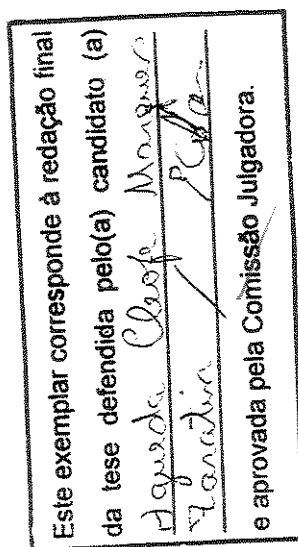


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Águeda Cleofe Marques Zaratín

**METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS EM TABAGISTAS:
PROTEÍNAS REGULADORAS E MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DAS
LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE**

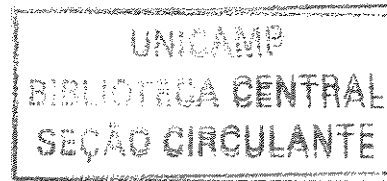


Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do
Título de Doutor em Biologia
Funcional e Molecular na área
de Bioquímica

Orientador: Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria

2001

i



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE 80
Nº CHAMADA TV UNICAMP
Z18m
V EX
TOMBO BC/ 50862
PROC 16.837/02
C DX
PREÇO 12\$11,00
DATA 12/09/02
Nº CPD

CM00173056-6

BIB ID 256986

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Z18m **Zaratin, Águeda Cleofe Marques**
Metabolismo de lipoproteínas plasmáticas em tabagistas: proteínas reguladoras e modificações químicas das lipoproteínas de baixa densidade/Águeda Cleofe Marques Zaratin.—
Campinas, SP: [s.n.], 2001

Orientadora: Eliana Cotta de Faria
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1. Fumo. 2. Lipoproteínas de alta densidade. 3. Aterosclerose.
4. Lipase hepática. I. Faria, Eliana Cotta de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

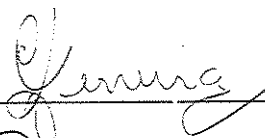
Data da Defesa: 10/12/2001

Banca Examinadora

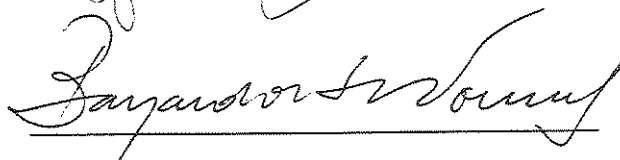
Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria (*Orientadora*)



Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira



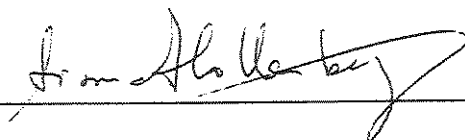
Prof. Dr. Bayardo Baptista Torres



Profa. Dra. Lúcia Nassi Castilho



Prof. Dr. Simão Augusto Lottenberg



Profa. Dra. Nilce Corrêa Meirelles

Profa. Dra. Patrícia da Silva Mello

Dedico este trabalho ao **David** e
aos meus filhos: **Rafael, Arthur,**
Leonardo e Paulo José, por todo
amor, paciência e carinho

Aos meus pais, **Zuza e Denil**,
que sempre foram o meu apoio e a
minha segurança

Aos meus irmãos... sempre
ao meu lado

À **Deus**, fonte segura de
Paz, Alegria e Força durante o meu
caminhar...

AGRADECIMENTOS

- À **Profª. Drª. Eliana Cotta de Faria**, que sempre acreditou no meu trabalho e dedicou com grande empenho seu tempo e sua experiência na execução desta tese.
- Aos colegas do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental.
- Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Clínica do Hospital das Clínicas.
- A todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Bioquímica.
- Aos colegas do Laboratório de Lípidos, da Faculdade de Ciências Médicas – USP.
- A todos que contribuíram para a realização de partes deste trabalho.
- Aos meus **bons amigos** que sempre estiveram ao meu lado, torcendo por mim.
- Aos voluntários, cuja participação foi fundamental para a realização deste trabalho.
- À FAPESP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	01
1.1. ATHEROSCLEROSE.....	02
1.2. ATHEROSCLEROSE E TABAGISMO.....	06
1.3. METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS.....	15
1.4. LIPOPROTEÍNAS MODIFICADAS E TABAGISMO.....	32
1.5. LIPASES, ÁCIDOS GRAXOS LIVRES E TABAGISMO.....	34
1.6. ESTERIFICAÇÃO DO COLESTEROL LIVRE PLASMÁTICO E TABAGISMO.....	36
1.7. TRANSFERÊNCIA DE COLESTERIL ÉSTERES (CETP) E DE FOSFOLÍPIDES (PLTP) ENTRE AS LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS, PROTEÍNA INIBIDORA DA TRANSFERÊNCIA DE LÍPIDES, NÍVEIS PLASMÁTICOS DE FOSFOLÍPIDES E TABAGISMO.....	37
1.8. SUBFRAÇÕES DE HDL E TABAGISMO.....	39
1.9. LIPOPROTEÍNA (a) E TABAGISMO.....	40
2. OBJETIVOS.....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43

