expressão de três genes alelos possibilitando identificar três fenótipos homozigóticos: E 4/4; E 3/3; E 2/2 e três heterozigóticos: E 4/3; E 4/2; E 3/2. Nos hepatócitos há dois tipos de receptores que reconhecem a apo E: receptor B-E (ou receptor de LDL) que capta as LP contendo apo B100 e apo E e o receptor E (ou LRP - LDL Receptor Related Protein) que reconhece somente a apo E das lipoproteínas. Dessa forma, toda lipoproteína contendo apo E tem duas vias de entrada no hepatócito. O receptor E caracteriza-se por possuir vários sítios

capazes de interagir com a apo E (OSWALD & QUADFORDT, 1987). Assim, LP contendo apo E são mais rapidamente removidas da circulação do que a LDL, que é pobre neste tipo de apolipoproteína. O grau de afinidade das apo E pelo receptor E é, em ordem decrescente, $E_4 > E_3 > E_2$. O fenótipo E2/2 ocorre na hiperlipidemia do tipo III (classificação de Fredrickson), onde se acumulam remanescentes de VLDL no plasma (GRUNDY, 1984). Nos indivíduos de genótipo E4/E4, as VLDL têm alta afinidade pelos receptores e são captadas preferencialmente em relação às LDL, resultando na elevação plasmática desta última. O inverso ocorre no genótipo E2/E2 onde a afinidade do receptor pelas apo E é menor, o que ocasiona menor captação hepática das VLDL e portanto, maior possibilidade de ocupação dos receptores pela LDL, diminuindo seu nível plasmático. O gene E3 ocupa uma posição intermediária nesse processo.

3.2 METABOLISMO DOS QUILOMÍCRONS

A metabolização intravascular dos QM ocorre em duas etapas: 1) os triacilgliceróis são removidos pela ação da lipoproteína lipase que se localiza na superfície endotelial dos capilares dos tecidos extra-hepáticos, principalmente músculo e tecido adiposo. Durante este processo ocorre a transferência de fosfolípidos e colesterol e trocas de apoLP com as HDL circulantes (TALL et alii, 1979); 2) as partículas resultantes, os remanescentes de QM, contendo massa residual de triglicerídeos não hidrolisados e praticamente toda a massa original de colesterol esterificado das partículas precursoras, são captados pelo fígado por endocitose mediada por receptor específico que reconhece as apoLP E desses remanescentes (MAHLEY et alii, 1989). A mudança no elenco de apo LP durante a metabolização do QM é crítica na determinação de sua velocidade de remoção plasmática: os QM inicialmente ganham apo C das HDL que vão ativar a LLP. Com o decorrer da hidrólise perdem as apo C e ganham apo E. A perda de apo C

encerra a ação da LLP e permite a captação hepática pelo receptor que reconhece a apo E (HAVEL, 1986). Todo esse processo é de alta eficiência de tal modo que a meia vida da partícula na circulação é menor que 10 minutos, sendo praticamente todo remanescente de QM captado pelo fígado e, em menor extensão, pelos macrófagos do fígado (células de Kupffer). A ligação entre a partícula remanescente e o sítio de remoção no hepatócito é exclusivamente dependente da interação entre a apoE e o receptor celular específico. A apo E possui regiões ricas em aminoácidos básicos que constituem o domínio de reconhecimento pelo receptor de alta afinidade, localizado na membrana celular e denominado "receptor de partículas remanescentes" ou LRP (LDL - Receptor Related Protein) (HERZ et alii, 1988). A apoB 48 exerce função estrutural no remanescente de QM por sua alta hidrofobicidade, não participando da interação entre a lipoproteína e o receptor LRP.

3.3 METABOLISMO DAS VLDL E LDL

As etapas iniciais do catabolismo vascular das VLDL são essencialmente as mesmas dos QM embora seu "turnover" seja mais lento (MYANT, 1990). A velocidade de hidrólise dos triacilgliceróis é função do tamanho da VLDL, pois partículas maiores são secretadas com mais moléculas de apo C, possibilitando assim maior número de interações produtivas com a LLP (GOTTO et alii, 1986). Como ocorre nos QM, à medida que a partícula sofre depleção nos triacilgliceróis, os fosfolípidos, colesterol livre e apoLP vão sendo transferidos para as HDL, gerando os chamados remanescentes de VLDL ou IDL, que praticamente só contém apo B 100 e apo E como componentes protéicos. No homem, uma parte das IDL é rapidamente captada pelo fígado por endocitose mediada por receptor B/E e 60 a 90% continuam circulando e perdendo mais triacilgliceróis, fosfolípidos e praticamente toda apo E, principalmente devido à

ação da lipase hepática. Essa enzima, que está presente nos capilares sinusóides hepáticos, apresenta características um pouco diferentes da LLP: além da atividade trigliceridase, tem atividade fosfolipase. Essa metabolização final, transforma a IDL em LDL, que contém praticamente apenas colesterol esterificado e apo B 100. Seu "turnover" é bem mais lento, por volta de 2 dias (MYANT, 1990). Ambas IDL e LDL, são removidas do plasma por receptores de LDL, que reconhecem sítios idênticos na cadeia da apo E e da apo B 100. Estudos de competição entre VLDL e LDL em perfusão de fígado mostram que as VLDL são captadas através de receptores de LDL, em sítios independentes (ESBACH et alii, 1994).

As LDL transportam colesterol para os tecidos em proliferação e tecidos esteroideogênicos, mas principalmente, retornam ao fígado (STANGE & DIESTCHY, 1984; GOTTO et alii, 1986; RUDLING et alii, 1990). Uma vez supridas as necessidades das células, a elevação do nível intracelular do colesterol derivado da IDL, LDL ou remanescentes de QM, inibe completamente a biossíntese do colesterol e a síntese de receptores B/E (BROWN & GOLDSTEIN, 1986), impedindo a entrada adicional de colesterol exógeno na célula por essa via. Essa ação regulatória protege a célula do efeito lesivo do excesso de colesterol. Apesar desse mecanismo protetor, elevado nível sanguíneo de LDL ou de LP remanescentes ricas em colesterol pode, por si só, desencadear a formação de ateroma nas paredes arteriais (STEINBERG et alii, 1989). A maior concentração plasmática de LDL leva a maior infiltração dessa LP para o espaço subendotelial (STEINBERG et alii, 1989), onde sofre modificações principalmente oxidativas (HEINECKE et alii, 1984; HENRICKSEN et alii, 1981; PALINSKI et alii, 1989; PARTHASARATHY, et alii, 1986). Lipoproteínas anômalas ou modificadas no interstício arterial passam a ser reconhecidas por receptores macrofágicos que, diferentemente dos receptores B-E, não são regulados pelo conteúdo intracelular de colesterol. Assim, a captação

dessas LP continua em função apenas de sua concentração no meio, acarretando acúmulo de colesterol intracelular nos macrófagos, originando as células espumosas das lesões ateroscleróticas iniciais (STEINBERG et alii, 1989).

3.4 METABOLISMO DAS HDL

As HDL podem originar-se do fígado, do intestino e das LP ricas em triacilgliceróis. Várias são as proteínas que determinam o curso metabólico das HDL. A LCAT é uma enzima secretada pelo fígado e encontra-se no compartimento vascular associada à fração de densidade igual à da HDL. Ela esterifica o colesterol livre da superfície da HDL com os ácidos graxos dos fosfolípidos, sendo a apo AI da HDL cofator dessa reação de transesterificação. Uma vez esterificado, o colesterol passa para o núcleo da partícula. A ação da LCAT é muito importante porque permite que a HDL possa progressivamente receber mais colesterol livre e fosfolípidos de outras LP ou mesmo de membranas celulares. Assim, a HDL vai aumentando de volume e diminuindo de densidade, o que caracteriza a transformação da subfração HDL₃ em HDL₂. Esse processo é reversível: à medida que a HDL₂ "descarrega" colesterol esterificado no fígado, etapa em que a lipase hepática está envolvida, e que transfere colesterol esterificado para os remanescentes das LP ricas em triacilgliceróis via proteína de transferência de éster de colesterol (CETP), a HDL₂ reconverte-se em HDL₃ (REICHL & MILLER, 1989). Por isso acredita-se que a HDL seja a mediadora do chamado "transporte reverso do colesterol", isto é, recebe colesterol livre de outras LP e de membranas celulares de tecidos extra-hepáticos, e transporta-o ao fígado direta ou indiretamente, via remanescentes de LP ricas em TAG. Uma vez no hepatócito, o colesterol pode ser excretado na bile, tanto na forma de colesterol livre como de ácidos biliares. Uma fração destes (cerca de 50%) é perdida nas fezes e representa a principal forma de excreção do colesterol do

organismo (REDGRAVE & SMALL, 1979; TALL, 1990). A captação hepática do éster de colesterol (mas não das proteínas) da HDL se dá por meio de receptores hepáticos que muito recentemente foram descritos como sendo da classe B dos receptores "scavenger" (SR BI). A expressão do SR BI foi detectada primeiramente no fígado e tecidos esteroideogênicos e sua função é a captação seletiva de colesterol por um mecanismo que difere da via clássica do receptor de LDL (ACTON et alii, 1996). Camundongos "knockout" para apoAI (que não expressam apoAI) apresentam diminuição no conteúdo de colesterol da HDL, depleção dos estoques de colesterol na adrenal e, conseqüentemente, síntese deficiente de corticoesteróides (PLUMP et alii, 1996).

3.5 CARACTERIZAÇÃO DA CETP

A composição das LP plasmáticas é continuamente modificada durante seu metabolismo intravascular em consequência de processos bastante dinâmicos de trocas e transferências de lipídeos entre as partículas. Embora ocorram movimentos espontâneos (HENRICKSEN et alii, 1981; LUND-KATZ et alii, 1982), esses processos são facilitados, amplificados e regulados por proteínas plasmáticas específicas, conhecidas como "proteínas de transferência de lipídeos" (CETP - cholesteryl ester transfer protein) (CHAJEK e FIELDING, 1978), que promovem trocas de éster de colesterol, triacilgliceróis e fosfolipídeos (PARTHASARATHY et alii, 1986).

O isolamento e caracterização parcial das proteínas de transferência de lipídeos em humanos e coelhos foram efetuados por vários grupos de pesquisadores (ZILVERSMIT et alii, 1975; PATTNAIK et alii, 1978; FIELDING & FIELDING, 1980; RAJARAM et alii, 1980; TALL et alii, 1983; HESLER et alii, 1987). Essas proteínas de transferência de lipídeos promovem a

movimentação dos lipídeos apolares (colesterol esterificado e triacilgliceróis) e facilitam a transferência de fosfolipídeos entre as lipoproteínas.

Existe variação considerável na atividade da CETP entre os vertebrados (HA et alii, 1982) : no rato, porco, cão, vaca e carneiro, ela é praticamente ausente enquanto que nos coelhos, trutas e gambás a atividade é alta. Nos humanos, porquinho da Índia, hamster, peru e lagarto a atividade da CETP é intermediária.

No plasma humano existem duas proteínas de transferência: a CETP (proteína de transferência de éster de colesterol) ou LTP I e a - PLTP (proteína de transferência de fosfolipídeos) ou LTP II.

A CETP é capaz de transferir, dependendo da composição da LP doadora e receptora envolvida, massa de éster de colesterol, triacilgliceróis e fosfolipídeos. Anticorpos monoclonais contra CETP humana inibem totalmente essa atividade em relação ao éster de colesterol e TAG e parte da atividade de transferência de fosfolipídeos (HESLER et alii, 1988; YEN et alii, 1989). Já foi estabelecido o sequenciamento genético da CETP humana (DRAYNA et alii, 1987), mostrando ser ela uma glicoproteína composta por 476 aminoácidos com peso molecular aproximado de 74000. A CETP é uma proteína mais hidrofóbica que as apolipoproteínas e enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, estando ligada a carboidratos e ácido siálico que são a ela incorporados intracelularmente, durante sua síntese.

A PLTP não é reconhecida por anticorpos contra CETP e é termolábil, diferentemente da CETP. A CETP e a PLTP representam uma classe diferente de proteínas de transferência de lipídeos, porém análogas, das proteínas carreadoras de lipídeos isoladas do citossol e microsossomos dos homogenatos celulares (ZILVERSMIT, 1984; WETTERAN & ZILVERSMIT, 1986). Estas últimas facilitam a transferência de fosfolipídeos, colesterol éster e triacilgliceróis

entre biomembranas, alterando a composição e fluidez das membranas celulares e a atividade das enzimas ligadas às membranas.

A distribuição da CETP no plasma, determinada por filtração em gel (NISHIDA et alii, 1993) mostrou que 74% da proteína está associada à HDL; 24% à LDL; 4% à VLDL e, apenas 1% da CETP está na forma livre.

Pouco se sabe a respeito do mecanismo molecular que envolve a transferência. LAGROST (1994) propôs um modelo de interação da CETP com as lipoproteínas por um processo em duas etapas: na primeira, uma ou mais moléculas de CETP carregadas positivamente interagiriam com as cargas negativas da superfície da lipoproteína como por exemplo, grupo fosfato dos fosfolípidos, grupo carboxílico dos ácidos graxos livres ou das moléculas de apolipoproteínas, induzindo alteração conformacional na CETP que exporia um sítio específico de ligação com um lipídeo apolar. Numa segunda etapa, uma molécula de lipídeo apolar poderia ser trocada por uma molécula de éster de colesterol ou triacilglicerol inseridos entre as cadeias acil de fosfolípidos. O processo cinético da transferência do lipídeo de um substrato lipoprotéico para outro, ainda é controverso. Existem duas teorias propostas: a) a CETP atuaria como um "shuttle" transportando éster de colesterol e triacilgliceróis entre lipoproteínas distintas (BARTER & JONES, 1980) e b) a CETP mediaría a formação de um complexo ternário de colisão envolvendo a lipoproteína doadora, a própria CETP e a lipoproteína receptora (IHN et alii, 1982). Estudos mais recentes indicam que ambos modelos podem coexistir (LAGROST & BARTER, 1992).

PATTNAIK et alii (1978) mostram que os grupos PO_4 dos fosfolípidos são sítios de interação da lipoproteína com a CETP e a estabilidade do complexo aumenta com a carga negativa da lipoproteína.

Tanto a ligação com as LP quanto a transferência dos lipídeos podem ser inibidas quimicamente ou por um fator inibidor da proteína de transferência de

lipídeos. SON & ZILVERSMITH (1984) purificaram do plasma humano uma proteína que inibe a capacidade de transferência de lipídeos apolares exercida pela CETP. Este inibidor é uma sialoglicoproteína com PM de 32000 Da e pI 3,9 - 4,3, que atua igualmente sobre a transferência de éster de colesterol e triacilgliceróis. A diminuição da porcentagem de transferência entre as lipoproteínas é independente da concentração de CETP mas parece ser dependente da concentração das lipoproteínas envolvidas (quanto maior a concentração das LP, maior é a redução na % de transferência), sugerindo a interação do inibidor com o substrato lipoprotéico. Em humanos, a proteína inibidora de transferência de éster de colesterol está associada negativamente com as HDL₂ de maior tamanho (MORTON & STEINBRUNNER, 1993).

Compostos químicos como bloqueadores de grupo tiol, agentes redutores e desnaturantes que atuam principalmente sobre a atividade de LCAT, têm efeitos distintos sobre a transferência de triacilgliceróis e éster de colesterol: ácido p-cloromercurifenilsulfônico, p-hidromercuribenzoato, etilenomercuritiosalicilato, inibem a transferência de TAG mas não têm ação sobre a transferência de CE (MORTON & ZILVERSMITH, 1982) mas, por outro lado, dodecilsulfato de sódio inibe irreversivelmente a atividade de transferência de CE (HESLER et alii, 1989).

3.6 CETP E METABOLISMO DE LÍPIDES

A massa de éster de colesterol transferida da HDL para as outras LP contendo apo B, reflete a atividade da CETP e correlaciona-se diretamente com sua concentração plasmática (TALL, 1986). A relação entre os níveis plasmáticos de colesterol e a atividade da CETP foi demonstrada em trabalho recente (TATO et alii, 1994) onde alto nível de LP contendo apo B está diretamente relacionado a elevação da CETP no plasma e, baixos níveis plasmáticos de CETP são

encontrados em algumas famílias de japoneses que possuem elevada concentração de colesterol na HDL (INAZU et alii, 1990)

As consequências metabólicas da alta ou baixa atividade de CETP em relação ao transporte reverso de colesterol são as seguintes: quando a atividade de CETP é baixa, menos CE é transferido para as LP contendo apo B e, conseqüentemente a HDL₂ torna-se mais rica em CE (BISGAIER et alii, 1991). No entanto, o aumento no conteúdo de CE coincide com a diminuição de TAG na HDL₂, representando menos substrato para a ação da lipase hepática e conseqüentemente, diminuição da captação hepática de CE da HDL₂ (CLAY et alii, 1991; EBERT et alii, 1993; BRINTON et alii, 1991). Além disso, foi demonstrado que na ausência de CETP a velocidade de remoção plasmática de éster de colesterol radioativo diminui consideravelmente (SHAMBUREK et alii, 1993) e pode ser atribuída ao retardamento do catabolismo da apolipoproteína da HDL. Inversamente, aumento de atividade de CETP, aumenta a transferência de CE da HDL para VLDL e LDL podendo levar a acúmulo de CE nessas partículas, sendo que a LDL não dispõe de mecanismo compensatório para sua remoção hepática. Isto acontece nos indivíduos hipertrigliceridêmicos que, quando comparados a indivíduos normais, têm pequena quantidade de VLDL transformada em LDL e uma grande parte dos remanescentes de VLDL são diretamente captadas pelo fígado (KESANIEMI et alii, 1982).

Os mecanismos determinantes dos níveis de CETP ainda são bastante desconhecidos. O nível de CETP pode estar alterado nas hiperlipidemias primárias (BROWN et alii, 1990; Mc PHERSON et alii, 1991) e secundárias. Existem estudos na literatura indicando que alterações na atividade de CETP encontradas em diversas doenças associadas ao metabolismo lipídico, estejam mais ligadas à composição e concentração das lipoproteínas plasmáticas do que a alterações na massa de CETP. Dessa forma, LOTTENBERG (1996) mostrou que a sobrecarga alimentar acelera o processo de transferência de colesterol

esterificado das lipoproteínas de alta densidade para as lipoproteínas de baixa densidade e muito baixa densidade, independentemente dos indivíduos serem ou não diabéticos tipo II. Nesse estudo, o processo de transferência de CE estava diretamente correlacionado à trigliceridemia. A atividade da CETP também está relacionada com a disponibilidade de LP ricas em TAG e apo B (TALL et alii, 1986; DULLAART et alii, 1989; DOBIASOVA et alii, 1992), que têm sua síntese aumentada no período pós-prandial.

Ingestão de dietas ricas em gordura e/ou colesterol, leva a aumento da velocidade de transferência de CE da HDL para VLDL e LDL, sugerindo que a atividade da CETP possa ser regulada pelo tipo de dieta ingerida (TALL et alii, 1986), por aumento nos níveis plasmáticos de LP ricas em triacilgliceróis e aumento da massa de CETP.

SON & ZILVERSMIT (1986) mostraram aumento da atividade de CETP no plasma de coelhos após a ingestão de dieta rica em colesterol e gordura por aumento da massa de CETP. Esses achados foram posteriormente elucidados por QUINET et alii (1990), que mostraram aumento significativo na quantidade de mRNA de CETP no fígado de coelhos alimentados com dieta aterogênica.

Estudos "in vitro" com células da linhagem enterocítica de humanos mostram que ácidos graxos podem regular a secreção de CETP (FAUST & ALBERS, 1988). Essa regulação é dependente do grau de insaturação dos ácidos graxos das cadeias carbônicas: ingestão de dietas com altas concentrações de ácidos graxos insaturados na forma *cis* promove redução importante na atividade da CETP quando comparadas a dietas enriquecidas com ácidos graxos saturados ou ácidos graxos na forma *trans* (GROENER et alii, 1991).

Consumo moderado de álcool que sabidamente aumenta o colesterol da HDL e diminui o risco de infarto agudo do miocárdio (GAZIANO et alii, 1993), produz redução significativa na atividade plasmática da CETP (HANNUKSELA et alii, 1992). O aparente efeito benéfico do consumo de álcool sobre os

parâmetros séricos lipídicos com redução dos níveis de CETP assemelha-se àquele encontrado nos indivíduos com deficiência genética de CETP, ou seja, LDL pequenas e polidispersas e HDL grandes e ricas em colesterol (HIRANO et alii, 1992).

Em 1993, SEIP et alii mostraram que numa população sadia sedentária, o exercício físico contínuo (por vários meses) reduz a concentração de CETP, diminui a atividade da lipase hepática e aumenta a atividade da lipoproteína lipase. Achados semelhantes foram encontrados em maratonistas (SERRAT-SERRAT et alii, 1993) onde a baixa atividade e massa de CETP estão associadas a baixas concentrações de VLDL e apoB e níveis elevados de HDL colesterol e apoAI. No entanto, a baixa atividade da CETP plasmática é transitória e seus níveis voltam a patamares normais aproximadamente uma semana após a parada dos exercícios físicos (RITSCH et alii, 1993).

As drogas utilizadas normalmente no tratamento das dislipidemias, como os fibratos (bezafibrate e genfibrozil), também têm ação sobre a atividade da CETP (MANN et alii, 1991; BHATNAGAR et alii, 1992). Em pacientes hipertrigliceridêmicos a diminuição dos níveis séricos de triacilgliceróis promovida pelos fibratos também reduz a transferência de CE da HDL para as frações plasmáticas de VLDL e LDL (MANN et alii, 1991; BHATNAGAR et alii, 1992). Esse efeito parece estar relacionado à capacidade do fibrato de normalizar os níveis plasmáticos de lipoproteínas receptoras ricas em TAG (EINSENBURG et alii, 1984), o que não ocorre em indivíduos normotrigliceridêmicos (MOULIN et alii, 1987).

Estudos que utilizam inibidores da hidroximetilglutaril - coenzima A - redutase (HMGCOA - redutase) como a lovastatina, sinvastatina e pravastatina, que reduzem os níveis de colesterol plasmático da VLDL e LDL por inibição de síntese, ainda são inconclusivos quanto à repercussão sobre a atividade da CETP (CHEUNG et alii, 1993).