4. RESULTADOS	
1º Trabalho.....	54
2º Trabalho.....	69
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	77
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL; FFA – Ácidos graxos livres

Anti-LDL-OX; OX-LDL Ab – Anticorpos anti LDL oxidada

Apo – Apolipoproteínas

BMI – Índice de massa corpórea

CD-36 – Receptor de varredura classe B

CD-68 - Receptor de varredura

CETP – Proteína de transferência de colesterol éster

CO – Monóxido de carbono

Col; chol – Colesterol

CE – Colesterol-éster

CL; UC – Colesterol livre

DAC; CAD – Doença arterial coronariana

FL; PL - Fosfolípidos

GRO-KC – Fator de crescimento oncogênico

HDL - Lipoproteínas de densidade alta

HDL₂ – subfração (2) das lipoproteínas de densidade alta

HDL₃ – subfração (3) das lipoproteínas de densidade alta

IDL - Lipoproteínas de densidade intermediária

KBr – Brometo de potássio

LCAT – Lecitina:colesterol acil transferase

LDL – Lipoproteínas de densidade baixa

LDL-OX; OX-LDL – LDL oxidada

LH; HL – Lipase hepática

LLP; LPL – Lipoproteína lipase

Lp(a) – Lipoproteína (a)

LTIP – Proteína inibidora da transferência de lípidos

M-CSF – Fator estimulador de colônias de monócitos

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

MM-LDL-OX – LDL minimamente oxidada

MPC-1 – Proteína quimiotática para monócitos

NO – Óxido nítrico

PAI-1 – inibidor ativador do plasminogênio

PLTP – Proteína de transferência de fosfolípidos

QM - Quilomícrons

RM - Remanescentes

SR-A – Receptor de varredura classe A

SRB-I – Receptor de varredura

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

VLDL – Lipoproteínas de densidade muito baixa

RESUMO

RESUMO

A aterosclerose é uma doença imuno-inflamatória e de caráter multifatorial. O tabagismo é um de seus principais fatores de risco, existindo grande controvérsia na literatura quanto aos mecanismos fisiopatológicos de sua aterogenicidade. Avaliamos os efeitos metabólicos e oxidantes do fumo em uma população sadia adulta, composta de fumantes crônicos moderados. Não fumantes, de ambos os sexos também foram estudados.

Para a avaliação dos efeitos metabólicos do tabagismo determinamos a composição química de sub-frações da lipoproteína de alta densidade, as atividades da lipoproteína lipase (LPL), da lipase hepática (LH), da lecitina:colesterol acil transferase (LCAT), da proteína de transferência de colesterol-éster (CETP), da proteína inibidora da transferência de lípidos (LTIP) e da proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP). A massa de CETP também foi determinada.

Observamos aumento de fosfolípidos da sub-fração de lipoproteínas de alta densidade, HDL₃-PL, e redução da atividade de diversas proteínas envolvidas no transporte reverso do colesterol: LH, PLTP e CETP (corrigida por triglicérides). Não observamos modificações em LCAT, LPL e LTIP. Sugerimos que a menor atividade destas proteínas reduz o transporte de colesterol para o fígado, assim como a geração de lipoproteínas imaturas aceptoras do colesterol livre proveniente dos tecidos periféricos.

Para a avaliação dos efeitos oxidantes do tabagismo, a susceptibilidade da lipoproteína de baixa densidade (LDL) à oxidação e a medida de auto-anticorpos contra LDL-oxidada foram determinados.

A oxidabilidade não se mostrou diferente entre os grupos, porém os níveis de anti LDL-oxidada foram significativamente menores nos fumantes, diferença explicada pelas mulheres fumantes. Estes resultados sugerem um aumento nos níveis de LDL oxidada e formação de imunocomplexos.

À parte destes achados, o tabagismo provocou mudanças na pressão arterial e aumento nos níveis de fibrinogênio plasmático.

Com base nestes resultados, sugerimos que a aterogenicidade do fumo se deva, em parte, à maior oxidação das lipoproteínas plasmáticas, à redução no transporte do colesterol livre dos tecidos periféricos para o fígado, a variações da pressão arterial e à tendência a um estado de pró-coagulabilidade.