O efeito hipolipemiante do probucol cuja ação promove a diminuição do colesterol da LDL por aumento do seu "clearance" plasmático ou por propriedades antioxidantes, também induz aumento da atividade de CETP em diversas doenças associadas a alterações do perfil lipoprotéico, como por exemplo, hiperalfalipoproteinemia, hiperlipidemia tipo II e hipercolesterolemia (FRANCESCHINI et alii, 1991).

A presença de mRNA para a CETP foi detectada em humanos em vários tecidos como baço, fígado, intestino delgado, glândulas adrenais e tecido adiposo (DRAYNA et alii, 1987; JIANG et alii, 1991). O estudo da regulação da expressão gênica de CETP foi feito em camundongos transgênicos (JIANG et alii, 1992) expressando atividade de CETP humana. Esses camundongos quando submetidos à dieta rica em colesterol apresentaram aumento de 4 a 10 vezes na velocidade de transcrição do gene da CETP (aumento de mRNA), produzindo aumento de 3 a 4 vezes na atividade e massa de CETP plasmática. Camundongos transgênicos produzidos a partir de genes de CETP humana (AGELLON et alii, 1991) ou de macacos (MAROTTI et alii, 1992) mostraram aumento de 2 a 6 vezes na atividade de CETP plasmática, quando comparados aos animais controles, caracterizando principalmente redução no tamanho e conteúdo de éster de colesterol da fração de HDL. Esta diminuição é maior ainda em camundongos que expressam também a apo AI humana (HAYEK et alii, 1992). Além disso, em camundongos expressando apo CIII e CETP humanas, essas proteínas atuaram de modo sinérgico reduzindo o tamanho e o conteúdo de colesterol éster da HDL e aumentam a taxa de catabolismo da apo AI (JIANG et alii, 1992).

3.7 CETP E ATEROSCLEROSE

Existem duas interpretações antagônicas sobre o processo de transferência de éster de colesterol (TALL et alii, 1987) em relação à aterogênese: de um lado,

a transferência de éster de colesterol da HDL para as LP que contém apo B (QM, VLDL e LDL) é vista como parte de uma cadeia de eventos do transporte reverso do colesterol, uma vez que estas últimas LP são removidas da circulação por receptores hepáticos específicos (HAVEL, 1986; BROWN & GOLDSTEIN, 1986); por outro lado, a CETP pode promover acúmulo de colesterol éster em LP remanescentes que potencialmente podem causar deposição de colesterol éster na parede arterial (PATSCHE et alii, 1983; ZILVERSMIT, 1979).

Existe variação considerável na atividade da CETP entre as diversas espécies (HA, et alii, 1981; HA & BARTER, 1982) coincidentemente associada positivamente à aterosclerose. Macacos, coelhos e humanos que possuem níveis elevados de atividade de CETP, são mais susceptíveis a desenvolver hipercolesterolemia após ingestão de dieta rica em gordura e, conseqüentemente, aterosclerose, do que animais que não possuem ou possuem muito baixa atividade de CETP como rato e camundongo. No entanto, porcos e cães, apesar de não terem CETP, desenvolvem ateromas quando submetidos à dieta rica em colesterol (BROWN et alii, 1990). MAROTTI et alii (1993) mostraram que os animais que não expressam CETP, quando submetidos à dieta rica em colesterol e gordura, desenvolvem mais aterosclerose. Na população japonesa a deficiência genética de CETP é razoavelmente frequente (5 %) e foi inicialmente relacionada à longevidade dessa população (BROWN et alii, 1989; INAZU et alii, 1990).

Por outro lado, a CETP tem papel importante no transporte reverso de colesterol (GLOMSET, 1968) ou seja, no movimento centrípeto deste esteróide dos tecidos periféricos para o fígado via HDL, embora os mecanismos que atuem nesse processo sejam ainda controversos. O colesterol livre é transportado dos tecidos periféricos para a HDL, sendo esterificado pela LCAT e, já nesta forma é transportado para o fígado diretamente ou é redistribuído entre as outras LP pela ação da CETP para depois ser levado ao fígado. Existem muitos mecanismos propostos pelos quais a CETP pode estimular o efluxo de colesterol dos tecidos

periféricos para a HDL: aumento da esterificação do colesterol mediada pela LCAT (CHAJEK et alii, 1980), aumento da formação de uma subfração específica de HDL (pré- β HDL) mediadora do efluxo de colesterol celular (KUNITAKE et alii, 1992) e, possivelmente por remoção direta do CE dos tecidos periféricos. As pré- β HDL (BARRANS et alii, 1996) são as precursoras das α -HDL (HDL₂ e HDL₃). A pré- β HDL é considerada a principal partícula receptora de colesterol livre celular. Dessa partícula o colesterol livre é transferido para as pré- β HDL maiores (β_2 e β_3). Na fração pré- β_3 o colesterol sofre esterificação pela LCAT, gerando a HDL₃. A ação contínua da LCAT contribui para a maturação da HDL₃ em HDL₂ que é mais rica em colesterol esterificado e vai interagir principalmente com a CETP que promove trocas entre o colesterol esterificado da HDL₂ por TAG das VLDL e LDL. Essa HDL₂ enriquecida em TAG sofre ação da lipase hepática, originando remanescentes de HDL₂ que serão captados pelo fígado ou originam as pré- β_1 HDL.

OLIVEIRA e colaboradores (1996) estudaram a relação entre expressão da CETP plasmática e a formação de éster de colesterol no plasma de camundongos transgênicos para CETP e em seres humanos com deficiência genética de CETP. Nos camundongos transgênicos obtiveram aumento de 20 - 40 % na taxa de esterificação de colesterol. Nos humanos, portadores de 2 mutações genéticas para CETP encontraram grande redução na taxa de esterificação, quando comparados a indivíduos normais, sem contudo encontrar diminuição na massa de LCAT. Portanto, alterações genéticas da CETP levam a mudanças secundárias na reação de esterificação mediada pela LCAT provavelmente devido à remodelação das HDL produzidas pela CETP.

ZHONG et alii (1996) detectaram aumento da incidência de doença coronariana, em japoneses portadores de mutação genética de CETP apesar de apresentarem níveis elevados de HDL, sugerindo que essa deficiência seja um

fator de risco independente para a doença coronariana e que a concentração de HDL e a dinâmica do transporte reverso de colesterol determinem a ação anti-aterogênica da HDL. HAYEK et alii (1995) trabalhando com camundongos transgênicos expressando apo CIII (hipertrigliceridêmicos) e CETP humana apresentaram não só menor número de lesões ateromatosas como também menor área afetada.

Em síntese, a CETP tem papel importante no transporte de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado pela HDL, transferindo éster de colesterol para lipoproteínas ricas em triacilgliceróis que são rapidamente captadas por esse órgão. Mas, por outro lado, a CETP pode representar um papel potencialmente aterogênico pelo fato de transferir moléculas de éster de colesterol de LP antiaterogênicas (HDL) para LP pró-aterogênicas contendo apo B. Esta última condição predomina em circunstâncias nas quais a captação de LP contendo apo B pelo fígado está limitada.

3.8 MODIFICAÇÕES DAS LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE E ATEROGÊNESE : ACETILAÇÃO E OXIDAÇÃO

Há aproximadamente 4 décadas sabe-se que a hipercolesterolemia é fator de risco importante no desenvolvimento das doenças cardiovasculares e que intervenções terapêuticas no sentido de normalizar a colesterolemia são de grande importância na prevenção e diminuição da taxa de mortalidade apresentadas por essa doença (CONSENSUS CONFERENCE, 1985; REPORT OF THE NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM, 1988).

GOLDSTEIN & BROWN (1977) e STEINBERG (1983), por meio de estudos clínicos e experimentais, estabeleceram que concentrações elevadas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) estão associadas com a aceleração do processo da aterogênese. O colesterol que se acumula na lesão aterosclerótica

origina-se primariamente das lipoproteínas plasmáticas, principalmente da LDL (NEUNHAN & ZILVERSMIT, 1962).

A lesão aterosclerótica é caracterizada pelo acúmulo de células sobrecarregadas com colesterol esterificado (células espumosas) subjacentes ao endotélio arterial. A maior parte dessas células é derivada de monócitos circulantes que se transformam em macrófagos residentes, embora algumas vezes sejam derivadas das células do músculo liso arterial que migram da camada média para a íntima e sofrem transformações (ROSENFELD et alii, 1987).

Duas linhas de evidências sugerem fortemente que a geração das células espumosas, que ocorrem "in vivo" decorrente do excesso de LDL na circulação, seja um processo independente de receptores de LDL normais encontrados em todos os tecidos: a) pacientes e animais com deficiência genética de receptores de LDL desenvolvem lesão aterosclerótica rica em células espumosas. Portanto, a captação arterial de LDL se dá por vias alternativas que BROWN & GOLDSTEIN (1983) denominaram de "scavenger pathways"; b) monócitos e macrófagos em cultura, quando incubados com grandes concentrações de LDL, não se transformam em células espumosas (BROWN & GOLDSTEIN, 1983) porque os macrófagos apresentam poucos receptores de LDL e têm sua síntese de colesterol e de seus receptores inibida devido à alta concentração de LDL no meio. Portanto as LDL circulantes sofreriam algum tipo de transformação e então a forma modificada de LDL seria removida pelos macrófagos por um receptor diferente do receptor da LDL, gerando as células espumosas.

GOLDSTEIN (1979) et alii foram os primeiros a mostrar que a LDL modificada quimicamente de modo artificial (como por exemplo a acetilação da LDL) é capaz de transformar macrófagos em células espumosas "in vitro". A captação celular foi descrita como um processo saturável e atribuída a um novo receptor designado de receptor de LDL acetilada ou "receptor scavenger", que não reconhece a LDL nativa. Esse mesmo receptor reconhece outras formas de

LDL quimicamente modificadas "in vitro" como a acetoacetil LDL (MAHLEY et alii, 1979; MC CLOSKEY et alii, 1987), metil LDL (FISCHMAN et alii, 1987), LDL conjugada a dialdeidomalônico (MDA) (FOGELMAN et alii, 1980; HIRAMATSU et alii, 1987) e LDL glicosilada (STEINBRECHER & WITZTUM, 1984).

HENRICKSEN et alii (1981) demonstraram que modificações biológicas da LDL (semelhantes àquelas artificialmente induzidas) ocorriam após incubação de LDL com cultura de células endoteliais.

O receptor "scavenger" foi encontrado em células endoteliais de aorta de bovino (STEIN & STEIN, 1980), células endoteliais sinusoidais (NAGELKERKE et alii, 1983), fibroblastos e células musculares lisas de coelhos (PITTAS, 1990) e em macrófagos de lesões ateroscleróticas de humanos (MATSUMOTO et alii, 1990). Sua estrutura foi identificada a partir de clones de DNA de células de fígado de boi, mostrando ser constituído de uma glicoproteína com peso molecular de 220.000 daltons, com 6 domínios funcionais (KODAMA et alii, 1988).

STEINBERG et alii (1989) mostraram que células do músculo liso arterial e os próprios macrófagos derivados de monócitos, podem induzir essas modificações na LDL. Dessa forma, esses tres tipos celulares da parede arterial podem converter LDL a uma forma reconhecível pelo receptor "scavenger" de macrófagos, gerando células espumosas. A etapa inicial das modificações na LDL causadas pelas células é a peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados de seus fosfolípidos (STEINBRECHER et alii, 1984). Este processo é inibido por agentes antioxidantes como EDTA e outros quelantes de metais. Antioxidantes, possivelmente compostos fenólicos presentes somente em óleo de oliva extra-virgem, podem agir como antioxidantes da LDL, resultando num aumento da resistência à oxidação in vitro (WISEMAN et alii, 1996).

As alterações oxidativas da LDL por íons metálicos são dependentes de sua concentração no meio. A oxidação por esses íons ou por luz ultravioleta produzindo níveis semelhantes de peroxidação lipídica, leva a respostas diferentes em relação a seu reconhecimento pelo receptor B/E pois, só no primeiro caso esse reconhecimento é perdido (DOUSSET et alii, 1990). Portanto, a oxidação da LDL "in vitro" pode ser produzida em diferentes níveis e por diferentes processos que podem acarretar diferentes respostas celulares "in vivo". Por exemplo, experimentos com LDL oxidada em um grau relativamente baixo ("LDL minimamente modificada") (BERLINER et alii, 1990) não impede seu reconhecimento pelo receptor B/E mas induz à adesão de monócitos nas células endoteliais, diferentemente da LDL nativa. VAN LETEN e colaboradores (1995) mostraram que a própria LDL minimamente modificada é capaz de induzir aumento de ferro livre nas células do endotélio, que por sua vez, aumenta a formação de hidroperóxidos.

Vários fatores podem contribuir para a oxidação da LDL "in vivo": compostos exógenos que promovem a formação de radicais livres como por exemplo, fumo, hiperoxia, toxinas e drogas; a quantidade de LDL infiltrada no espaço subendotelial (que depende da concentração plasmática de LDL); a quantidade de ácidos graxos poliinsaturados na LDL; o estímulo que aumenta o recrutamento de monócitos na íntima e sua conversão a macrófagos e o balanço entre compostos pró e antioxidantes no espaço subendotelial (SHIREMAN, 1996).

Apesar de o plasma ser rico em substâncias antioxidantes, acredita-se que existam formas oxidadas de lipoproteínas neste compartimento. Isto se deve ao isolamento de uma pequena subfração de LDL no plasma de seres humanos e primatas chamada de LDL⁺ com características comuns à LDL oxidada "in vitro" (AVOGARO et alii, 1988; HODIS et alii, 1994). Nos primatas essas características são aumento de carga negativa, da quantidade de óxidos de

colesterol e da toxicidade em cultura de células, em relação à LDL nativa. Nos primatas hipercolesterolêmicos e normolipidêmicos a subfração LDL⁻ representa aproximadamente 5 % da LDL total; no entanto, 50 % do colesterol da LDL⁻ está oxidado, o que não ocorre com o colesterol da LDL nativa. Também foi encontrado aumento de produtos de oxidação de lipídeos no plasma de pacientes com alto risco de infarto do miocárdio (STRINGER et alii, 1989 e LIU et alii, 1992). Por outro lado, anticorpos que reconhecem a LDL oxidada mas não a LDL nativa foram encontrados no plasma de indivíduos normais (SALONEN et alii, 1992), mas concentrações maiores foram detectadas no plasma de pacientes com aterosclerose avançada de carótida. Esses trabalhos que sugerem a existência de lipoproteínas oxidadas pré-formadas no plasma levam a supor que as formas oxidadas de LDL que se acumulam na lesão aterosclerótica possam ser resultantes de captação seletiva dessa LDL pela íntima arterial.

O processo de oxidação "in vivo" parece ocorrer preferencialmente em compartimento extravascular e em microambientes protegidos dos antioxidantes naturais presentes no plasma. A oxidação da LDL é um processo extremamente complexo que afeta essencialmente todos os componentes da partícula (STEINBERG, 1991): geração de lipoperóxidos pela peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados formando dienos conjugados; fragmentação dos ácidos graxos oxidados formando produtos com grande variação de peso molecular (aldeídos, álcoois, cetonas e alcanos); conversão de quantidade significativa de lecitina em lisolecitina; fragmentação da cadeia polipeptídica da apo B; oxidação do colesterol a várias formas de oxiesteróis; conjugação dos produtos de degradação lipídica com a cadeia polipeptídica da apo B, ocultando os epsilon amino grupos dos resíduos de lisina; perda dos sítios normalmente reconhecidos pelo receptor de LDL nativa e geração de nova configuração reconhecida pelo receptor "scavenger". Essas alterações oxidativas podem ser inibidas se ao meio de incubação for adicionado plasma ou HDL (PARTHASARATHY et alii,

1990). Uma vez formada, a LDL oxidada contribui não só para o desenvolvimento precoce da aterosclerose e trombose como também atua na supressão da secreção de endotelina-1 (peptídeo ativo na regulação do tonus vascular) (JOUGAKASI et alii, 1992), na secreção de citocinas produzidas por monócitos que induzem a síntese de moléculas de adesão (FROSTEGARD et alii, 1993), na inibição da atividade da óxido nítrico sintetase dos macrófagos (JORENS et alii, 1992), na indução da apoptose dos macrófagos (REID et alii, 1993), na inativação de proteases lisossomais (HOPPE et alii, 1994) e estimulação da atividade plaquetária (CHISOLM & PENN, 1996).

Evidências experimentais indicam que a lesão endotelial é um fator importante na aterogênese, no entanto, já foi confirmado que a lesão do tipo estria gordurosa (lesão inicial característica da aterosclerose) pode desenvolver-se sob uma camada endotelial morfológicamente intacta (DAVIES et alii, 1976).

A LDL oxidada por ser altamente citotóxica (HESSLER et alii, 1979) pode induzir alterações funcionais que favorecem a penetração dos monócitos ou facilitam o movimento de mais LDL para o espaço subendotelial, acelerando a formação de estrias gordurosas. Além disso, a citotoxicidade da LDL oxidada é suficiente para promover a perda de células endoteliais da superfície de estrias gordurosas já estabelecidas (STEINBERG et alii, 1989).

Com base nesses achados sobre as propriedades das LDL oxidadas, STEINBERG et alii (1989) propuseram um modelo de desenvolvimento da lesão aterogênica baseado somente na presença de níveis elevados de LDL e modificações oxidativas dessa lipoproteína dentro da parede arterial: altos níveis de LDL no plasma promoveriam alta concentração de LDL na íntima arterial, portanto maior número de partículas disponíveis no interstício arterial para sofrer oxidação, levando a um aumento na concentração de LDL oxidada. Essa LDL oxidada contribui para o recrutamento dos monócitos circulantes que, na parede arterial, sofreriam modificações transformando-se em macrófagos e, por ações

quimiotáticas das lipoproteínas oxidadas, seriam impedidos de retornar ao plasma. Uma vez que os próprios macrófagos podem modificar oxidativamente as LDL, a velocidade com que as LDL oxidadas seriam produzidas aumentaria geometricamente com o número de macrófagos no espaço subendotelial. Os macrófagos residentes por meio do receptor "scavenger" captariam rapidamente as LDL oxidadas. Como esses receptores, diferentemente dos receptores de LDL nativa, não são regulados pela entrada de colesterol na célula (GOLDSTEIN et alii, 1979), o macrófago continuaria captando LDL oxidada que, por sua vez, poderia inibir a esterificação do colesterol. O aumento do colesterol não esterificado desestabilizaria o metabolismo celular (JIALAL & CHAIT, 1989) e tornaria o endotélio mais permeável à passagem de LDL. Essa cadeia de eventos não pressupõe a perda de células endoteliais como fator iniciador da aterogênese e sim como agente importante na progressão da lesão tipo estria gordurosa para placa fibrosa e lesão mais complexa. A citotoxicidade da LDL oxidada causa a perda de células endoteliais que recobrem as estrias gordurosas e, a partir daí, desencadeia-se agregação plaquetária, liberação de fatores de crescimento plaquetários, estimulação de outros fatores de crescimento e proliferação de células musculares, levando ao espessamento do ateroma (STEINBERG et alii, 1989).

Vários autores mostram que a HDL é capaz de inibir a oxidação da LDL (HESSLER et alii, 1979; VAN HINSBERGH et alii, 1986 ; PARTHASARATHY et alii, 1990) por conter enzimas que podem inibir ou destruir a atividade biológica dos lipídeos oxidados que desencadeiam a resposta inflamatória. Recentemente, QUINTÃO (1995) propôs que o efeito protetor de altas concentrações plasmáticas de HDL estaria mais relacionado a ação específica da HDL na parede arterial do que efetivamente ligado ao transporte reverso de colesterol: a HDL inibiria a oxidação da LDL por células endoteliais, ligando-se a hidroperóxidos que poderiam causar modificações na LDL,

interagiria com fatores pró-coagulantes e com LP modificadas, inibiria a migração e a adesão de monócitos no espaço subendotelial induzido pela LDL modificada e reverteria o efeito inibitório da LDL oxidada na produção do fator de relaxamento endotelial.

Atualmente, acredita-se que a relação inversa entre HDL e aterosclerose pode ser explicada tanto por seu papel no transporte reverso de colesterol como por suas várias propriedades antioxidantes.

A transferência de lipídeos entre as lipoproteínas é um importante processo que ocorre no plasma, influenciando sua composição e metabolização. A CETP é uma das proteínas que atuam no processo de transferência principalmente de éster de colesterol e triacilgliceróis. Seu papel frente à aterogênese ainda é controverso pois, transfere colesterol éster de lipoproteínas de alta densidade (antiaterogênicas) para lipoproteínas de baixa densidade (aterogênicas) aumentando os níveis de colesterol nessas partículas. Por outro lado, essa transferência faz parte do processo de transporte reverso de colesterol por via indireta, que evita o acúmulo de colesterol nos tecidos periféricos, inclusive na parede arterial.

No presente trabalho utilizamos duas formas de modificação química da LDL - acetilação e oxidação - e estudamos seu efeito sobre uma das etapas do transporte reverso de colesterol: a reação mediada pela CETP.

Por intermédio do modelo experimental da LDL modificada quimicamente, por acetilação, ficou demonstrado que sua captação celular é feita por receptores diferentes dos receptores B/E, levando ao acúmulo de colesterol na forma esterificada, em células mantidas em cultura. Apesar dessa alteração não ocorrer "in vivo" ela foi importante na caracterização do receptor "scavenger" e desencadeou uma série de estudos sobre outras modificações de lipoproteínas que ocorrem "in vivo", como por exemplo a oxidação da LDL, modificação

responsável por graves consequências fisiológicas como o desenvolvimento da lesão aterosclerótica na parede arterial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Os compostos radioativos colesterol-4-¹⁴C, [colesteril-4-¹⁴C]-colesteril-oleato e [1-alfa, 2-alfa, (N) - ³H]-colesteril-oleil-éter foram adquiridos da New England Nuclear (Boston, MA, EUA). A pureza dos isótopos foi testada por cromatografia em camada delgada (TLC) e mais de 95 % do colesterol radioativo migrou com seus respectivos padrões.

Os sais para o preparo da solução cintiladora 2,5 difeniloxazol (PPO) e (1,4-bis[2-(5-feniloxazol)]benzeno) (POPOP) foram adquiridos respectivamente da E.Merck, (Darmstadt, Alemanha) e da Sigma Chemical Company (St.Louis, MO, EUA).

Os solventes e demais reagentes utilizados nos experimentos foram comprados da Merck S/A (Rio de Janeiro).

Os "kits" enzimáticos para quantificação de colesterol total CHOD-PAP foram comprados da Merck S/A (Rio de Janeiro), os de triacilgliceróis TG-Enz-Color da Biodiagnóstica (Pinhais, PR) e os de colesterol livre da Boheringer Mannheim Biochemica (Mannheim, Alemanha).

Os filtros estéreis de 0,45μ foram fornecidos pela Millipore Corporation (Belford, MA, EUA). As membranas utilizadas para a diálise das lipoproteínas apresentavam limite de exclusão para PM entre 12000 - 14000 e foram adquiridas da Spectrum Medical Industries Inc. (Houston, Texas, EUA).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Coleta de sangue

A coleta de sangue foi feita por punção venosa de doadores normolipidêmicos em tubos contendo EDTA 0,1% (10 μ l / ml de sangue). Após a separação do plasma por centrifugação em centrífuga refrigerada marca Sorval (modelo RT 6000 B, Du Pont Company, Newtown, CT, EUA) a 4° C por 30 minutos a 3000 rpm, foi feito um "pool" dos plasmas onde foram adicionados os seguintes conservantes: benzamidina 2mM (5 μ l / ml plasma), gentamicina 0,25% + cloranfenicol 0,5% (20 μ l / ml plasma), fenilmetil sulfonil fluoreto 0,5mM (0,5 μ l / ml plasma) e aprotinina (5 μ l / ml plasma).

4.2.2 Isolamento da LDL

A LDL foi obtida por ultracentrifugação sequencial (HAVEL et alii,1955) de "pool" de plasma, em ultracentrífuga Beckman modelo L8. Após 12 horas de ultracentrifugação em rotor 50 Ti, com velocidade de 100.000 x g a 4° C, foram descartados os quilomícrons e VLDL. Ao infranadante dessa ultracentrifugação foi adicionado KBr sólido para ajuste de densidade ($d= 1,063$ g / ml) e, após 20 horas de ultracentrifugação nas mesmas condições anteriores, foi isolada a LDL. Em seguida, a LDL foi submetida à diálise por 48 horas em solução tampão fosfato - PBS - (NaCl 0,9%, Na_2HPO_4 0,3%, NaH_2PO_4 0,2%, NaOH 0,038% e EDTA 0,01%), pH=7,4, com 4 trocas de 500 ml deste tampão.

4.2.3 Marcação isotópica das HDL

Inicialmente, para testar qual método deveria ser empregado para haver maior eficiência de marcação das HDL, isolou-se, por ultracentrifugação sequencial, de um "pool" de soro de indivíduos normais, as HDL, e marcou-se uma fração com colesterol - C^{14} (DOBIASOVA et alii, 1992) pela transferência do isótopo de discos de papel de filtro (Whatman-1) para as LP, em tampão Tris (Tris 10 mmol/L; NaCl 150 mmol/L; EDTA 0,01 %; NaN_3 0,03%) a 4° C por 24 horas. Após esse período, os discos de papel foram removidos, seguindo-se a incubação por 24 horas a 37° C sob agitação, para ocorrer a esterificação do colesterol.

A outra fração das HDL foi marcada por incubação com 25 μ Ci de colesteril - oleato - ^{14}C (CO- ^{14}C) e com plasma de densidade >1.21 g/mL (relação 1:4) por 24 horas a 37 °C em agitador rotatório (20 rpm). A incorporação do colesteril oleato - ^{14}C na HDL é processada pela proteína de transferência de colesteril éster, presente no plasma de $d > 1,21$ g/mL (GAVISH et alii, 1987). Após esse período, a densidade foi acertada para 1,125 g / mL com KBr sólido e o material foi ultracentrifugado por 40 horas a $100.000 \times g$ (4°C) para o reisolamento da HDL₂ marcada com colesteril-oleato- ^{14}C . O infranadante dessa ultracentrifugação teve sua densidade corrigida para 1,21 g / mL e novamente ultracentrifugado nas mesmas condições anteriores para obtenção da HDL₃ marcada com colesteril-oleato- ^{14}C . As HDL₂ e HDL₃ assim obtidas foram submetidas a 4 trocas de banhos de diálise em PBS contendo EDTA (pH 7,4), por 24 horas, para retornarem à densidade original do plasma (1,006 g / mL). As HDLs foram filtradas em filtro Millipore de 0,45 μ de diâmetro para esterilização e mantidas em geladeira até sua utilização nos ensaios.

A partir de novo "pool" de plasma, utilizando o processo de ultracentrifugação por 40 horas a 4 °C com densidade corrigida para 1.21 g / mL com KBr sólido, obteve-se o plasma deslipidado que, após diálise em PBS, foi utilizado como fonte de CETP. A este plasma deslipidado foi adicionado no momento do ensaio 5,5µl por mL de plasma de 5,5-ditio-bis-[2-nitrobenzóico] (DTNB) na concentração de 100 mg / mL, para inibir a ação da LCAT.

As HDL marcadas por esses dois métodos (com colesterol - ^{14}C ou colesteril-oleato- ^{14}C) foram incubadas com plasma total por 2 horas a 37 °C e 4 °C para verificar se os métodos de marcação, assim como a eficiência de marcação, influenciariam o processo de transferência (experimento piloto).

4.2.4 Marcação isotópica das LDL

Para os ensaios de troca, que avaliam a % de transferência de colesterol da LDL para as HDL, 2 mg de proteína de LDL obtida por ultracentrifugação, foram incubadas com 50µCi de colesteril-oleil-éter- ^3H (COt- ^3H), previamente dissolvidos em 100 µl de etanol, com 3 mL de plasma deslipidado por 24 horas a 37 °C em agitador rotatório a 20 rpm (TERPSTRA et alii, 1989). Após esse período, foi acertada a densidade para 1,063 g / mL e procedeu-se à ultracentrifugação a 40.000 rpm, por 20 horas a 4 °C para a obtenção da LDL marcada com COt - ^3H .

4.2.5 Acetilação das LDL

A lipoproteína de baixa densidade (16 mg de proteína) foi adicionada a 1 mL de NaCl 0,15M e 1mL de solução saturada de acetato de sódio em agitação constante, em banho de gelo. Em seguida foram adicionadas pequenas e múltiplas quantidades de anidrido acético num volume total de 1,5 vezes a massa de

proteína da LDL (BASU et alii, 1976). A eficiência da acetilação foi medida por eletroforese em gel de agarose a 1%, desenvolvida em tampão barbital pH=8,6 por 30 minutos, utilizando-se Fat Red 7B como corante (NERENBERG, 1975).

4.2.6 Oxidação das LDL

A LDL dialisada foi dividida em 2 alíquotas: parte dela foi apenas dialisada em PBS contendo EDTA (LDL normal), filtrada em filtro de 0,45 μ de diâmetro e mantida em geladeira. A outra alíquota foi dialisada em PBS sem EDTA e submetida à reação de oxidação (HEINECKE et alii, 1984). Essa reação foi feita a partir da diluição da LDL com PBS sem EDTA (relação 1:4) e incubação de 100 μ g de proteína de LDL com uma solução de sulfato de cobre de concentração 1mM (10 μ l CuSO₄ / mL de solução), por 8 horas em banho - maria a 37° C com agitação, em frasco aberto para facilitar as trocas com o oxigênio atmosférico. A reação de oxidação foi encerrada com a adição de EDTA 1mM (20 μ l EDTA / mL de solução) ao meio (LDL oxidada). Após a oxidação, a LDL foi novamente dialisada em PBS contendo EDTA para eliminação de resíduos de cobre.

O grau de oxidação da LDL foi determinado pela produção de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (PUHL et alii, 1986) utilizando-se como padrão, o composto 1,1,3,3 tetrametoxipropano a 0,5 mM.

4.2.7 Determinação da composição química percentual das lipoproteínas

Para todas as frações lipoprotéicas obtidas em todos os ensaios, assim como para todos os plasmas deslipidados obtidos, foram quantificadas as concentrações de fosfolípidos (BARTLETT, 1959), colesterol total e

esterificado (método enzimático-colorimétrico), triacilgliceróis (método enzimático-colorimétrico) e proteínas (LOWRY et alii, 1951), para a caracterização da composição química das partículas.

4.2.8 Ensaio de transferência de colesterol - oleato - ^{14}C : medida da atividade da CETP.

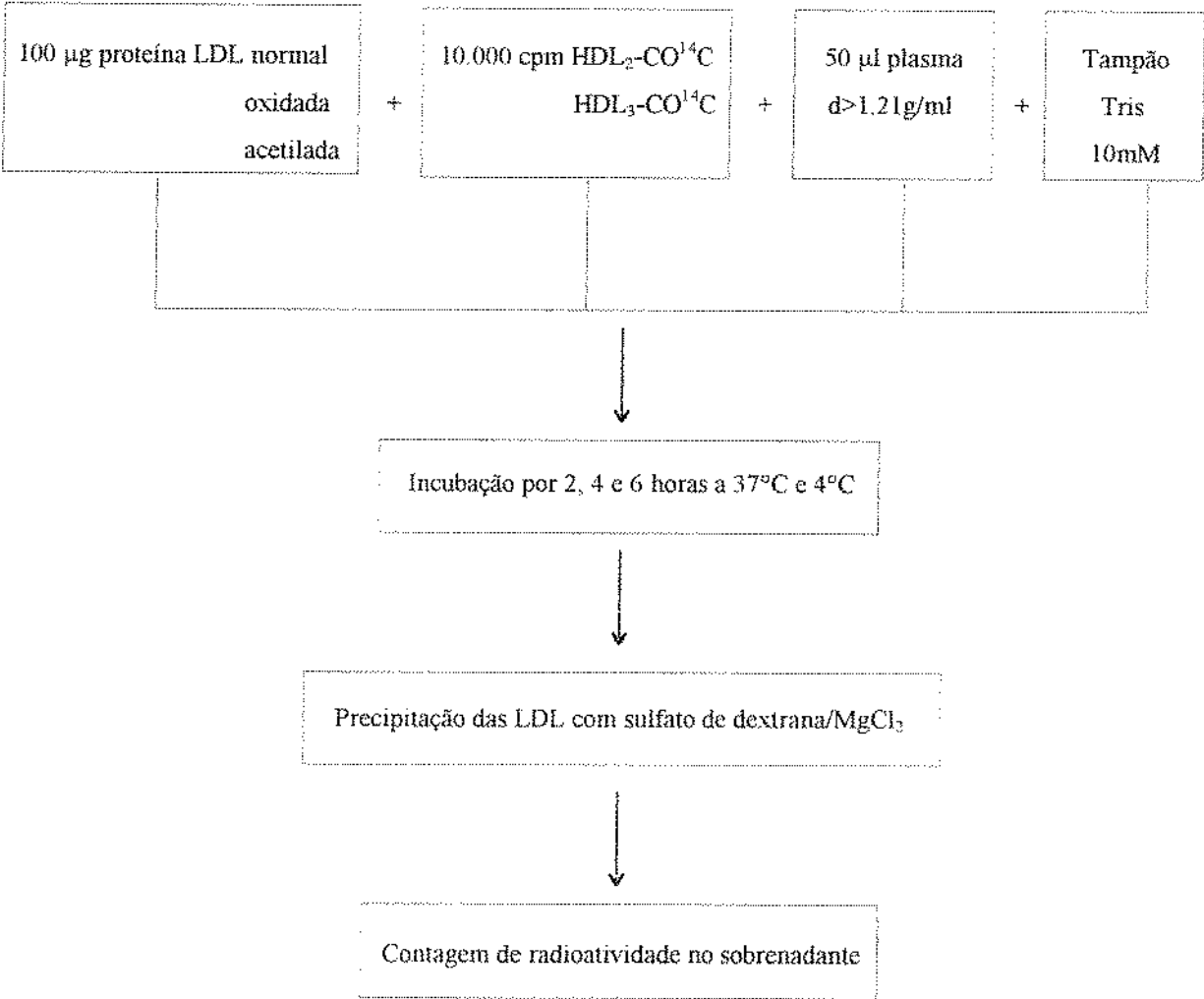
Os ensaios de transferência de colesterol-oleato- ^{14}C de HDL₂ e HDL₃ para as lipoproteínas de baixa densidade acetilada foram executados da seguinte maneira: subpopulações de HDL marcadas isotopicamente foram incubadas com 100 μg de proteínas de LDL normal e previamente acetilada, na presença de 50 μL de plasma deslipidado ($d > 1,21$, fonte de CETP) sendo o volume final de incubação ajustado para 250 μL com tampão Tris (pH 7,4). A medida da atividade da CETP foi feita a partir das incubações dessas lipoproteínas simultaneamente a 37 °C e 4 °C (branco da reação), por 2, 4 e 6 horas de incubação, em um único experimento efetuado em decuplicata.

Nos experimentos que avaliam a transferência de colesterol-oleato- ^{14}C de HDL₂ e HDL₃ para as LDL modificadas por oxidação, as incubações foram feitas nas mesmas condições do experimento anterior, porém as LDL foram previamente marcadas com colesterol-oleil-éter- ^3H e, após sua oxidação, foram incubadas com as subpopulações de HDLs, na presença de plasma deslipidado. Dessa maneira foi possível verificar o fluxo de CO nas duas direções: de HDL para LDL e de LDL para HDL. Foram feitos 5 diferentes experimentos em quadruplicata de cada tipo de incubação.

Para todos os tipos de ensaios (com LDL normal, acetilada ou oxidada), após os períodos pré-estabelecidos de incubação, as lipoproteínas foram isoladas por precipitação com sulfato de dextrana / MgCl_2 (50 μL / 500 μL de amostra)

(BAHORIK & ALBERS, 1986), obtendo-se no precipitado, a lipoproteína que contém apoB e, no sobrenadante, a HDL₂ ou HDL₃. Uma alíquota de 100µL do sobrenadante foi transferida para frascos de contagem contendo 6 mL de solução cintiladora (PPO/POPOP/Triton) para medir a radioatividade remanescente de CO-¹⁴C na HDL e a transferida da LDL marcada com COt - ³H. A quantificação da radioatividade foi feita em contador Beckman modelo LS 8000 (Figura1).

Figura 1 - Ensaios de transferência de colesteril-oleato-¹⁴C HDL para LDL.



4.2.9 Medida do diâmetro das LDL

As lipoproteínas de baixa densidade normal, acetilada e oxidada, foram analisadas quanto ao seu diâmetro por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), utilizando-se a técnica de criofratura. Essas análises foram executadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP.

A etapa mais importante para a análise da amostra constituída de lipoproteínas, por criofratura, é o rápido congelamento feito na fase aquosa do nitrogênio líquido (-156°C), solidificado (-210°C). Após esta etapa, as amostras foram transferidas do nitrogênio líquido para a mesa (-156°C) do aparelho de Criofratura Balzers, modelo BAF 301. As espécies foram fraturadas à -110°C por uma faca (-156°C), em alto vácuo (2×10^{-6}). Em seguida foi depositada, sobre as superfícies expostas, uma camada de platina-carbono (95% - 5%) da ordem de 2nm de espessura, num ângulo de 45° em relação à superfície. Após esta etapa foi depositada uma camada de carbono (100%) da ordem de 20nm de espessura, num ângulo de 90° em relação à superfície. A adição desses elementos levou à formação de uma fina película sobre os materiais que representam réplicas das estruturas fraturadas. As amostras foram então retiradas da máquina de criofratura e os suportes contendo as amostras e réplicas foram imersos lentamente em água destilada que possibilita o desprendimento das amostras e réplicas do suporte e a flutuação das réplicas. Estas foram recolhidas em pequenas telas-suporte, próprias para utilização de microscopia eletrônica de transmissão. As réplicas obtidas foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol 1010. Foram feitas 8 eletromicrografias de cada tipo de lipoproteína com aumento final de 200.000 x (LDL normal e oxidada) e 250.000 x (LDL acetilada) e medidos os diâmetros de 100 lipoproteínas de cada tipo.

A medida de diâmetro das partículas foi feita como indicado na Figura 2. A distância “d” correspondente ao diâmetro foi medida nas eletromicrografias, nos aumentos finais respectivos, com auxílio de um paquímetro. Por exemplo, para um aumento final de 250.000 vezes $\rightarrow 1\text{nm} = 0,25\text{ mm}$ portanto, para uma partícula cuja medida foi 5,7 mm, seu diâmetro será 22,8 nm ou 228 Å.

4.3 CÁLCULOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.3.1 Transferência de Colesteril Oleato - ^{14}C de HDL para LDL

$$\% \text{ CO transferido} = 1 - \frac{\text{cpm HDL } 37^\circ \text{ C}^a}{\text{cpm HDL } 4^\circ \text{ C}^b} \times 100$$

aonde:

^a Radioatividade restante no sobrenadante (HDL) após a transferência para LDL (37°C)

^b Radioatividade no sobrenadante em condições de inibição da transferência (4°C) ou seja, radioatividade inicial total.

4.3.2 Transferência de Colesteril - oleil - éter - ^3H (COt) de LDL para HDL

$$\% \text{ COt transferido} = \frac{(\text{cpm HDL } 37^\circ \text{ C} - \text{cpm HDL } 4^\circ \text{ C})}{\text{cpm LDL inicial}} \times 100$$

4.3.3 Análise Estatística

Para cada variável resposta (% de transferência de colesterol-oleato de HDL para LDL e vice-versa) foi construído um modelo de análise de variância (ANOVA) (MILLIKEN, 1984 ; MONTGOMERY, 1991) onde se explica a mudança de cada uma das variáveis resposta em função de um ou mais fatores (tipos de LDL; subpopulação de HDL e tempo de incubação). A análise de variância para um dado fator identifica se existe ou não diferença significativa entre os níveis de cada fator (LDL normal x LDL oxidada; HDL₂ x HDL₃; tempo 2 horas x 4 horas x 6 horas). Para o fator tempo, foi utilizado o método de Duncan por este fator apresentar mais de dois níveis.

A análise estatística foi realizada com o Programa SAS, versão 6.08 para computador IBM.

Para a análise de medida do diâmetro da LDL normal, acetilada e oxidada, foi utilizado o teste “t” de Student para amostras não pareadas, utilizando-se o Programa Instat, versão 2. Foi estabelecido o nível de significância em 5 % para ambos os testes.

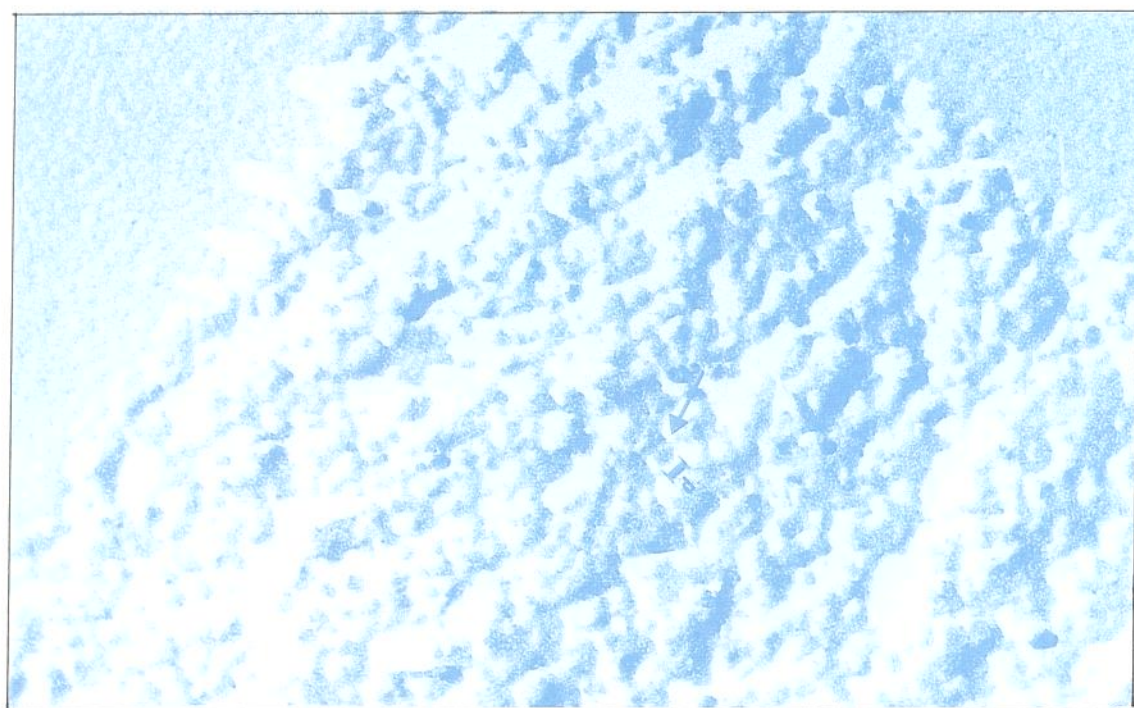


FIGURA 2 - Eletromicrografia da LDL normal. Aumento - 250.000 vezes. A distância "d" = 5,7 nm (228 Å).

5 RESULTADOS

Ao se utilizar a marcação das HDL diretamente com colesteril-oleato- ^{14}C ou com colesterol - ^{14}C , sendo o último esterificado "in vitro", verificou-se que ambos procedimentos apresentaram eficiência de marcação muito próxima, na faixa de 30%. Uma vez que a eficiência de marcação das HDL pelos dois métodos era similar e que não houve diferenças no ensaio piloto de transferência de éster de colesterol (Tabela 1), optou-se pelo método de marcação isotópica das lipoproteínas com colesteril-oleato- ^{14}C , que apresenta maior rapidez de execução.

A marcação das LDL foi processada de forma similar à das HDL, mas foi realizada com colesteril-oleil-éter- ^3H e apresentou eficiência de marcação da ordem de 13,5%.

A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que mede o grau de oxidação dos compostos, foi quantificada nas lipoproteínas de baixa densidade. Verificou-se oxidação somente nas lipoproteínas que foram expostas ao sulfato de cobre: $22,9 \pm 7,7$ nMol de dialdeidomalônico / 100mg proteína de LDL, não ocorrendo oxidação espontânea ou decorrente da acetilação na LDL normal e acetilada, respectivamente.

A Tabela 2 mostra a composição química das lipoproteínas obtidas de um único "pool" plasmático que foi utilizado para o ensaio de atividade da CETP com LDL acetilada.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados da análise da composição química das frações de lipoproteínas obtidas por ultracentrifugação sequencial de quatro diferentes "pools" plasmáticos utilizados nos ensaios de atividade de CETP com LDL oxidada. As análises da composição das LDL, após sua oxidação, foram feitas somente em duas amostras de LDL devido ao pequeno

volume disponível das lipoproteínas. Observou-se que os teores de colesterol total, colesterol esterificado, triacilgliceróis, proteínas e fosfolípidos não sofreram alterações quantitativas após o processo de oxidação.

A Figura 3 mostra a eletroforese em gel de agarose das LDL normal, acetilada e oxidada. Pode-se notar que a LDL normal migra na região das β - globulinas, enquanto que a LDL acetilada, por apresentar excesso de cargas negativas, migra para a região das α_1 -globulinas. Já a LDL oxidada possui alteração menor de cargas que a LDL acetilada, e migra em posição intermediária.

5.1 Transferência de Colesteril-oleato- ^{14}C (CO - ^{14}C) de HDL para LDL normal e acetilada

A Figura 4 mostra a cinética da transferência, mediada pela CETP, em porcentagem de éster de colesterol da HDL₂ (Fig.4A) e da HDL₃ (Fig.4B) para LDL normal e acetilada. Pode-se notar que a transferência de colesteril - oleato - ^{14}C tende a ser menor quando a lipoproteína receptora é a LDL na forma acetilada. Esse comportamento é semelhante para ambas as partículas doadoras de CO (HDL₂ e HDL₃). Houve diminuição média na porcentagem de transferência de CO de 1,6 vezes com a HDL₂ e de 2,2 vezes com a HDL₃ na transferência de CO para a LDL acetilada (nas 6 horas de incubação), em relação à LDL normal, não sendo encontrada diferença estatisticamente significativa quando cada fração de HDL foi considerada isoladamente. Porém, quando o conjunto de HDL₂ e HDL₃ é analisado (Figura 5), observa-se que existe diminuição significativa ($p=0,0001$) de 1,8 vezes na transferência de colesteril-oleato para a LDL acetilada em relação à LDL normal. Por outro lado, a transferência de CO foi significativamente maior ($p=0,0001$) quando a partícula

doadora foi a HDL₂ (2,1 vezes maior) quando comparada à HDL₃, para ambas partículas receptoras (LDL normal e acetilada) (Figura 6).

A análise de variância mostrou diferença significativa (Figura 7) na transferência de CO das HDL para a LDL normal em comparação com a LDL acetilada, ao longo do tempo. O teste de Duncan indica que a transferência em 2 horas é significativamente menor do que a transferência nos tempos 4 e 6 horas. Por outro lado, quando se analisa o processo de transferência de CO de HDL quando a partícula receptora é a LDL acetilada, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nesse processo, ao longo do tempo. Provavelmente, deve ter ocorrido saturação no processo de transferência, já no tempo de incubação de 2 horas, causado pela acetilação da lipoproteína de baixa densidade.

Na Figura 8 estão apresentados os valores médios da porcentagem de transferência de CO de HDL₂ e HDL₃ separadamente para ambas as LDL, isto é, normais e acetiladas em conjunto. Pelo teste de Duncan pôde-se verificar que a transferência de CO da HDL₃ para as LDLs no tempo 2 horas foi significativamente menor do que nos tempos 4 e 6 horas de incubação. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa no processo de transferência ao longo do tempo quando a partícula doadora de éster de colesterol foi a HDL₂.

5.2 Transferência de colesteril-oleato-¹⁴C (CO - ¹⁴C) de HDL para LDL normais e oxidadas.

Na Figura 9 está apresentada a cinética da transferência de éster de colesterol de HDL₂ (9A) e HDL₃ (9B) para LDL normal e oxidada. Observa-se tendência à diminuição da porcentagem de transferência de CO - ¹⁴C para a LDL na forma oxidada quando a incubação foi realizada tanto com HDL₂ quanto com HDL₃. Essa tendência, no entanto, permaneceu constante ao longo do tempo para

as duas subpopulações de HDL. Por este motivo, quando as 3 variáveis (tipo de LDL, subpopulação de HDL e tempo de incubação das lipoproteínas) foram analisadas isoladamente, não foi detectada diferença estatisticamente significativa na porcentagem de colesterol-oleato transferido entre as lipoproteínas.

Por outro lado, quando se comparou a porcentagem de transferência de colesteril-oleato- ^{14}C do conjunto de subpopulações de HDL para LDL oxidada com a transferência para a LDL normal (Figura 10), encontrou-se diminuição significativa de 1,5 vezes.

Comparando-se o comportamento das duas subpopulações de HDL como partículas doadoras de colesteril-oleato- ^{14}C para as partículas receptoras (LDL normal e oxidada em conjunto) (Figura 11), detectou-se que a HDL₂ transfere significativamente ($p = 0,0084$) mais éster de colesterol do que a HDL₃. Esse aumento encontrado foi de cerca de 2 vezes.

A Figura 12 mostra a variação média da porcentagem de transferência de CO - ^{14}C entre lipoproteínas doadoras (HDL₂ + HDL₃) e receptoras (LDL normal + LDL oxidada), ao longo do tempo. Houve aumento estatisticamente significativo ($p=0,0017$) dessa transferência entre os tempos 4 e 6 horas em relação ao tempo inicial de 2 horas de incubação.

5.3 Transferência de colesteril-oleil-éter- ^3H (Cot- ^3H) das LDL normais e oxidadas para HDL.

Os valores percentuais de transferência de colesteril-oleil-éter- ^3H da LDL normal e oxidada, mediada pela CETP, para HDL₂ e HDL₃ ao longo do tempo estão apresentados na Figura 13 (respectivamente Figuras 13A e 13B para as HDL₂ e HDL₃). Pode-se verificar que houve tendência de maior transferência de Cot - ^3H da LDL oxidada para ambas HDL, quando comparada à LDL normal.

A análise de variância demonstrou existir diferença significativa ($p=0,0005$) na porcentagem de transferência de COt - ^3H da LDL oxidada para as HDL (HDL₂ e HDL₃), quando comparada à LDL nativa (Figura 14). Houve aumento de 2,3 vezes na transferência de COt - ^3H da LDL oxidada quando comparada à LDL normal para as HDL. Embora as porcentagens de transferência sejam pequenas, elas correspondem a uma massa considerável de éster de colesterol, pois a quantidade deste na LDL era muito maior que a presente nas HDL nas incubações (respectivamente 123 μg de colesterol esterificado de LDL e 12,4 - 20,1 μg de colesterol esterificado de HDL).

A Figura 15 mostra que, quando comparada à HDL₂, a HDL₃ recebeu mais COt - ^3H tanto da LDL oxidada quanto da LDL normal. Portanto, ao se analisar o comportamento das subpopulações de HDLs na reação da transferência de COt - ^3H de qualquer das LDLs doadoras, verificou-se que a HDL₃ recebeu 1,7 vezes mais COt - ^3H da HDL₂ ($p=0,0089$).

5.4 Medida de diâmetro das LDLs por microscopia eletrônica de transmissão

Com o objetivo de analisar a influência do tamanho das LDL no processo de transferência de éster de colesterol entre as lipoproteínas, foi medido o diâmetro das LDL normais e após sofrerem modificações químicas.

As eletromicrografias obtidas das lipoproteínas de baixa densidade, representativas das utilizadas para medir o diâmetro das partículas, estão apresentadas na Figura 16 (respectivamente A, B, C para LDL normal, oxidada e acetilada). Os diâmetros obtidos para as LDL normais, acetiladas e oxidadas foram respectivamente, 213 ± 36 Å ($n=100$ partículas), $144 \pm 7,5$ Å ($n=100$ partículas) e 253 ± 47 Å ($n=100$ partículas). A comparação estatística das médias

dos diâmetros das LDL normais e modificadas foi feita pelo teste “t” de Student não pareado e mostra diferença estatisticamente significativa entre elas ($p < 0,05$).

TABELA 1 - Experimento piloto de medida de transferência (%T) de colesterol esterificado de HDL₂ e HDL₃ marcadas com colesterol-oleato-¹⁴C (CO-¹⁴C) ou colesterol-¹⁴C (CE-¹⁴C), com esterificação “in vitro”, para plasma total após incubação por 2 horas (ensaio único em quadruplicata).

Isótopo	% T	
	Lipoproteínas doadoras	
	HDL ₂	HDL ₃
CE- ¹⁴ C	33,2	23,0
CO - ¹⁴ C	37,4	28,5

TABELA 2 - Composição química das lipoproteínas utilizadas no ensaio de acetilação. Os números apresentados expressam a concentração em mg/dL e o percentual em relação à lipoproteína total estão entre parênteses.

Componente Químico	Lipoproteínas		
	LDL	HDL ₂	HDL ₃
Colesterol livre	39,0 (1,69)	2,0 (0,19)	2,0 (0,05)
Colesterol esterificado	911,0 (39,5)	229,0 (22,2)	146,2 (3,5)
Triacilgliceróis	144,0 (6,2)	42,0 (4,1)	22,0 (0,5)
Fosfolipídeos	456,0 (19,8)	170,0 (16,5)	147,0 (3,5)
Proteínas	755,0 (32,7)	588,0 (57,0)	3860,0 (92,4)

As lipoproteínas utilizadas neste ensaio foram obtidas de um único “pool”.

TABELA 3- Composição química das lipoproteínas utilizadas nos experimentos de oxidação. Os números apresentados expressam a média (mg/dL) $\pm$ DP de 4 “pools” diferentes. Valores entre parênteses expressam a composição química percentual na lipoproteína total.

Componente Químico	Lipoproteínas		
	LDL	HDL ₂	HDL ₃
Colesterol livre	56,1 $\pm$ 27,0 (2,6)	16,6 $\pm$ 10,4 (3,2)	34,2 $\pm$ 18,6 (1,7)
Colesterol esterificado	650,9 $\pm$ 183,1 (30,8)	78,5 $\pm$ 33,1 (15,0)	100,3 $\pm$ 40,9 (5,0)
Triacilgliceróis	152,9 $\pm$ 47,2 (7,2)	27,8 $\pm$ 22,9 (5,3)	50,0 $\pm$ 12,0 (2,5)
Fosfolípidos	715,9 $\pm$ 343,1 (33,9)	172,6 $\pm$ 74,4 (33,1)	745,5 $\pm$ 398,3 (36,7)
Proteínas	537,0 $\pm$ 150,0 (25,4)	226,0 $\pm$ 85,0 (43,3)	1097,0 $\pm$ 51,1 (54,1)

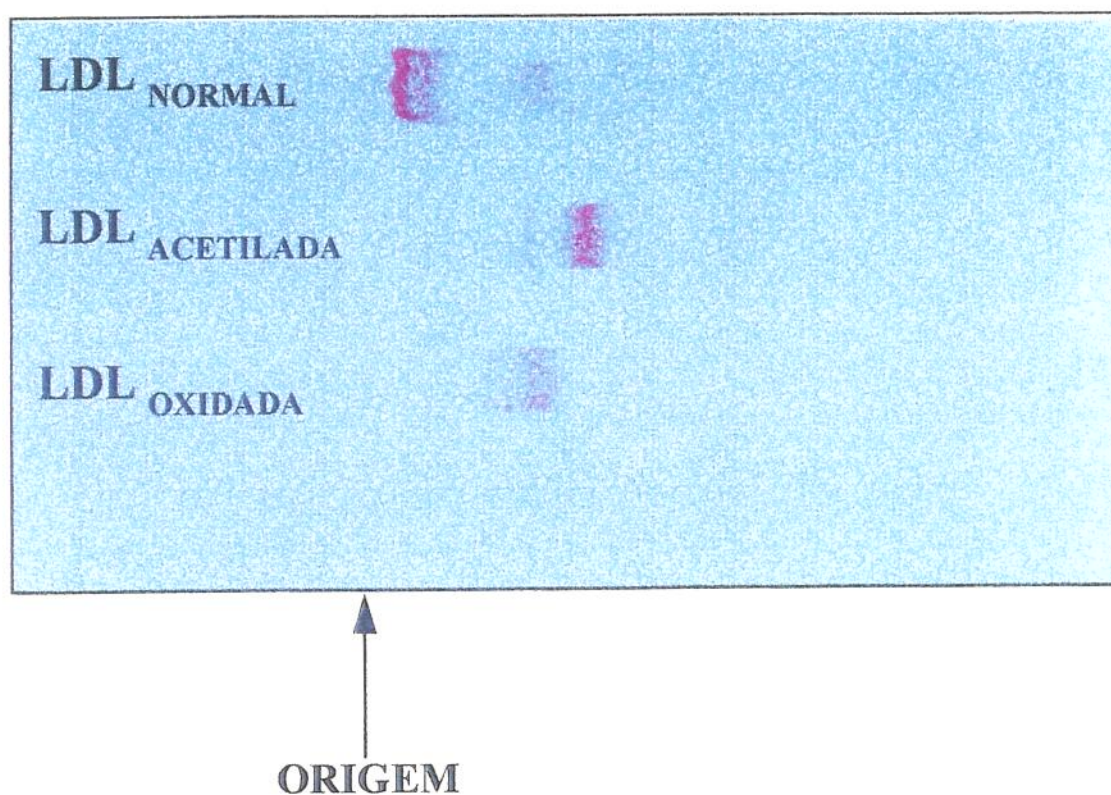


FIGURA 3 - Eletroforese das lipoproteínas de baixa densidade normal, acetilada e oxidada, desenvolvida em gel de agarose a 1 %, por 30 minutos e corada com Fat Red.

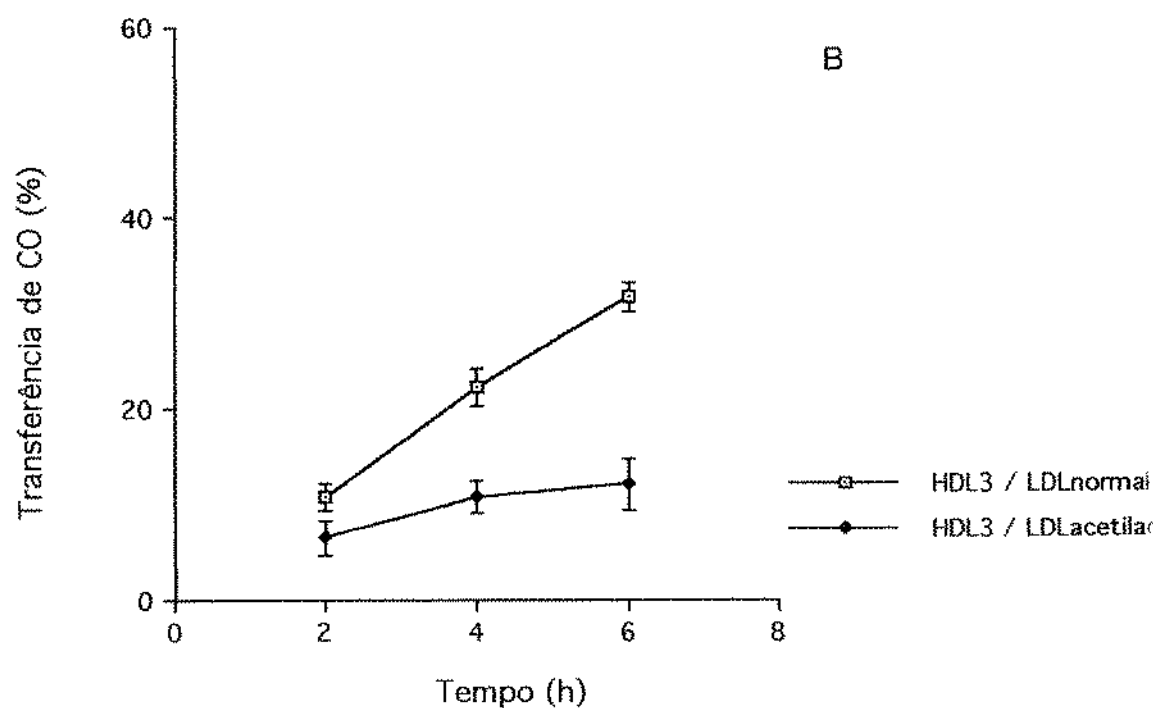
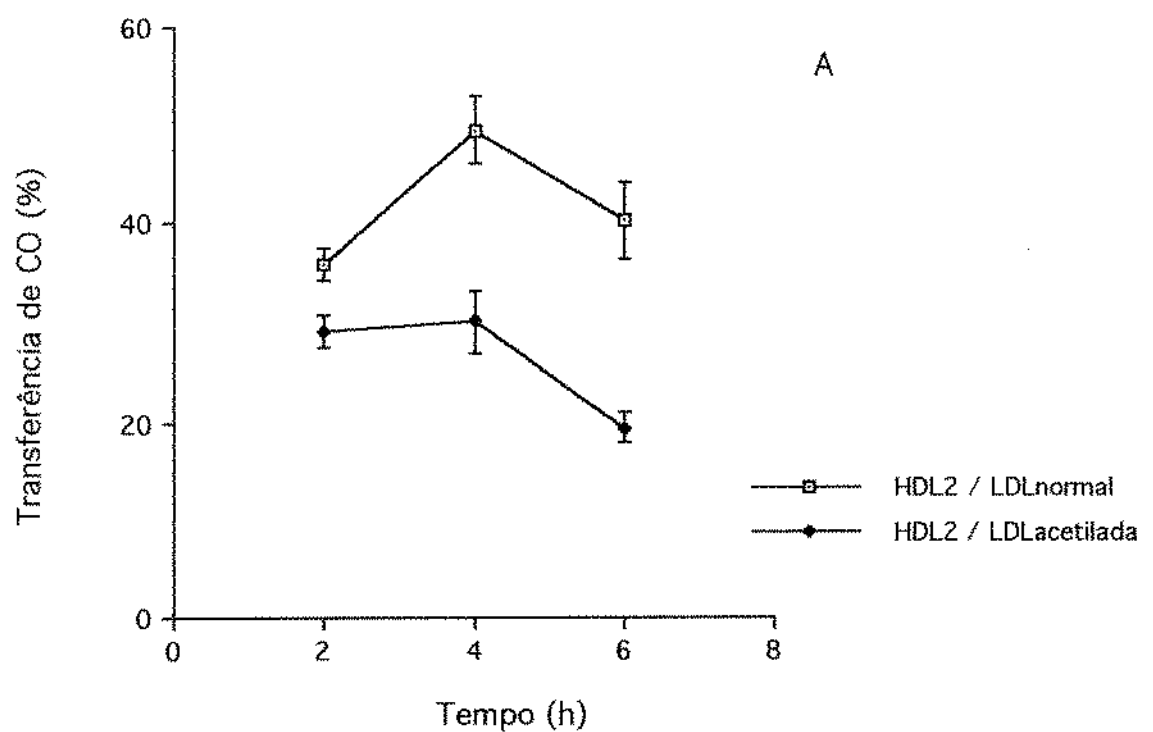


FIGURA 4 - Cinética da transferência percentual de colesterol-oleato (CO) da HDL₂ (4A) e da HDL₃ (4B) para LDL normal e acetilada. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão (EP) de 10 incubações de um único experimento.

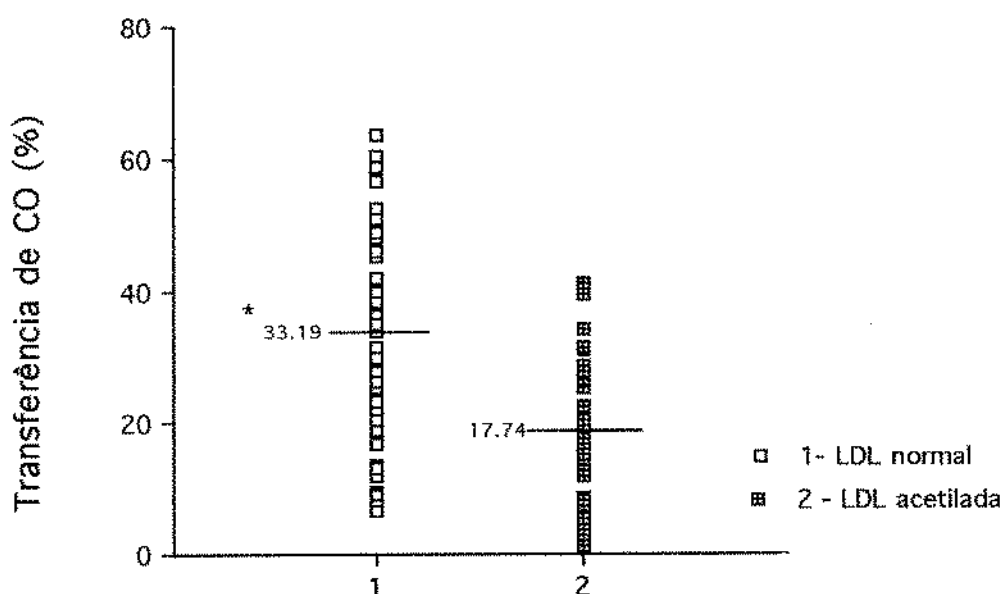


FIGURA 5 - Transferência percentual de colesterol-oleato (CO) das HDLs (HDL₂ e HDL₃) para LDL normal (n = 54 incubações) e LDL acetilada (n = 50 incubações).

* indica diferença estatisticamente significativa entre as médias (p = 0,0001).

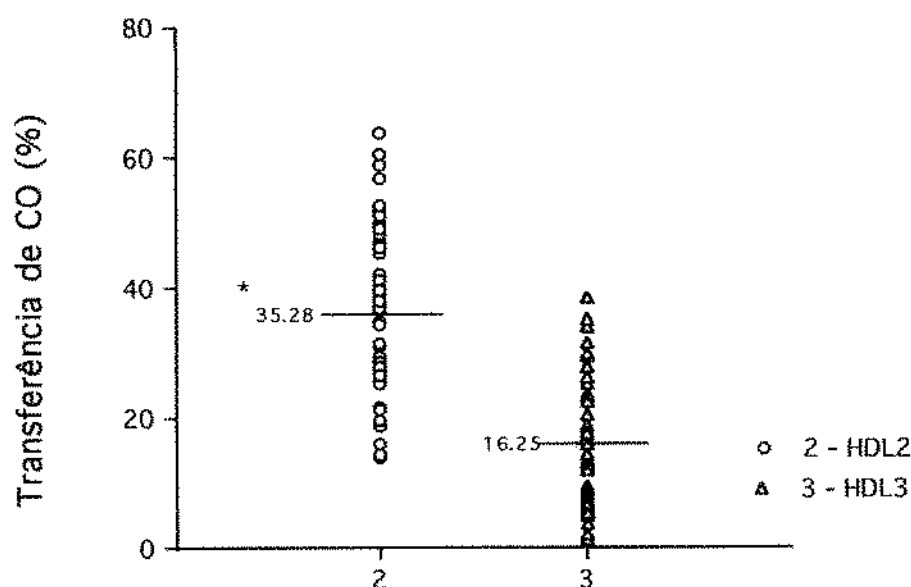


FIGURA 6 - Transferência percentual de colesterol - oleato (CO) da HDL₂ (n=52 incubações) e HDL₃ (n=52 incubações) para as LDLs (normal e acetilada).

* indica diferença estatisticamente significativa entre as médias (p=0,0001).

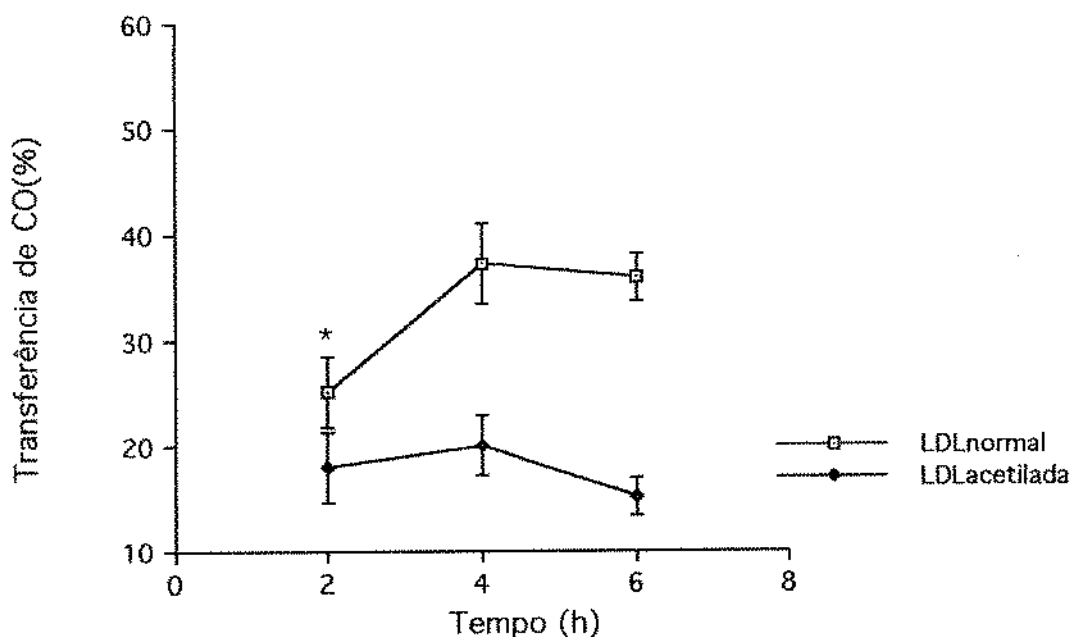


FIGURA 7 - Cinética da transferência de colesterol-oleato (CO) das HDL em conjunto para LDL normal ou acetilada. Cada ponto representa a média $\pm$ EP de 10 incubações de um único experimento. * indica valores de 2h inferior ao de 4 e 6 horas ($p=0,0003$).

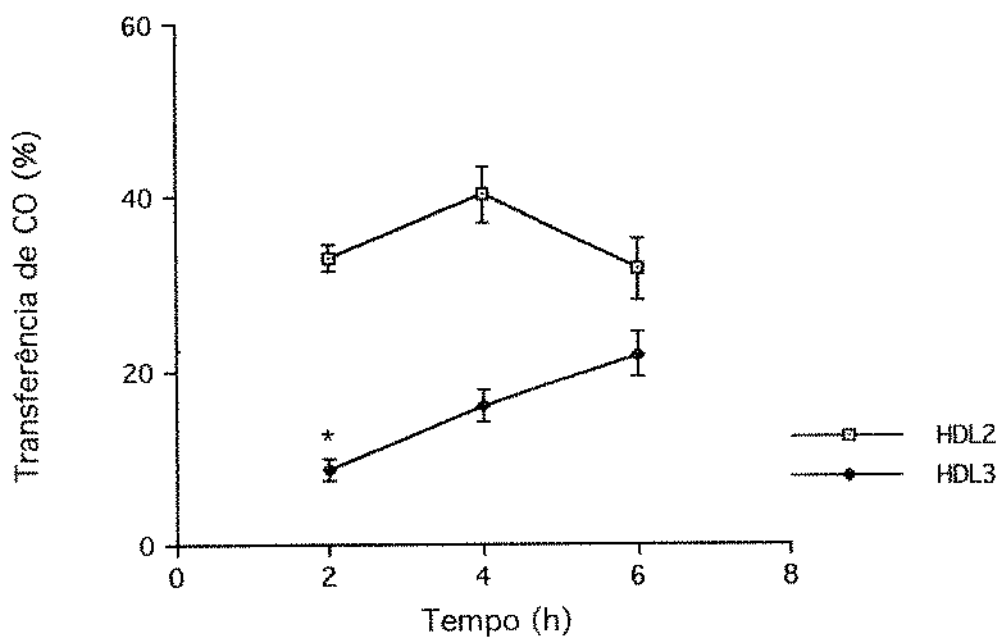


FIGURA 8 - Cinética da transferência de colesterol - oleato (CO) da HDL2 ou da HDL3 para o conjunto de LDL normal e acetilada. Cada ponto representa a média $\pm$ EP de 10 incubações. * indica diferença significativa entre o valor de 2 horas e os de 4 ou 6 horas ($p=0,006$).

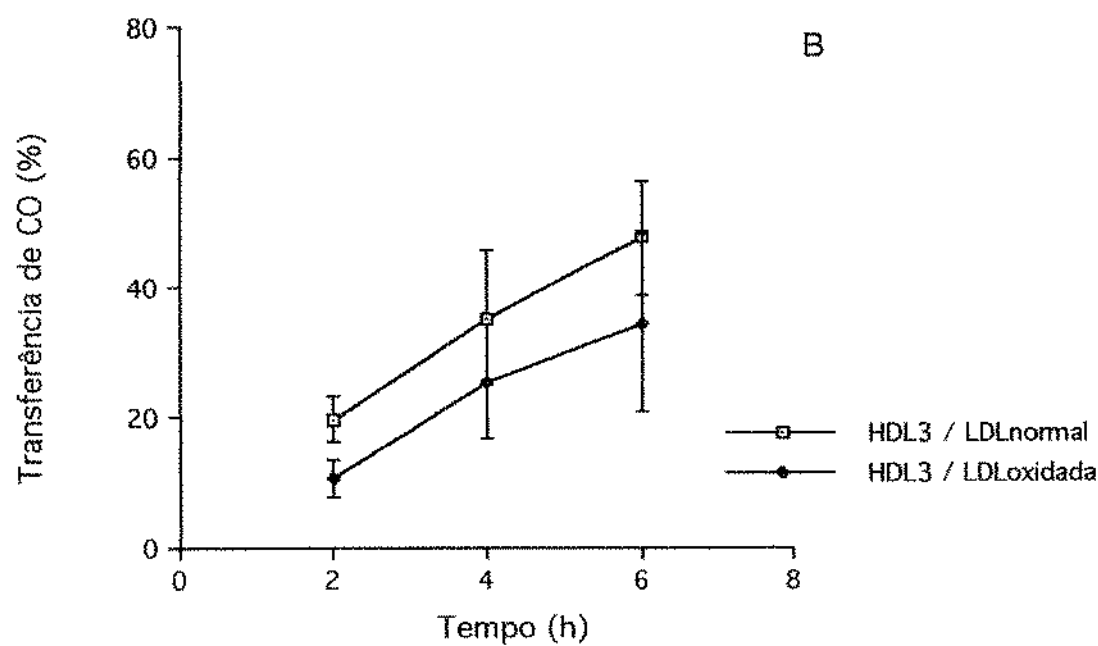
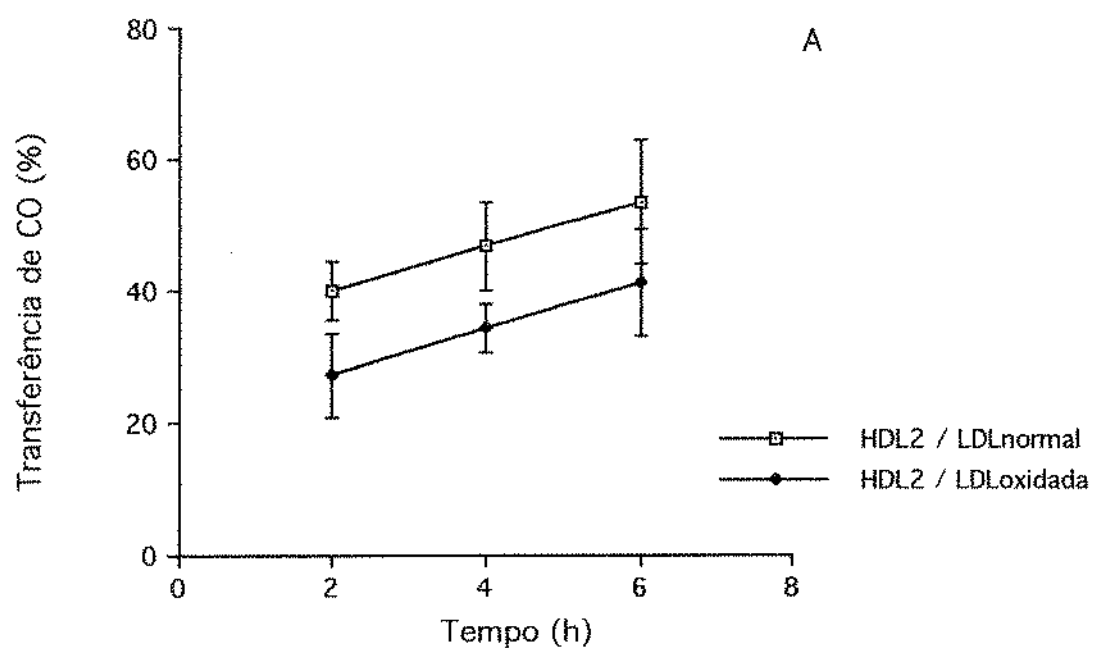


FIGURA 9 - Cinética da transferência de colesterol-oleato da HDL2 (9A) e da HDL3 (9B) para a LDL normal e oxidada. Cada ponto representa a média $\pm$ EP de 5 experimentos em quadruplicata.

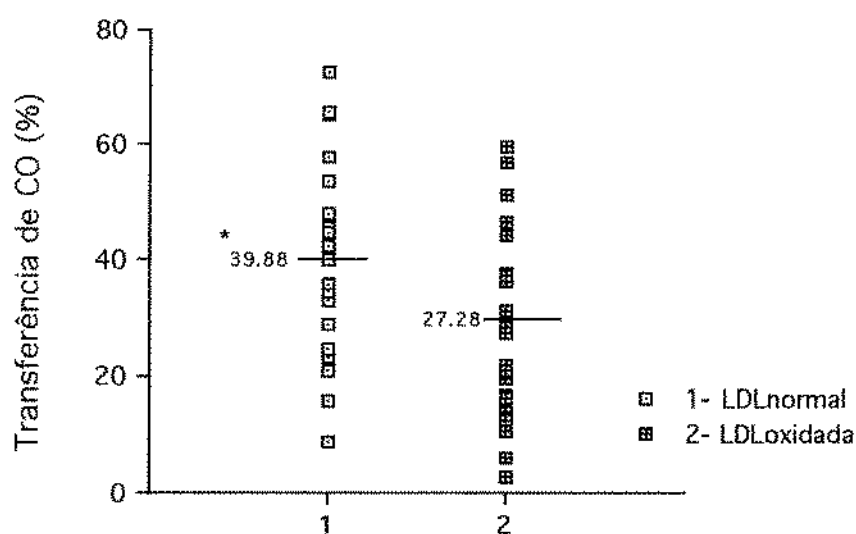


FIGURA 10 - Transferência percentual de colesterol-oleato (CO) das subpopulações de HDL (HDL₂ e HDL₃) para LDL normal (n=27 incubações) e para LDL oxidada (n=27 incubações). * indica diferença estatisticamente significativa (p=0,0088) entre as médias.

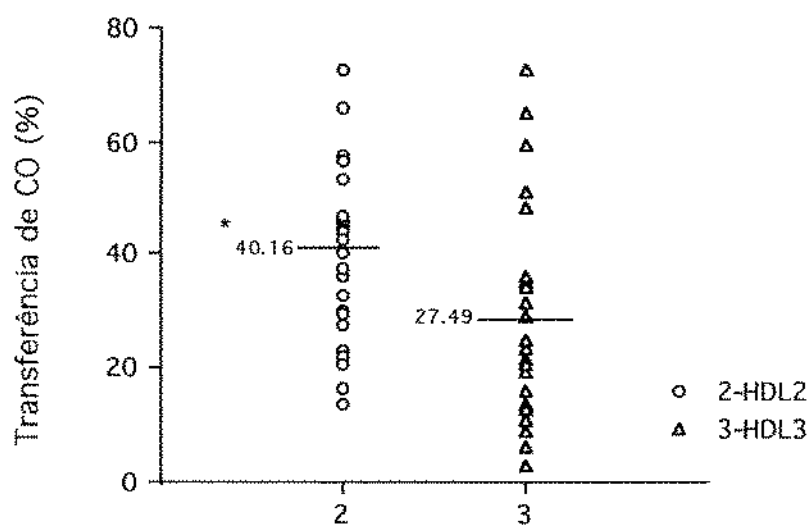


FIGURA 11 - Transferência percentual de colesterol-oleato da HDL₂ (n=26 incubações) e da HDL₃ (n=25 incubações) para o conjunto das LDLs (normal e oxidada). * indica diferença estatisticamente significativa entre as médias (p=0,0084).

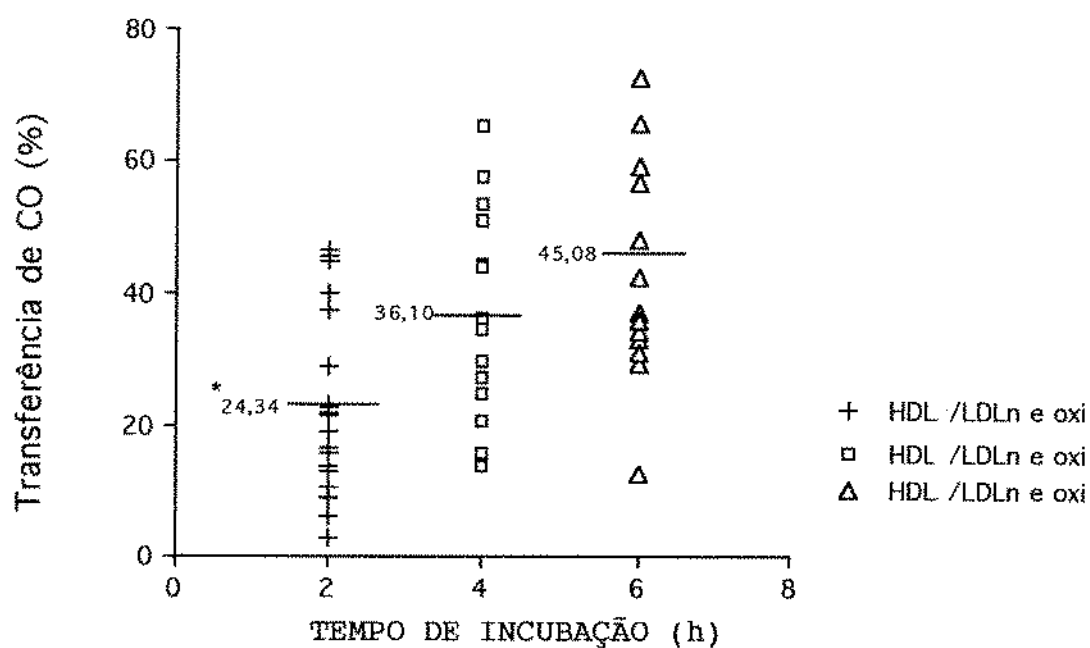


FIGURA 12 - Transferência de colesterol-oleato (CO) das lipoproteínas doadoras (HDL) para as lipoproteínas receptoras (LDL normal e oxidada) em função do tempo de incubação. * indica diferença estatisticamente significativa entre as médias ($p=0,0017$).

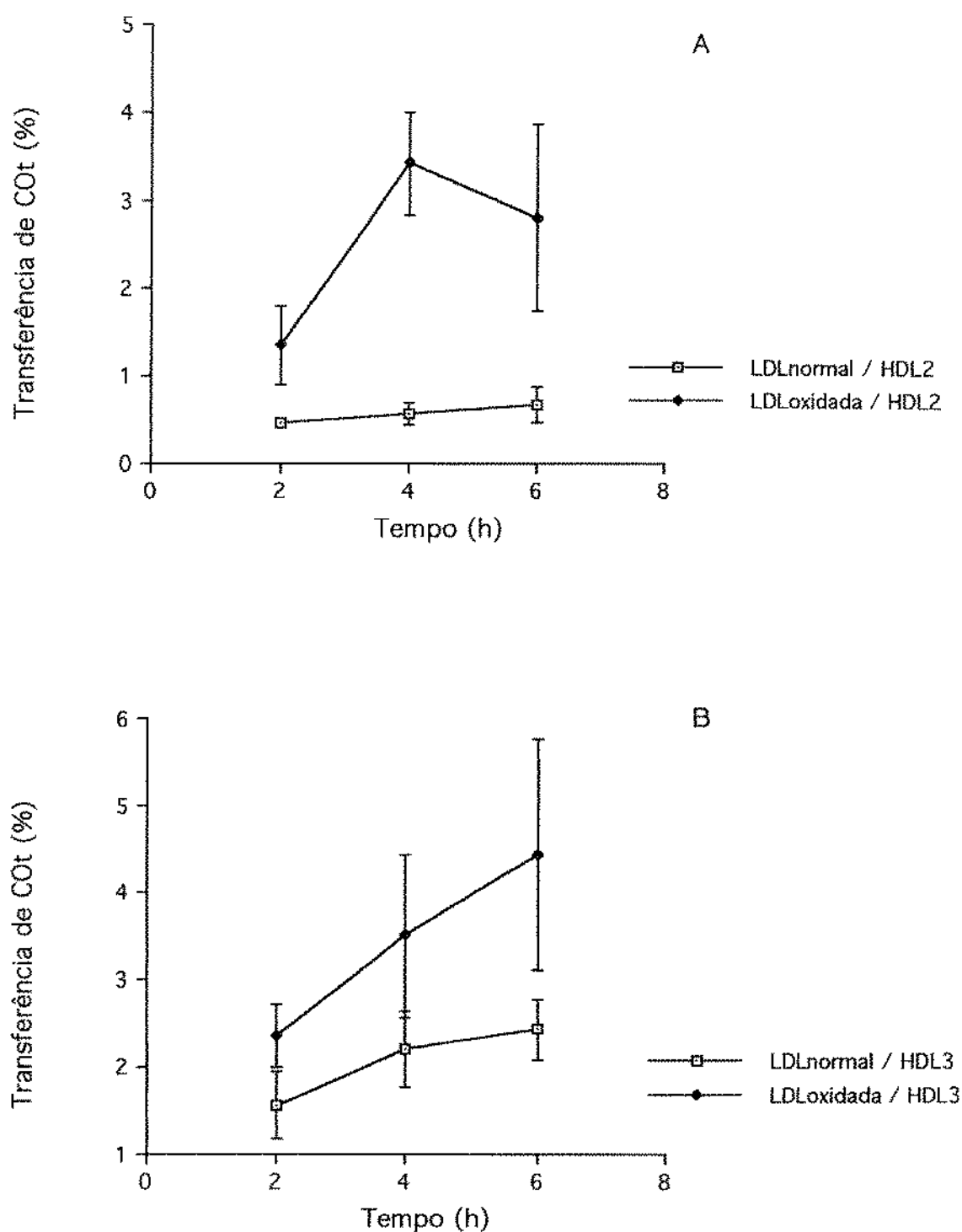


FIGURA 13 - Cinética da transferência de colesteril-oleil-éter (COt) de LDL normal e LDL oxidada para HDL2 (13A) e HDL3 (13B). Cada ponto representa a média $\pm$ EP de 5 experimentos em quadruplicata.

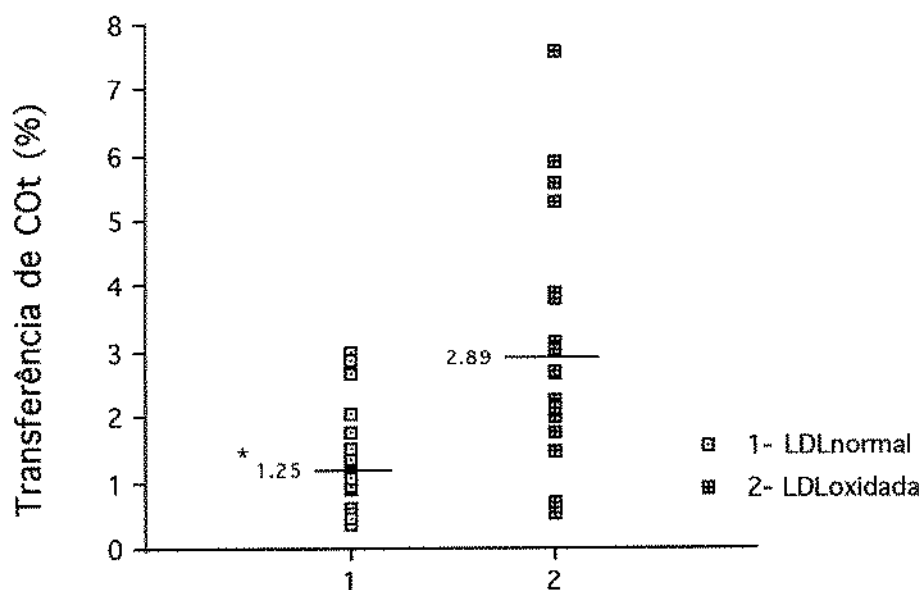


FIGURA 14 - Transferência de colesterol - oleil - éter (Cot) da LDL normal (n=21 incubações) e da LDL oxidada (n = 21 incubações) para o conjunto de HDL (HDL2 e HDL3). * indica diferença estatisticamente significativa entre as médias (p=0,0005).

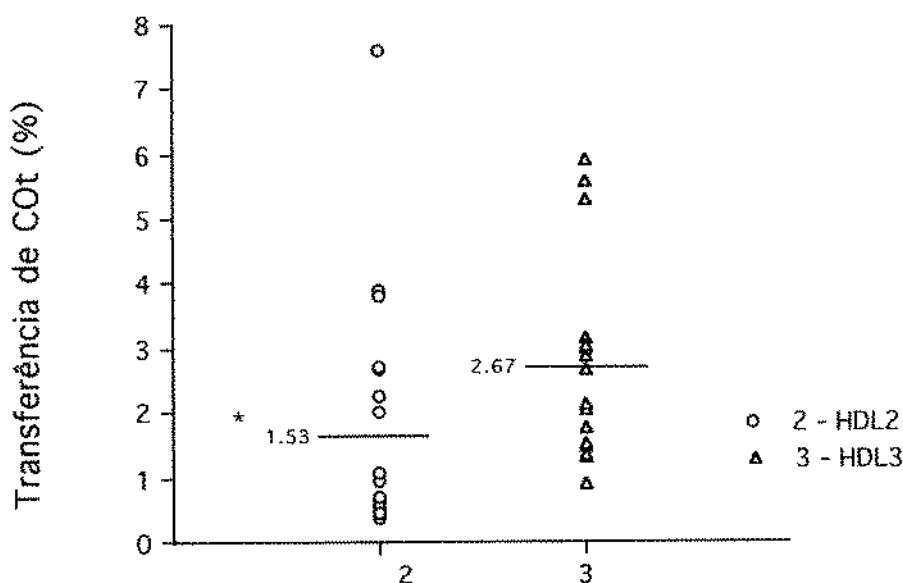


FIGURA 15 - Transferência percentual de colesterol-oleil-éter (Cot) das LDLs (normal e oxidada) para a HDL2 (n=22 incubações) e HDL3 (n= 20 incubações). * indica diferença estatisticamente significativa entre as médias (p=0,0089).

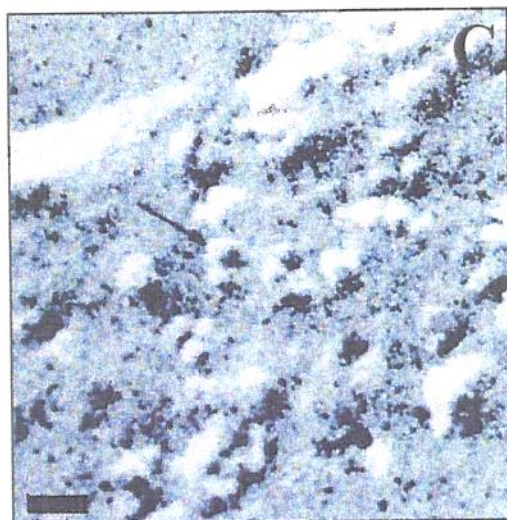
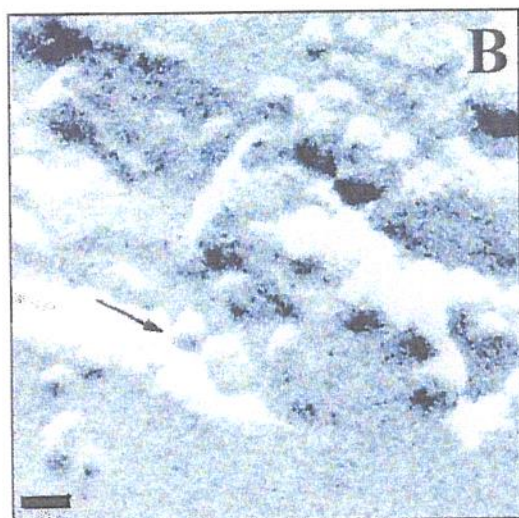
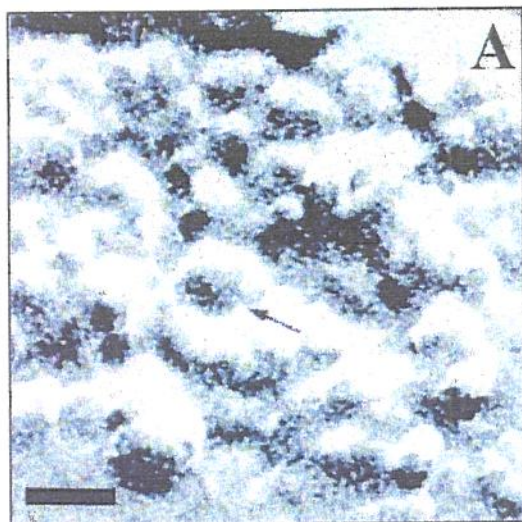


FIGURA 16 - Eletromicrografias das LDLs Normal (A), Oxidada (B) e Acetilada (C).
As barras representam 250 Å.

6 DISCUSSÃO

Visando estudar a transferência de lípidos neutros que ocorre fisiologicamente entre as lipoproteínas plasmáticas, como parte do processo do transporte reverso de colesterol, foi analisado “in vitro”, o papel de alterações químicas das LDL como a acetilação e a oxidação sobre esse processo. A acetilação da LDL foi utilizada como modelo de modificação química que define a captação da LDL por receptores macrofágicos “scavenger”, uma vez que, até o presente momento, não foi detectada sua presença no plasma ou nas lesões ateroscleróticas de humanos ou animais de experimentação (BROWN & GOLDSTEIN, 1983). Por meio de experimentos com LDL acetilada foram descobertos os receptores de alta afinidade de macrófagos que reconhecem a LDL acetilada (AcLDL) devido ao aumento de cargas negativas expostas na apolipoproteína B da LDL quando os ϵ -amino grupos dos resíduos de lisina são abolidos pela acetilação (BROWN & GOLDSTEIN, 1983 ; GOLSTEIN et alii, 1979).

A oxidação da LDL, por outro lado, é um importante processo que ocorre “in vivo” em diversas moléstias como no diabetes melito (GALLON et alii, 1994; RABINI et alii, 1994), na insuficiência renal crônica (KAYSEN, 1994), na hipercolesterolemia familiar e hiperlipidemia combinada (STEINBERG et alii, 1989; DEJAGER et alii, 1993). A LDL com essa alteração tem a capacidade de interagir com receptores “scavenger” das células fagocitárias, os quais não são regulados pelo conteúdo de colesterol intracelular, resultando na formação das células espumosas que são características da lesão aterosclerótica inicial, desencadeando várias alterações do metabolismo das células da parede arterial.

A aterosclerose é uma doença multifatorial. A lesão aterosclerótica é iniciada primariamente pela elevação dos níveis de certas lipoproteínas

plasmáticas. Os indivíduos com alterações de síntese e/ou função dos receptores de LDL geralmente apresentam progressão rápida do processo aterosclerótico. Alguns possuem um defeito genético e ausência de receptores para LDL o que leva a grande elevação nos níveis de LDL plasmáticas (BROWN & GOLDSTEIN, 1986). O mesmo defeito genético é descrito na linhagem de coelhos Watanabe (WHHL - Watanabe Heritable Hyperlipidemic) que também apresentam aterosclerose precoce (BROWN & GOLDSTEIN, 1986).

A relação entre “stress” oxidativo e o desenvolvimento de diversas doenças, inclusive a aterosclerose, foi intensamente estudada por GUTTERIDGE (1993). O “stress” acontece quando existe predomínio de espécies oxidantes devido a desequilíbrio entre a geração dessas espécies e os sistemas de defesa antioxidantes. A lesão provocada pelo “stress” oxidativo pode ser descrita como consequência de potencial antioxidante insuficiente do organismo e/ou da exacerbação de processos que induzam a produção de espécies oxidantes. Estudos epidemiológicos mostram relação inversa entre antioxidantes plasmáticos tais como tocoferol, caroteno e ascorbato e a incidência de doenças cardiovasculares (RIMM et alii, 1993). A necessidade desses antioxidantes está provavelmente aumentada quando a quantidade de lipídeos plasmáticos é alta, como acontece nas hiperlipoproteinemias. O defeito no catabolismo das LDL e de outras lipoproteínas que ocorre nas hiperlipoproteinemias resulta no aumento da meia-vida dessas partículas no plasma, que apresentam maior taxa de infiltração para o interstício arterial aumentando assim a probabilidade de interagirem com espécies oxidantes geradas por diferentes células.

Existem trabalhos demonstrando que a ligação de LDL modificadas à receptores macrofágicos é diferente para a LDL oxidada e acetilada, indicando que existe mais de uma classe de receptores “scavenger” ou sítios distintos de reconhecimento para LDL acetiladas e oxidadas (ARAI et alii, 1989 ; SPARROW et alii, 1989). Recentemente, LONGHEED & STEINBRECHER

(1996) estudando a competição entre a LDL oxidada e acetilada, em cultura de macrófagos de peritônio de camundongos, demonstraram que a oxidação das LDL leva à agregação das partículas que interagem com maior número de receptores, sendo então preferencialmente captadas.

No presente trabalho foi demonstrado que modificações químicas nas lipoproteínas de baixa densidade são responsáveis por redução significativa da transferência de éster de colesterol das lipoproteínas de alta densidade para as LDL modificadas, quando comparadas às LDL nativas (Figuras 5 e 10).

A diminuição da atividade da CETP no processo de transferência de lipídeos entre lipoproteínas, com modificação por acetilação e oxidação, é descrita pela primeira vez neste trabalho, utilizando-se a medida da quantificação da atividade da CETP.

HESLER et alii (1987) sugeriram que existe aumento da associação da CETP com a LDL oxidada devido a produção de cargas negativas geradas pelos lípidos oxidados. ZAWADSKI et alii, (1991) demonstraram que a CETP tem maior afinidade pela LDL oxidada que pela LDL nativa, embora a ligação da CETP com lipoproteínas oxidadas seja facilmente rompida. Em 1996, MASSON e colaboradores também encontraram maior afinidade da CETP por partículas carregadas negativamente. Apesar da afinidade da CETP pelas LDL ser maior quando esta apresenta-se na forma oxidada, foi encontrada menor transferência de CO das HDL para a LDL oxidada. Pôde-se então inferir que as modificações estruturais da partícula receptora têm maior importância no processo de transferência do que a afinidade da CETP pela lipoproteína.

As LDL modificadas por acetilação e oxidação utilizadas em nosso trabalho apresentam evidente alteração de cargas resultando em maior mobilidade eletroforética em relação à LDL nativa (Figura 3). Embora a acetilação tenha gerado mais cargas negativas que a oxidação, a diminuição na porcentagem de transferência obtida por ambas foi semelhante (respectivamente

1,8 e 1,5 vezes menores). Os resultados estão de acordo com o trabalho de HESLER et alii (1987) onde foi demonstrado que incubação de CETP com emulsões contendo lipídeos peroxidados produziu inativação e degradação da CETP. KATO et alii (1989) demonstraram que purificação da CETP por cromatografia em coluna de Sepharose ligada à succinil-LDL diminuía a atividade da CETP quando comparada à purificação em Sepharose ligada à LDL intacta.. ZAWADSKI et alii (1991) estudando o efeito produzido pela oxidação por cobre nas lipoproteínas de alta e baixa densidades e sua relação com a afinidade pela CETP mostraram que as ligações entre CETP e as pré- β HDL são rompidas quando plasma humano oxidado foi submetido à eletroforese em gel de agarose. NISHIDA et alii (1993), por outro lado, encontraram máxima atividade da CETP após succinilação ou acetilação de apenas 7% dos amino-grupos da LDL. No entanto, essa atividade foi progressivamente diminuída com o aumento do grau de succinilação ou acetilação. No presente experimento, o grau de acetilação foi elevado como demonstrado pela acentuada migração eletroforética da LDL, padrão este não obtido quando a acetilação é discreta.

Quando se avaliou o fluxo no sentido recíproco, isto é, a transferência de éter de colesterol cedido pela lipoproteína modificada para a HDL, notou-se aumento significativo dessa transferência em relação à lipoproteína nativa. Isto mostra que a CETP também atua nesse processo favorecendo a doação de lípidos oxidados para a lipoproteína de alta densidade (Figura 14). Resultados semelhantes a estes foram obtidos por CHRISTISON et alii (1995) em experimentos de incubações de LDL contendo hidróxidos e hidroperóxidos de ácido linoléico (marcados com ^3H), com HDL intacta e CETP purificada. Após 24 horas de incubação, foi encontrado acúmulo de substâncias oxidadas na HDL, o que coincide com os resultados obtidos neste trabalho.

Com base nesses resultados, pode-se inferir que a CETP desempenha papel antiaterogênico no transporte de colesterol, isto é, transfere menor

quantidade de éster de colesterol da HDL para uma partícula modificada, aterogênica, favorecendo o transporte desse colesterol via LDL íntegra, não aterogênica. Estes resultados também mostram que a CETP promove o transporte de lípidos oxidados da LDL para a HDL, favorecendo a retirada de compostos sabidamente aterogênicos da LDL que serão transportados ao fígado via HDL.

Analisando o papel das HDL₂ e das HDL₃ sobre o processo de transferência de éster de colesterol para as LDL normal e acetilada (Figura 6) e para as LDL normal e oxidada (Figura 11), pudemos concluir que as HDL₂ foram melhores substratos para a ação da CETP sendo responsável pela maior transferência do colesterol esterificado para as LDL do que as HDL₃. Estes resultados encontram suporte na literatura (BARRANS et alii, 1996) que associa o efluxo de colesterol livre celular principalmente à HDL₃ e transporte do colesterol na forma esterificada para o fígado, principalmente à HDL₂. No entanto, sabe-se que “in vitro” a CETP tem maior afinidade por HDL menores como a HDL₃ (BRUCE et alii, 1995) comparativamente à HDL₂. No presente trabalho não foi feito estudo de competição entre HDL₂ e HDL₃. Entretanto, os resultados obtidos podem refletir a maior proporção de éster de colesterol na HDL₂ em relação à HDL₃ que estão disponíveis para a reação mediada pela CETP (Tabela 3).

A transferência de colesterol-oleato radioativo da HDL₂ para a LDL normal ou acetilada (Figura 8), parece atingir uma condição de saturação rapidamente, pois não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na porcentagem de transferência de CO ao longo do tempo. Quando a partícula doadora era a HDL₃, a saturação do processo ocorreu somente após 4 horas de incubação e sempre em nível inferior ao da transferência a partir da HDL₂. A transferência de colesterol-oleato para LDL normal a partir do conjunto de HDL (Figura 7), foi menor no tempo inicial de 2 horas de incubação comparativamente aos tempos 4 e 6 horas. Este fato, porém, não ocorreu ao se analisar a

transferência de CO do conjunto de HDL para a LDL acetilada. Provavelmente as alterações na estrutura da LDL produzidas pela acetilação levaram a saturação mais rápida no processo de transferência.

Analisando-se o processo de transferência de colesterol-oleato entre partículas doadoras (HDL) e receptoras (LDL normal e oxidada) em função do tempo de incubação (Figura 12), notamos que o pico de transferência ocorreu entre 4 e 6 horas de incubação, após o qual houve saturação do processo. Foram feitos alguns experimentos onde as lipoproteínas foram incubadas por 8, 16 e 24 horas (resultados não apresentados) e verificou-se que após 6 horas de incubação ocorria saturação do processo de transferência. GUÉRIN et alii (1994) trabalhando com plasmas de indivíduos normais e hipertrigliceridêmicos onde foram medidas as transferências de CO das HDL para as apoB-lipoproteínas por método isotópico e por método enzimático, encontraram resultados parecidos aos deste trabalho, em relação à cinética da transferência. Os autores encontraram que até aproximadamente 6 horas de incubação, o método de medida de transferência de éster de colesterol por radioatividade é equivalente ao método enzimático de medida de teor de colesterol transferido. Após esse período, obtiveram saturação do processo de transferência medido por método enzimático, que não é acompanhado pelo método isotópico, mostrando que a medida de transferência por esse método representa, após 6 horas de incubação, apenas troca de éster de colesterol entre as lipoproteínas, não ocorrendo mais transferência líquida de massa de éster de colesterol.

No mesmo trabalho acima citado, é discutida a importância do método isotópico de medida de atividade de CETP por incubação de lipoproteínas doadoras e receptoras em concentrações que espelhem a mesma distribuição plasmáticas das lipoproteínas. No presente trabalho a relação LDL/HDL foi maior que a relação plasmática normal pois a HDL foi utilizada apenas como traçador e fixou-se a concentração da LDL pela massa de proteína. Este

procedimento teoricamente favoreceria a transferência de CO no sentido LDL→HDL, ou seja, a favor do gradiente de concentração. No entanto, encontramos maior transferência de CO no sentido inverso, de HDL→LDL ou seja, contra o gradiente de concentração.

Foi confirmado ainda neste trabalho, pela da marcação isotópica das LP doadoras e receptoras, que a CETP também pode mediar o transporte de colesterol esterificado na direção oposta, ou seja, da LDL para HDL. Apesar dessa via de transporte ser menor em termos percentuais, (1,53 % e 2,67 %, para HDL₃ e HDL₂ , respectivamente) (Figura 15) ela é importante porque representa uma quantidade de CO expressiva. Nesta direção inversa do fluxo de CO, foi detectado um aumento de 2,3 vezes (Figura 14) na transferência de lípides oxidados em relação aos lípides não oxidados da LDL para as HDL. RIFICI & KHACHADURIAN (1996) demonstraram recentemente em experimentos de cultura de macrófagos, que a oxidação da HDL diminui em 36% sua capacidade de promover efluxo de colesterol celular, sugerindo que seu papel protetor esteja prejudicado pela presença de lípides oxidados.

A medida do tamanho das LDL foi executada pela técnica de criofratura para microscopia eletrônica em vez da técnica de coloração negativa, em parte, devido ao fato das amostras não necessitarem de fixação química, sendo somente submetidas a congelamento ultra-rápido que permite manter a estrutura da lipoproteína intacta (FORTE & NICHOLS, 1972). O diâmetro das LDL normais obtido por microscopia eletrônica utilizando-se a técnica de criofratura foi compatível com aquele obtido por coloração negativa ou seja, o diâmetro médio da LDL normal humana está entre 200-250Å (ASSMAN, 1982) e o diâmetro médio das LDL normais obtido no presente trabalho foi 213Å .

O aumento do diâmetro da LDL oxidada em relação à LDL normal pode ser explicado por agregação das partículas devido a alteração de cargas

provocada pela oxidação que poderia proporcionar fusão de LDLs (LONGHEED & STEINBRECHER, 1996). A maior transferência de lipídeos oxidados da LDL para a HDL poderia ser explicada por este aumento de tamanho da LDL que poderia permitir maior interação da LDL com a CETP. Por outro lado, a diminuição do tamanho da LDL acetilada encontrada no presente trabalho que aparentemente não foi observada no trabalho NISHIDA e colaboradores (1993), provocou o mesmo tipo de alteração no processo de transferência que a LDL oxidada, ou seja, diminuição na transferência de éster de colesterol entre HDL e LDL.

O fato de ambas as modificações químicas induzidas nas LDL - acetilação ou oxidação - terem provocado a mesma alteração no processo de transferência de CO entre as lipoproteínas (diminuição) mas, por outro lado, terem apresentado diferente comportamento em relação aos diâmetros, significa que os tamanhos das partículas não estão relacionados diretamente às mudanças no processo de transferência. Provavelmente, alterações qualitativas produzidas nas partículas por oxidação ou acetilação são efetivamente mais importantes no processo de transferência de CO do que alterações quantitativas como por exemplo o tamanho da partícula.

Alterações nos processos de transferência de lipídeos são importantes para a avaliação do processo da aterogênese. O paradoxo existente entre a atividade da CETP ter ou não efeitos aterogênicos ainda não está totalmente elucidado. A inibição do processo de transferência de éster de colesterol resultaria em perfil menos aterogênico das lipoproteínas plasmáticas, enquanto que a situação oposta levaria a perfis desfavoráveis ao organismo humano.

Considerando-se que a oxidação da lipoproteína de baixa densidade diminuiu a porcentagem de transferência de éster de colesterol na direção HDL → LDL e, por outro lado, aumentou a transferência na direção LDL → HDL, poderia-se concluir que, neste modelo experimental, a CETP estaria

favorecendo o estabelecimento de um perfil não aterogênico das lipoproteínas plasmáticas.

Concluindo, o complexo papel da CETP sobre o transporte reverso de colesterol pode depender, ainda, do estado metabólico do indivíduo, isto é, se as demais vias deste transporte estão preservadas, a ação predominante da CETP é provavelmente, antiaterogênica.

7 CONCLUSÕES

Através de experimentos “in vitro” de quantificação de transferência de colesterol esterificado entre lipoproteínas mediada pela CETP, pôde-se inferir que:

- 1) modificações químicas das LDL por acetilação ou oxidação diminuem sua capacidade de receber éster de colesterol das HDL, quando comparadas às LDL normais;
- 2) LDL modificadas por oxidação são melhores doadoras de éster de colesterol para as HDL, do que as LDL intactas;
- 3) HDL₂ são melhores doadoras de éster de colesterol para as LDL do que as HDL₃;
- 4) HDL₃ são melhores receptoras de éster de colesterol transferido das LDL do que as HDL₂;
- 5) a oxidação ou acetilação das LDL provocaram alteração dos diâmetros das partículas que, não obstante, não influenciaram o processo de transferência de éster de colesterol;
- 6) a CETP, nas condições experimentais utilizadas, promoveu a redistribuição do colesterol plasmático preferencialmente para as lipoproteínas íntegras e para partículas responsáveis pela remoção plasmática do colesterol (HDL), sugerindo, portanto, papel protetor dessa proteína em relação ao processo aterosclerótico.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ACTON, S., RIGOTTI, A., LAUDSCHULZ, K.T., XU, S., HOBBS, H.H., KRIEGER, M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. **Science** , Washington, DC. v.271, p. 518-520, 1996.
- 2 AGELLON, L.B., WALSH, A., HAYEK,T., MOULIN,P., JIANG, X.C., SHELAUSKI, S.A., BRESLOW, J.L., TALL, A.R. Reduced high density lipoprotein cholesterol in human cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 266, p. 10796-10801, 1991.
- 3 ARAI, H., KITA, T., YOKODE, M., NARUMIYA, S., KAWAI, C. Multiple receptors for modified low density lipoproteins in mouse peritoneal macrophages: different uptake mechanisms for acetylated and oxidized low density lipoproteins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.159, p.1357-1382, 1989.
- 4 ASSMANN, G. *Lipid metabolism and atherosclerosis*. Ed. Schattarauer-Verlag., 146 p., 1982.
- 5 ATKINSON, D. & SMALL, D. Recombinant lipoproteins implications for structure and assembly of native lipoproteins. **Annu. Rev. Phys. Chem.**, Palo Alto, v. 15, p. 403-485, 1986.
- 6 AVOGARO, P. , BON, G.B., CAZZOLATO, G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. **Arteriosclerosis**, Dallas, v.8, p. 79-87, 1988.
- 7 BACHORIK, P.S. & ALBERS, J. Precipitation methods for quantification of lipoprotein. **Methods Enzymol.**, New York, v.129 p. 78-100, 1986.

- 8 BARTER, P.J. & JONES, M.E. Kinetic studies of transfer of esterified cholesterol between human plasma low and high density lipoproteins. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.21, p. 238-249, 1980.
- 9 BARTLETT, G.R. Phosphorus assay in column chromatography. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.234, p. 466-468, 1959.
- 10 BARRANS, A., JASPARD, B., BARBARAS, R., CHAP, H., PERRET, B., COLLET, X. Pre- β HDL: structure and metabolism. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1300, p.73-85, 1996.
- 11 BASU, S.K., GOLDSTEIN, J.L., ANDERSON, R.G.W., BROWN, M.S. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous hypercholesterolemia fibroblasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, DC, v. 73, p. 178-182, 1976.
- 12 BERLINER, J.A., TERRITO, M.C., SEVANIAM, A., RAMIN, S., KIM, J.A., BAMSHAD, B., ESTERSON, M., FOGELMAN, A.M. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. **J. Clin. Invest.**, San Diego, v. 85, p. 1260-1266, 1990.
- 13 BHATNAGAR, D., DURRINGTON, P.N., MACKNESS, M.I., ARROL, S., WINOCOUR, P.H., PRAIS, H. Effects of treatment of hypertriglyceridemia with gemfibrosil on serum lipoproteins and the transfer of cholesteryl ester from high density lipoprotein to low density lipoprotein. **Atherosclerosis**, Shannon, v. 92, p. 49-57, 1992.
- 14 BISGAINER, C.I., SIEBENKAR, M.V., BROWN, M.L., INAZU, A., KOISUMI, J., MABUCHI, H., TALL, A.R. Familial cholesteryl ester transfer protein deficiency is associated with triglyceride rich low density lipoproteins containing cholesteryl ester of probable intracellular origin. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.32, p. 21-33, 1991.

- 15 BRECHERINDGE, W.C., LITTE, J.A., STEINER, G., CHOW, A., POAPST, M. Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein CII. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 298, p. 1265-1273, 1978.
- 16 BRITON, E.A., EISENBERG, S., BRESLOW, J.L. Increased apo AI and apo A II fractional catabolic rate in patients with low high density lipoprotein cholesterol levels with or without hypertriglyceridemia. **J. Clin. Invest.**, San Diego, v.87, p. 536-544, 1991.
- 17 BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. Lipoprotein metabolism in the macrophage implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 52, p.: 223-261, 1983.
- 18 BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, New York, v.232, p 34-47, 1986
- 19 BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. The LDL receptor concept: clinical and therapeutic implications. **Atheroscler. Rev.**, New York, v. 18, p. 85-93, 1986.
- 20 BROWN, M.L., HESLER, C., TALL, A.R. Plasma enzymes and transfer proteins in cholesterol metabolism. **Curr. Opin. Lipidol.**, London, v.1, p. 122-127, 1990.
- 21 BROWN, M.L., INAZU, A., HESLER, C.B., AGELLON, L.B., MARIN, C., WHITLOCK, M.E., MARCEL, I.L., MILNE, R.W., KOIZUMI, J., MABUCHI, H., TAKEDA, R., TALL, A.R. Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high density lipoproteins. **Nature**, London, v.342, p. 448-451, 1989.
- 22 BRUCE, C., DAVIDSON, W.S., KUSSIE, P., LUND-KATZ, S., PHILLIPS, M.C., TALL, A.R. Molecular determinants of plasma cholesteryl ester transfer protein binding to high density lipoproteins. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.250, p. 11532-11534, 1995.

- 23 CHAIT, A., BRAZG, R.L., TRIBBLE, D.L., KRAUSS, R.M. Susceptibility of small, dense low density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. **Am. J. Med.**, New York, v. 94, p. 350-356, 1993.
- 24 CHAJEK, T., ARON, L., FIEDING, C.J. Interaction of lecithin : cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in the transport of cholesteryl ester into sphingomyelin liposomes. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 19, p. 3673-3677, 1980.
- 25 CHAJEK, T. & FIELDIN, C.J. Isolation and characterization of a human serum cholesteryl ester transfer protein. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, Washington, DC, v. 75, p. 3445-3449, 1978.
- 26 CHEUNG, M.C., AUSTIN, A.M., MOULIN, P., WOLF, A.C., CRYER, D., KNOPP, R.H. Effects of pravastatin on apolipoprotein-specific high density lipoprotein subpopulations and low density lipoprotein subclasses phenotypes in patients with primary hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, Shannon, v.102, p. 107-119, 1993.
- 27 CHISOLM III, G.M. & PENN, M.S. Oxidized lipoproteins and atherosclerosis. IN Fuster, V., Ross, R. and Topol, E.J. , eds. *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1996. p.129-149.
- 28 CHRISTISON, J.K., RYE, K.A., STOCKER, R. Exchange of oxidized cholesteryl linoleate between LDL and HDL mediated by cholesteryl ester transfer protein. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.36, p.2017-2026, 1995.
- 29 CLAY, M.A., NEWNHAM, H.H., BARTER, P.J. Hepatic lipase promotes a loss of apolipoprotein A I from triglyceride-enriched human high density lipoproteins during incubation in vitro. **Arterioscler. Thromb.**, Dallas, v. 11, p. 415-422, 1991.

- 30 DAVIES, P.F., REIDY, M.A., GOODE, T.B., BOWYER, D.E. Scanning electron microscopy in the evaluation of endothelial integrity of fatty lesion in atherosclerosis. **Atherosclerosis**, Shannon, v.25, p. 125-129, 1976.
- 31 DEJAGER, S., BRUCKERT, E., CHAPMAN, M.J. Dense low density subspecies with diminished oxidative resistance predominate in combined hyperlipidemia. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 34, p.295-308, 1993.
- 32 DOBIASOVA, M., STRIBRNA, J., PRITCHARD, P.H., FROHLICH, J. Cholesterol esterification rate in plasma depleted of very low density lipoproteins is controlled by the proportion of HDL2 and HDL3 subclasses: study in hypertensive and normal middle aged septuagenarian men. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.33, p. 1411-1418, 1992.
- 33 DOUSSET, N., NEGRE-SALVAYRE, A., LOPEZ, M., SALVAYRE, R., DOUSTE-BLAZY, L. Ultraviolet-treated lipoproteins as a model system for the study of the biological effects of lipid peroxides on cultured cell. I . Chemical modifications of ultraviolet-treated low density lipoproteins. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1045 , p. 219-223, 1990.
- 34 DRAYNA, D., JARNAGIN, A.S., LEAN, J., HENZEL, W., KOHR, W., FIEDING, C., LAWN, R. Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer protein c-DNA. **Nature**, London, v.327, p. 632-634, 1987.
- 35 DRISCOLI, D.M. & GETZ, G.S. Extrahepatic synthesis of lipoprotein E. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 25 , p. 1368-1379, 1984.
- 36 DULLAART, R.P.F., GROENER, J.E.M., VAN WIJK, H., SLUITER, W.J., ERKELENS, D.W. Alimentary lipemia induced redistribution of cholesteryl ester between lipoproteins. **Arteriosclerosis**, Dallas, v. 9, p. 614-622, 1989.

- 37 EBERT, D.L., WARREN, R.J., BARTER, P.J., MITCHELL, A. Infusion of atherogenic lipoprotein particules increases hepatic lipase activity in the rabbit. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 34, p. 89-94, 1993.
- 38 ECKEL, R.N. & WITTE, M.H. Lipoprotein lipase - a multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.320, p. 1060-1068, 1989.
- 39 EISENBERG, S. Plasma lipoprotein conversion. **Methods Enzymol.**, New York, v.129, p. 347-367, 1986.
- 40 EISENBERG, S., GAVISH, D., OSCHRY, Y., FAINARU, M., DECKELBAUM, R. J. Abnormalities in very low , low and high density lipoproteins in hypertriglyceridemia : reversal toward normal with bezafibrate treatment. **J. Clin. Invest.** , San Diego, v.74 , p. 470-482, 1984.
- 41 ESBACH, S., BROUWER, A., BOSMA, A., KNOOK, D.L., THEO, J.C. VAN BERKEL. Visualization of the interaction of β migrating very low density lipoproteins with human liver cells: involvement of remnant and LDL receptors. **Circulation**, Dallas, v. 90, p. I 290, 1994.
- 42 FAUST, R.A. & ALBERS, J.J. Regulated vectorial secretion of cholesteryl ester transfer protein (LTP - I) by CACO₂ model of human enterocyte epithelium. **J. Biol.Chem.**, Baltimore, v. 263, p. 8786-8789, 1988.
- 43 FIELDING, P.E. & FIELDING, C.J. A cholesteryl ester transfer complex in human plasma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, DC, v. 77, p. 3327-3330, 1980.
- 44 FISCHMAN, A.J., LEES, A.M., KOVACH, M.B., STRAUSS, H.W. Accumulation of native methylated low density lipoprotein by healing rabbit arterial wall. **Arteriosclerosis**, Dallas, v.7, p. 361-367, 1987.

- 45 FOGELMAN, A.M., SCHECHTER, I., SEAGER, J., HOKOM, M., CHILD, J.S., EDWARDS, P.A. Malondialdehyde alteration of low density lipoprotein leads to cholesteryl accumulation in human monocyte - macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington , DC, v.77, p. 2214-2218, 1980.
- 46 FORTE, T. & NICHOLS, A. Application of electron microscopy to the study of plasma lipoproteins structure. **Adv. Lipid Res.**, New York, v.10, p. 1-41, 1972
- 47 FRANCESCHINI, G. CHIESA, G., SIRTORI, C.R. Probucol increases cholesteryl ester transfer protein activity in hypercholesterolaemic patients. **Eur. J. Clin. Invest.**, Oxford, v. 21, p. 384-388, 1991.
- 48 FROSTEGARD, J., WU, R., HAEGERSTRAND, A., PATARROYO, M., LEFVERT, A.K., NILSON, J. Mononuclear leukocytes exposed to oxidized low density lipoprotein secrete a factor that stimulates endothelial cells to express adhesion molecules. **Atherosclerosis** , Shannon, v.103, p. 213-219, 1993.
- 49 GALLOU, G., RUELLAND, A., CAMPIOM, L. MANGENDRE, D., MOULLEC, C., LEGRAS, A., ALLANNIC, H., CLOAREC, L. Increase in thiobarbituric acid-reactive substances and vascular complications in type 2 diabetes mellitus. **Diabete Metab.**, v. 20, p. 258-264, 1994.
- 50 GAVISH, D., OSCHRY, Y., EISENBERG, G. In vivo conversion of human HDL₃ to HDL₂ and apo E-rich HDL₁ in the rat: effects of lipid transfer protein. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 28, p.257-267, 1987.
- 51 GAZIANO, J.M., BURING, J.E., BRESLOW, J.L., GOLDHABER, S.Z., ROSNER, B., VAN DENBURG, M., WILLIETT, W., HEUNEKENS, C.H. Moderate alcohol intake increased levels of high density

- lipoprotein and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 329 , p. 1829-1834, 1993.
- 52 GLOMSET, J.A. The plasma lecithin cholesterol acyltransferase reaction. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 9, p. 155-167, 1968.
- 53 GOLDSTEIN, J.L. & BROWN, M.S. The low density lipoprotein pathway and its reation to atherosclerosis. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 46 , p. 897-930, 1977.
- 54 GOLDSTEIN, J.L., HO, Y.K., BASSU, S.K. Binding sites of macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, DC, v.76, p. 333-337, 1979.
- 55 GORDON, J.I., SMITH, D.P., ANDY ,R., ALPERS, D.H., SCHONFELD, G., STRAUSS, A.W. The primary translation product of rat intestinal apolipoprotein AI mRNA is an unusual pre-protein. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 257, p. 971-978, 1982.
- 56 GOTTO, J.R., POWNALL H.J., HAVEL, R.J. Introduction to the plasma lipoproteins. **Methods Enzymol.**, New York, v.128, p. 3-41, 1986.
- 57 GROENER, J.E.M., van RAMSHORST, E.M., KATAN, M.B., MENSINK, R.P., van TOL, A. Diet-induced alteration in the activity of plasma lipid transfer protein in normolipidemic human subjects. **Atherosclerosis**, Shannon, v.87, p. 221-226, 1991.
- 58 GRUNDY, S.M. Pathogenesis of hyperlipidemia. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 25 , p. 1611-1619, 1984.
- 59 GUÉRIN, M., DOLPHIN, M., CHAPMAN, M.J. A new in vitro method for simultaneous evaluation of cholesteryl ester exchange and mass transfer between HDL and apoB-containing lipoprotein subspecies. **Arterioscler. Thromb.**, Dallas, v.14, p.199-206, 1994.

- 60 GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in disease process: a compilation of cause and consequence. **Free Radical Res. Commun.** v.19; p.141-158, 1993.
- 61 HA, Y.C. & BARTER, P.J. Differences in plasma cholesteryl ester transfer activity in sixteen vertebrate species. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v.71 B , p. 265-269, 1982.
- 62 HA, Y.C., CALVERT, G.D., MC INTOSH, G.D., BARTER, P.J. A physiologic role for the esterified cholesterol transfer protein: in vivo studies in rabbits and pigs. **Metabolism** , Philadelphia, v.30 , p. 380-383, 1981.
- 63 HANNUSKSELA, M., MARCEL, Y.L., KESANIEMI, Y.A. SAVOLAINEN, M.J. Reduction in the concentration and activity of plasma cholesteryl ester transfer protein by alcohol. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 33 , p. 737-744, 1992.
- 64 HAVEL, R.J. Functional activities of hepatic lipoprotein receptors. **Annu. Rev. Physiol.**, Palo Alto, v. 48, p. 119-134, 1986.
- 65 HAVEL, R.J., EDER, H.A., BRAGDON, J.H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoprotein in human serum **J. Clin. Invest.**, San Diego, v. 34, p. 1345-1353, 1955.
- 66 HAYEK, T., CHAJEK, T., WALSH, A., AGELLON, L.B., MOULIN, P., TALL, A.R., BRESLOW, J.L. An interaction between the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and apolipoprotein AI genes in transgenic mice results in a profound CETP-mediated depression of HDL cholesterol levels. **J. Clin. Invest.**, San Diego, v.90, p.505-510, 1992.
- 67 HAYEK, T., MAGOULAS, L., JIANG, X., WALSH, A., RUBIN, E., BRESLOW, J.L., TALL, A.R. Decreased early atherosclerotic lesions in

- hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. **J. Clin. Invest.**, San Diego, v. 96, p. 2071-2074, 1995.
- 68 HEINECKE, J.W., ROSE, H., CHAIT, A. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. **J. Clin. Invest.**, San Diego, v.74, p. 1890-1894, 1984.
- 69 HENRICKSEN, T., MAHHONEY, E.M., STEINBERG, D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, DC, v.78, p. 6499 - 6503, 1981.
- 70 HERZ, J., HAMANN, U., ROGNE, S., MYKLEBOST, O., GANSEPOHL, H., STANLEY, K.K. Surface location and high affinity for calcium of a 500 KD liver membrane protein closely related to LDL-receptor suggest a physiological role as a lipoprotein receptor. **Embo. J.**, Oxford, v. 7, p. 4119-4127, 1988.
- 71 HESLER, C.B., BROWN, M.L., FEUER, D., MARNE, Y.L., MILNES, R.W., TALL, A.R. Structure-function analyses of plasma cholesteryl ester transfer protein by protease digestion and expression of cDNA fragment in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 264, p. 11317-11325, 1989.
- 72 HESLER, C.B., SWENSON, T.L., TALL, A.R. Purification and characterization of a human plasma cholesteryl ester transfer protein. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 262, p. 2275-2282, 1987.
- 73 HESLER, C.B., TALL, A.R., SWENSON, T.L., WEECH, P.K., MARCEL, Y.L., MILNE, R.W. Monoclonal antibodies to the Mr 74,000 cholesteryl ester transfer protein neutralize all of the cholesteryl ester and

- triglyceride transfer activities in human plasma. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 263, p. 5020-5023, 1988.
- 74 HESSLER, J.R., ROBERTSON, A.L., CHISOLM, G.M. Low density lipoprotein induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. **Atherosclerosis**, Dallas, v. 32, p. 213-229, 1979.
- 75 HIGUCHI, K., HOSPATTANKAR, A.V., LAW, S.W., MCGLIN, N., CORTRIGH, J., BREWER, H.B. Jr. Human apolipoprotein B (apoB) mRNA: Identification of two distinct apoB mRNAs, an mRNA with the apoB-100 sequence and an apoB mRNA containing a premature in-frame translational stop codon, in both liver and intestine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, DC, v. 85, p. 1772-1776, 1988.
- 76 HIRAMATSU, K., ROSEN, H., HEINECKE, J.M., WOLFBAUER, G., CHAIT, A. Superoxide initiates oxidation of low density lipoprotein by human monocytes. **Arteriosclerosis**, Dallas, v.7, p. 55-60, 1987.
- 77 HIRANO, K.L., MATSUZAWA, Y., SAKAI, N., HIRAOKA, H., NOZAKI, S., UNAHASHI, T., YAMASHITA, S., KUBO, M., TARNIS, S. Polydisperse low density lipoprotein in hyperalphalipoproteinemic chronic alcohol drinkers in association with marked reduction of cholesteryl ester transfer protein activity. **Metabolism**, Philadelphia, v. 41, p.1313-1318, 1992.
- 78 HODIS, H.N., KRAMSCH, D.M., AVOGARO, P., BITTOLO-BON, G., CAZZOLATO, G., HWANG, J., SEVANIAM, A. Biochemical and cytotoxic characteristics of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL). **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 35, p. 669-677, 1994.
- 79 HOPPE, G., O'NEIL, J., HOFF, H.F. Inactivation of lysosomal proteases by oxidized low lipoprotein is partially responsible for its poor degradation

- by mouse peritoneal macrophages. **J. Clin. Invest.**, San Diego, v. 94, p. 1506-1512, 1994.
- 80 IHM, J., ELLSWORTH, J.L., CHATAING, B., HARMONY, J.A.K. Plasma protein facilitated coupled exchange of phosphatidylcholine and cholesteryl ester in the absence of cholesterol esterification. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 257, p. 4818-4827, 1982.
- 81 INAZU, A., BROWN, M.L., HESLER, C.B., AGELLON, L.B., KOIZUMI, J.; TAKATA, K.; MARUHAMA, Y.; MABUCHI, H.; TALL, A.R. Increased high density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl ester transfer protein gene mutation. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 323, p. 1234-1238, 1990.
- 82 JIALAL, I. & CHAIT, A. Differences in the metabolism of oxidatively modified low density lipoprotein by human endothelial cells: inhibition of cholesterol esterification by oxidatively modified low density lipoproteins. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.30, p. 562-571, 1989.
- 83 JIANG, X.C., AGELLON, L.B., WALSH, A., BRESLOW, J.L., TALL, A.R. Dietary cholesterol increases transcription of human cholesteryl ester transfer protein gene in transgenic mice: dependence on natural flanking sequences. **J. Clin. Invest.**, San Diego, v. 90, p. 1290-1295, 1992.
- 84 JIANG, X.C., MOULIN, P., QUINET, E., GOLDBERG, I.J., YACOUB, L.K., AGELLON, L.B., COMPTON, D., POLOKOFF, R., TALL, A.R. Mamalian adipose tissue and muscle are major sources of lipid transfer protein mRNA. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.266, p.4631-4639, 1991.
- 85 JORENS, P.G., ROSSENEU, M., DEVREESE, A.M., BULT, H., MARESCAU, B., HERMAN, A.G. Diminished capacity to release metabolites of nitric oxide synthase in macrophages loaded with

- oxidized low density lipoprotein. **Eur. J. Pharmacol.**, Berlin, v. 212, p. 113-115, 1992.
- 86 JOUGASAKI, M., KUGIYAMA, K., SAITO, Y., NAKAO, K., IMURA, H., YASUE, H. Suppression of endothelin-1 secretion by lysophospholipid in oxidized low density lipoprotein in cultured vascular endothelial cells. **Circ. Res.**, Dallas, v. 71, p. 614-619, 1992.
- 87 KANE, J. P. Apoprotein B : structural and metabolic heterogeneity. **Annu. Rev. Physiol.**, Palo Alto, v. 45 , p. 637- 650, 1983.
- 88 KATO, H., NAKANISHI, T., ARAI, H., NISHIDA, H.I., NISHIDA, T. Purification, microheterogeneity, and stability of human lipid transfer protein. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.264, p.4082-4087, 1989.
- 89 KAYSEN, G.A. Hyperlipidemia of chronic renal failure. **Blood Purif.**, v.12, p.60-67, 1994.
- 90 KESANIEMI, Y.A., VEGA, G.L., GRUNDY, S.M. Kinetics of apolipoprotein B in normal and hyperlipidemic men: review of current data. In: *Lipoprotein kinetics and modeling*. Edited by M.Berman. S.M. Grundy, B.V. Howard, New York: Academic Press, 1982: 181-205.
- 91 KODAMA, T., REDDY, P., KISHIMOTO, C., KRIEGER, M. Purification and characterization of a bovine acetyl low density lipoprotein receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Whashington, DC, v.85 , p. 9238-9242, 1988.
- 92 KUNITAKE, S.T., MENDEL, C.M., HENNESY, L.K. Interconversion between apolipoprotein AI containing lipoproteins of pre-beta and alpha electrophoretic mobilities. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 33, p. 1807-1816, 1992.
- 93 LAGROST, L. & BARTER, P.J. Cholesteryl ester transfer protein promotes the association of HDL apolipoproteins A-I and A-II with LDL;

- potentiation by oleic acid. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1127, p. 255-262, 1992.
- 94 LAGROST, L. Regulation of cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity: review of in vitro and in vivo studies. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1215, p. 209-236, 1994.
- 95 LaROSA, J.C., LEVY, R.I., HERBERT, P., LUX, S.E., FREDRICKSON, D.S.A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 41, p. 57-63, 1970.
- 96 LIU, K., CUDDY, T.E., PIERCE, G.N. Oxidative status of lipoproteins in coronary disease patients. **Am. Heart J.**, St Louis, v. 123, p.285-290, 1992.
- 97 LONGHEED, C. & STEINBRECHER J. **Biol. Chem.**, Baltimore, v. 271, p.11798-11805, 1996
- 98 LOTTENBERG, S.A., LOTTENBERG, A.M., NUNES, V.S., McHERSON, R., QUINTÃO, E.C.R. Plasma cholesteryl ester transfer protein concentration, high-density lipoprotein - cholesterol esterification and transfer rates to lighter density lipoproteins in the fasting state and after a test meal are similar in Type II diabetics and normal controls. **Atherosclerosis**, Shannon, 1996 in press
- 99 Lowering blood cholesterol to prevent heart disease. **J. Amer. Med. Assoc.** (JAMA) - Chicago, v. 253, p. 2080-2086, 1985.
- 100 LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDAL, L.R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.193, p. 265-275, 1951.
- 101 LUND-KATZ, S., HAMMERSCHLAG, B., PHILLIPS, M.C. Kinetics and mechanism of free cholesterol exchange between human serum high and

- low density lipoproteins. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 21, p. 2964-2969, 1982.
- 102 MAHLEY, H.W., HUI, D.Y., INNERARITY, T.L. BELSIEGEL, U. Chylomicron remnant metabolism - role of hepatic lipoprotein receptors in mediating uptake. **Arteriosclerosis**, Dallas, v.9 (suppl. 1), p. 114-118, 1989.
- 103 MAHLEY, H.W., INNERARITY, T.L., WEISGRABER, K.H., HO, Y.K. Altered metabolism (in vivo and in vitro) of plasma lipoproteins after selective chemical modifications of lysine residues of apoproteins. **J. Clin. Invest.**, San Diego, v. 64, p. 743-750, 1979.
- 104 MANN, C.J., YEN, F.T., GRANT, A.M., BIHAIN, B.E. Mechanism of plasma cholesteryl ester transfer in hypertriglyceridemia. **J. Clin. Invest.**, San Diego, v. 88, p. 2059-2066, 1991.
- 105 MAROTTI, K.R., CASTLE, C.K., BOYLE, T.P., LIN, A.H., MURRAY, R.W., MELCHIOR, G.W. Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. **Nature**, London, v. 364, p. 73-75, 1993.
- 106 MAROTTI, K.R., CASTLE, C.K., MURRAY, R.W., REHBERG, E.F., POLETES, H.G., MELCHIOR, G.W. The role of cholesteryl ester transfer protein in primate apolipoprotein AI metabolism: insights from studies with transgenic mice. **Arterioscler. Thromb.**, Dallas, v.12, p. 736-744, 1992.
- 107 MASSON, D., ATHIAS, A., LAGROST, L. Evidence for electronegativity of plasma high density lipoprotein - 3 as one major determinant of human cholesteryl ester transfer protein activity. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.37, p.1579-1590, 1996.

- 108 MATSUMOTO, A., NAITO, M., ITAKURA, H., IKEMOTO, S., ASAOKA, H., HAYAKAWA, I., KANAMORI, H., ABURATANI, H., TAKAKU, F., SUZUKI, H., KOBARI, Y., MIYAI, T., TAKAHASHI, K., COHEN, E.H., WINO, R., HOUSMAN, D.E., KODAMA, T. Human macrophage scavenger receptors: primary structure expression and localization in atherosclerotic lesions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, DC, v. 87, p. 9133-9137, 1990.
- 109 MC CLOSKEY, H.M., ROTHBLAT, G.H., GLICK, J.M. Incubation of acetylated low density lipoprotein with cholesterol rich dispersions enhances cholesterol uptake by macrophages. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 91, p. 320-327, 1987.
- 110 MC PHEARSON, R., MANN, C.J., TALL, A.R., HOGNE, M., MARTIN, L., MILNE, R.V., MARCEL, Y.M. Plasma concentration of cholesteryl ester transfer protein in hiperlipoproteinemia. **Arterioscler. Thromb.**, Dallas, v.19, p. 797 - 804, 1991
- 111 MILLIKEN, G.A. *Analysis of messy data*. Ed. Van Nostrand Reinhold Company, 1984, 473 p.
- 112 MONTGOMERY, D.C. *Design and analysis of experiments*. 3^a ed. Ed. John Wiley & Sons, 649 p., 1991.
- 113 MORTON, R.E. & STEINBRUNNER, A. Determination of lipid transfer inhibitor protein activity in human lipoprotein -deficient plasma. **Arterioscl.Thromb.** 13 : 1843-1851, 1993.
- 114 MORTON, R.E. & ZILVERSMIT, D.B. Purification and characterization of lipid transfer protein(s) from human lipoprotein-deficient plasma. **J. Lipid Res.**, Bethesda. v. 23 p. 1058-1067, 1982.
- 115 MOULIN, P., BOURDILLON, M.C., de PARSCAU, L., PERROT, L., POSIN, G., BERTHEZENE, F. High density lipoprotein alterations

- induced by bezafibrate in healthy male volunteers. **Atherosclerosis**, Shannon, v. 67, p.17-22, 1987.
- 116 MYANT, N.T. Cholesterol metabolism, LDL and the LDL receptor. San Diego Academic Press., 1990, 465 p.
- 117 NAGELKERKE, J.F., BARTO, K.P., BERKEL, T.J. In vivo and in vitro uptake degradation of acetylated low density lipoprotein by rat endothelial Kupffer and parenchymal cells. **J. Biol. Chem.** , Baltimore , v.258 , p.1221-1227, 1983.
- 118 NERENBERG, S.T. *Diagnostico electroforetico - Técnicas de laboratorio y su aplicación clínica*, Buenos Aires: Ed. Medica Panamericana, 1975. p.92-98.
- 119 NEWNHAM, H.A.I. & ZILVERSMIT, J.B. Quantitative aspects of cholesterol flux in rabbit atheromatous lesions. **J. Biol. Chem**, Baltimore, v.237 , p. 2078 - 2084, 1962.
- 120 NICHOLS, A.V. & SMITH, L. Effect of very low density lipoproteins on lipid transfer in incubated serum. **J.Lipid Res.** Bethesda, v.6, p.206-219, 1965.
- 121 NISHIDA, H.I., ARAI, H., NISHIDA, T. Cholesterol ester transfer mediated by lipid transfer protein as influenced by changes in the charge characteristics of plasma lipoproteins. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.268, p. 16352-16360, 1993
- 122 OLIVEIRA, H.C.F., MA, L., MILNE, R., MARCOVINA, S., INAZU, A., MABUCHI, H.; TALL, A.R. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity enhances plasma cholesteryl ester formation : studies in CETP transgenic mice and human genetic CETP deficiency - **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, in press, 1996.

- 123 OSWALD, B. & QUAFORDT, S. Effect of apo E on triglyceride emulsion interaction with hepatocyte and hepatoma E₂ cells. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 28, p. 798-809, 1987.
- 124 PALINSKI, W., ROSENFELD, M.E., YIA-HERTTUALA, S., GURTNER, G.C., SOCHER, S.S., BUTLER, S.W., PARTHASARATHY, S., CAREW, T.E., STEINBERG, D., WITZTUM, J.L. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification "in vivo". **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, DC v.86, p. 1372 - 1376, 1989.
- 125 PARTHASARATHY, S., BARNETT, J., FONG, L.G. High density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low density lipoprotein. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1044, p. 275-283, 1990.
- 126 PARTHASARATHY, S., PRINTZ, J.D., BOYD, D., JOY, L., STEINBERG, D. Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. **Arteriosclerosis**, Dallas, v. 6, p. 505-510, 1986.
- 127 PATSCH, J.R., KARLINAR, J.B., SCOTT, L. W., GOTTO Jr., A.M. Inverse between blood levels of high density lipoprotein subfraction 2 and magnitude of postprandial lipemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, DC, v. 80, p. 1449-1453, 1983.
- 128 PATTNAIK, N.M., MONTES, A., HUGHEES, L.B., ZILVERSMIT, D.B. Cholesteryl ester exchange protein in human plasma. Isolation and characterization. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam. v. 530, p. 428-438, 1978.
- 129 PITTAS, R.E.; Expression of the acethyl low density lipoprotein receptor by rabbit fibroblasts and smooth muscle cells. Upregulation by phorbol esters. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, p. 12722-12727, 1990.

- 130 PLUMP, A.S., ERICKSON, S.K., WENG, W., PARTIN, J.S., BRESLOW, J.L., WILLIAMS, D.L. Apolipoprotein AI is required for cholesteryl ester accumulation in steroidogenic cells and for normal adrenal steroid production. **J. Clin. Invest.**, San Diego, v. 97, p. 2660-2671, 1996.
- 131 PUHL, H., WAEG, G., ESTERBAUER, H. Methods to determine oxidation of low density lipoprotein. In **Methods Enzymol.**, New York, v. 233, p. 433-441, 1986.
- 132 QUINET, E., AGELLON, L., MARCEL, Y., MILNE, R., KROON, P., TALL, A.R. Atherogenic diet increases cholesteryl ester transfer protein mRNA in rabbit liver. **J. Clin. Invest.**, San Diego, v. 85, p. 357-363, 1990.
- 133 QUINTÃO, E.C.R., OLIVEIRA, H.C.F., ZERBINATTI, C.V. Apolipoproteínas plasmáticas e aterosclerose. **Rev. Bras. Med.**, São Paulo, v. 46, p. 66-71, 1989.
- 134 QUINTÃO, E.C.R. Is reverse cholesterol transport a misnomer for suggesting its role in the prevention of atheroma formation? **Atherosclerosis**, Shannon, v. 116, p. 1-14, 1995.
- 135 RABINI, R.A., FUMELLI, P., GALLASI, R., DOUSSET, N., TAUS, M., FERRETTI, G., MAZZANTI, L., CURATOLA, G., SOLERA, M.L. Increase susceptibility to lipid oxidation of low-density lipoproteins and erythrocyte membranes from diabetic patients. **Metabolism**, Philadelphia, v.43, p. 1470-1474, 1994.
- 136 RAJARAM, O.V., WHITE, G.H., BARTER, P.J. Partial purification and characterization of a triacylglycerol transfer protein from rabbit serum. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 617, p. 383-392, 1980.
- 137 REDGRAVE, T.G. & SMALL, D.M. Quantification of the transfer of surface phospholipid of chylomicron to the high density lipoprotein

- fraction during the catabolism of chylomicron in the rat.. **J. Clin. Invest.**, San Diego, v. 64, p. 162-171, 1979.
- 138 REICHL, D. & MILLER, N.E. Pathophysiology of reverse cholesterol transport. **Arteriosclerosis**, Dallas, v. 9, p. 785-797, 1989.
- 139 REID, V.C., MITCHINSON, M.J., SKEPPER, J.N. Cytotoxicity of oxidized low density lipoprotein to mouse peritoneal macrophages: an ultrastructural study. **J. Pathol.**, Sussex, Eng, v. 171, p. 321-328, 1993.
- 140 Report of the National Cholesterol Education Program Expert Pannel of Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. **Arch. Inter. Med.**, Chicago, v. 148, p. 36-69, 1988.
- 141 RIFICI, R. & KHACHADURIAN, A. Oxidation of high density lipoproteins: characterization and effects on cholesterol efflux from J774 macrophages. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1299, p. 87-94, 1996.
- 142 RIMM, E.B., STAMPFER, M.J., ASCHERIO, A., GROVANUCCI, E., COLDITZ, G.A., WILLET, W.C. Vitamin E consunption and the risk of coronary heart disease. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.328, p. 1450-1456, 1993.
- 143 RITSCH, A., ANER, B., FOGER, B., SCHWARZ, S., PATSCH, J.R. Polyclonal antibody-based immunoradiometric assay for quantification of cholesteryl ester transfer protein. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 34 , p. 673-679, 1993.
- 144 ROSENFELD, M.E., TSUKADA, T., GOW, A.M., ROSSO, R. Fatty streak initiation in fat-fit rabbits. **Arteriosclerosis**, Dallas, v.1, p. 9-23, 1987.
- 145 RUDLING, M.J., REINHER, E., EINARSO, K., EWERTH, S., ANGELLON, B. Low density lipoprotein receptor binding activity in human tissue: quantitative importance of hepatic receptors and evidence

- for regulation of their expression "in vivo". **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, DC, v. 87, p. 3469-3473, 1990.
- 146 SALONEN, J.T., YLA-HERTUALA, S., YAMAMOTO, R., BUTLER, S., KORPELA, H., SALOMEN, R., NYSSONEN, K., PALINSKI, W., WITZTUM, J.L. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. **Lancet**, London, v.339, p. 883-887, 1992.
- 147 SCHAEFER, E.J., ORDOVAS, J.M., LAW, S.M., GHISELLI, G., KASHYAP, M.L., SRIVASTAVA, L.S., HEATON, W.H., ALBERS, J.J., CONNOR, W.E., LINDGREN, F.T., LEMESHEV, Y., SEGREST, J.P., BREWER, H.B. Familial apolipoprotein AI and CIII deficiency, variant II. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 26, p. 1089 - 1101, 1985.
- 148 SEIP, R.L., MOULIN, P., COCKE, T., TALL, A.R., KOHRT, W.M., OSTLUND, R., SCHONFELD, G. Exercise training induces falls in cholesteryl ester transfer protein. **Arterioscler. Thromb.**, Dallas, v. 13, p. 1359-1367, 1993.
- 149 SERRAT-SERRAT, J., ORDONEZ-LLANOS, J., SERRA-GRANA, R., GOMEZ-GERIQUE, J.A., PELLICER-THOMA, E., PAYES-ROMERO, A; GONZALEZ-SASTRE, F. Marathon runners presented lower serum cholesteryl ester transfer activity than sedentary subjects. **Atherosclerosis**, Shannon, v. 101, p. 43-49, 1993.
- 150 SHAMBUREK, R.D., NISHIWAKI, M., ISHIKAWA, T., NAKAMURA, H., IKEWAKI, K., ZECH, L.A., RADER, D.J., BREWER Jr, H.B., SCHWATZ, C.C. Cholesteryl ester transfer protein deficiency: In vivo metabolism of free and esterified cholesterol. **Circulation**, Dallas, v. 88, p. 65-75, 1993.

- 151 SHIREMAN, R. Formation, metabolism and physiologic effects of oxidatively modified low density lipoprotein. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 126, p. 1049S-1052S, 1996.
- 152 SON, Y.S.C. & ZILVERSMIT, D.B. Purification and characterization of human plasma proteins that inhibit lipid transfer activity. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 795, p. 473-480, 1984 a.
- 153 SON, Y.S.C. & ZULVERSMIT, D.B. Increase lipid transfer activities in hyperlipidemic rabbit plasma. **Arteriosclerosis**, Dallas, v. 6, p. 345-351, 1986 b.
- 154 SOUTAR, A.K., GAMER, C.W., BAKER, H.N., SPARROW, J.T., JACKON, R.L., GOTTO Jr., A.M.; SMITH, L.C. Effect of the human apoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on the activity of lecithin cholesterol acyltransferase. **Biochemistry**, Washington, DC, v.14, p. 3057- 3064, 1975.
- 155 SPARROW, C.P., PARTHASARATHY, S., STEINBERG, D.J.A. macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 264, p. 2599-2604, 1989.
- 156 STANGE, E.F. & DIESTCHY, J. M. Age -related decreases in tissue sterol acquisition are mediated by changes in cholesterol synthesis and not low density lipoprotein uptake in the rat. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 25, p. 703-712, 1984.
- 157 STEIN, O. & STEIN, Y. Bovine aortic endothelial cells display macrophage-like properties towards acetylated ¹²⁵I - labelled low density lipoprotein. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 620, p. 631-635, 1980.

- 158 STEINBERG, D. Lipoproteins and atherosclerosis: a look back and a look ahead. **Arteriosclerosis**, Dallas, v. 3, p. 283-301, 1983.
- 159 STEINBERG, D. LDL oxidation and atherogenesis - Proceedings of the 9th International symposium on Atherosclerosis - **Atherosclerosis IX**, Shannon , v.321-p.323, 1991.
- 160 STEINBERG, D., PARTHASARATHY, S., CAREW, T.E., KHOO, J.C., WITSTUM, J.L. Beyond cholesterol modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.320, p. 915-924, 1989.
- 161 STEINBRECHER, U.P., PARTHASARATHY, S., LEAKE, D.S., WITZTUM, J.L., STEINBERG, L. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington ,DC, v. 83, p. 3883- 3894, 1984.
- 162 STEINBRECHER, U.P. & WITZTUM, J.L. Glucosylation of low density lipoproteins to an extent comparable to that seen in diabetes slows their catabolism. **Diabetes**, Alexandria, VA, v. 33, p. 130-134, 1984.
- 163 STEINER, G. Triglyceride rich lipoproteins and atherosclerosis, from fast to feast. **Ann. Intern Med.**, Chicago, v. 25, p. 431- 435, 1993.
- 164 STRINGER, M.D., GOROG, P.G., FREEMAN, A., KAKKAR, V.V. Lipid peroxides and atherosclerosis. **Br. Med. J.**, London, v. 298, p. 281-284, 1989.
- 165 TALL, A.R. Plasma lipid transfer protein. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 27, p. 361-367, 1986.
- 166 TALL, A.R. Plasma high density lipoproteins - metabolism and relationship to atherogenesis. **J. Clin. Invest.**, San Diego, v. 86, p. 379-384, 1990.

- 167 TALL, A.R., ABREU, E., SHUMAN, J. Separation of plasma phospholipid transfer protein from cholesterol ester/phospholipids exchange protein. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 258, p. 2174-2180, 1983.
- 168 TALL, A.R., GREEN, P.H.R., GLICKMAN, R.M. Metabolic fate of chylomicron phospholipids and apoprotein in the rat. **J. Clin. Invest.**, San Diego, v. 64, p. 977-989, 1979.
- 169 TALL, A.R., SAMML, H.D., GRANOT, E.; Mechanisms of entranced cholesteryl ester transfer from high density lipoproteins to apolipoprotein B- containing lipoproteins during alimentary lipemia. **J. Clin. Invest.**, San Diego, v. 77, p. 1163-1172, 1986.
- 170 TALL, A.R., SWENSON, T., HESSLER, C., GRANOT, E. Mechanisms of facilitated lipid transfer mediated by plasma lipid transfer proteins. In: *Plasma Lipoproteins*. Ed. A.M. Gotto Jr.. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1987, p. 277-297.
- 171 TATO, F., VEGA, G.L., GRUNDY, S.M. Prevalence of high activity of cholesteryl ester transfer protein (CETP) in hypoalphalipoproteinemia. **Clin. Res.**, New York, v. 42, p. 198 A, 1994.
- 172 TERPSTRA, A.H.M., NICOLosi, R.J., HERBERT, P.N.. In vitro incorporation of radiolabeled cholesteryl esters into high and low density lipoproteins. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.30, p.1663-1671, 1989.
- 173 VAN HINSBERG, V.W., SCHEFFER, M., HAVEKES, L., KEMPEN, H.J. Role of endothelial cells and their products in the modification of low density lipoproteins. **Biochem. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 878, p. 49-64, 1986.
- 174 VAN LETEN, B.J., PRIEVE, J., NAVAB, M., HAMA, S., LUSIS, A.J., FOGELMAN, A.M. Lipid induced changes in intracellular iron

- homeostasis in vitro and in vivo. **J. Clin. Invest.**, San Diego, v. 95, p. 2104-2110, 1995.
- 175 WETTERAN, J.R. & ZILVERSMIT, D.B. Localization of intracellular triacylglycerol and cholesteryl ester transfer activity in rat tissues. **Biochim. Biophys. Acta** , Amsterdam, v. 875, p. 610-617, 1986.
- 176 WISEMAN, S.A., MATHOT, J.N., FOUW, N.J., TIJUBURG, L.B.M. Dietary non-tocopherol antioxidants present in the extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. **Atherosclerosis**, Shannon, v. 120, p. 15-23, 1996.
- 177 YEN, F.T., DECKELBAUM, R.J., MANN, C.J., MARCEL, Y.L., TALL, A.R. Inhibition of cholesteryl ester transfer protein activity by monoclonal antibody. Effects on cholesteryl ester formation and neutral lipid mass transfer in human plasma. **J. Clin. Invest.**, San Diego, v. 83, p. 2018-2024, 1989.
- 178 ZANNIS, V.I., LEES, A.M., LEES, R.S., BRESLOW, J.L. Abnormal apoprotein AI isoprotein composition in patients with Tangier disease. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. **257** , p. 4976-4980, 1982.
- 179 ZAWADSKI, Z., MILNE, R.W., MARCEL, Y.L. Cu^{2+} - mediated oxidation of dialyzed plasma: effects on low and high density lipoproteins and cholesteryl ester transfer protein. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.32, p.243-250, 1991.
- 180 ZHONG, S., SHARP, D.S., GROVE, J.S., BRUCE, C. YANO, K., CURB, J.D., TALL, A.R. Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene. **J. Clin. Invest.**, San Diego, v.97, p.2917-2923, 1996.
- 181 ZILVERSMIT, D.B. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. **Circulation**, Dallas, v 60, p. 473-484, 1979.

- 182 ZILVERSMIT, D.B. Lipid transfer proteins. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 25, p. 1563-1569, 1984.
- 183 ZILVERSMIT, D.B., HUGHES, L.B., BALMER, J. Stimulation of cholesterol ester exchange by lipoprotein - free rabbit plasma. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 409, p. 393-398, 1975.