ABSTRACT

ABSTRACT

Atherosclerosis is a multifactorial immuno-inflammatory disease. One of its main risk factors is smoking. There is a great deal of controversy in the literature regarding the physiopathological mechanisms of the atherogenicity of cigarette smoking.

The metabolic and oxidizing effects of smoking were studied in a healthy adult population that consisted of moderate chronic smokers and non-smokers from both sexes.

In order to assess the metabolic effects of smoking, the chemical composition the sub-fractions of high-density lipoproteins (HDL), lipoprotein lipase (LPL), hepatic lipase (HL), lecithin:cholesterol acyl transferase (LCAT), cholesteryl-ester transfer protein (CETP), lipid transfer inhibiting protein (LTIP) and phospholipid transfer protein (PLTP) were determined. The CETP mass was also measured.

An increase in the phospholipids of the sub-fraction of high-density lipoproteins, HDL₃-PL, and a reduction in the activity of various proteins involved in reverse cholesterol transport: LH, PLTP, and CETP (when corrected by triglyceride) were observed. No modifications were observed in LCAT, LPL and LTIP.

The authors suggested that the diminished activity of those proteins reduced the transport of cholesteryl ester to the liver, as well as the generation of immature high-density lipoproteins, the free cholesterol acceptors in the peripheral tissues.

The oxidizing effects of smoking were assessed by determining the susceptibility of low-density lipoproteins (LDL) to oxidation as well as the presence of auto-antibodies against oxidized LDL.

The oxidation did not differ between the groups. However, the anti-oxidized LDL levels were significantly lower in smokers, by the female smokers group. These results suggest an increase in oxidized LDL levels resulting in the formation of immune-complexes.

Besides these findings, smoking produced alterations in the blood pressure and an increase in the plasma fibrinogen levels.

Based on the results obtained in this study, we suggest that atherogenesis caused by smoking is partly due to greater oxidation of plasma lipoproteins, reduction in the transport of free cholesterol from the peripheral tissues to the liver, alterations in the blood pressure and a tendency towards a state of pro-coagulability.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. ATEROSCLEROSE

A aterosclerose é considerada uma resposta à tensão sobre a camada íntima arterial de caráter imuno e inflamatório ou de cicatrização. Esta teoria formulada por Ross em 1973 (Ross & Glomset, 1973) tem sido continuamente atualizada (Ross & Glomset, 1976; Ross, 1993; Ross, 1998).

A hipótese postulada por Rokitsansky e Virchow, posteriormente modificada por French, sugere que a lesão aterosclerótica representa uma resposta protetora contra o processo inflamatório da parede arterial lesada (Ross, 1993).

A disfunção endotelial mais incipiente se desenvolve no endotélio ainda intacto com o aumento da adesão de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e monócitos circulantes. Estas alterações estão associadas à hipercolesterolemia, **tabagismo**, hipertensão arterial e mecanismos imunológicos e inflamatórios (Liao, 1998). A disfunção endotelial estabelecida se manifesta por vasoconstrição e aumento da permeabilidade do endotélio (Ross, 1998).

O endotélio vascular possui importantes e múltiplas funções, dentre as quais destacam-se: a função de proteção mecânica interna do vaso; a regulação do seu calibre e do fluxo sanguíneo local; a função anti-trombogênica, a de anti-coagulação e a imunológica. (Ross, 1993).

O endotélio sintetiza moléculas mediadoras humorais, as citocinas, os fatores de crescimento e substâncias vasodilatadoras (Ross, 1998).

A lesão aterosclerótica inicia-se com o acúmulo focal de monócitos circulantes que aderem à superfície endotelial e migram entre as células endoteliais, entrando no espaço sub-endotelial onde são convertidos em macrófagos (Batlouni, 1997).

As partículas de LDL atravessam as células endoteliais intactas por transporte vesicular (transcitose), o qual não requer receptores. A magnitude desse transporte é concentração-dependente. LDL nativas são reconhecidas e não se acumulam em quantidade apreciável nos macrófagos (Schenke, 1989), portanto, a partícula deve ser modificada quimicamente para que seja captada pelos receptores *scavenger*. As células endoteliais e musculares lisas, e também os macrófagos, secretam produtos oxidativos por múltiplas vias metabólicas, os quais se difundem para as LDL aprisionadas no espaço subendotelial e iniciam a sua oxidação (figura 1, adaptado de Ross, 1998). Esta começa nos ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípidos da superfície de LDL e se propaga aos lípidos do núcleo da partícula, resultando em modificação oxidativa tanto dos ácidos graxos poliinsaturados, como do colesterol e fosfolípidos e, finalmente, modificação e degradação da apolipoproteína B (Steinbrecher, 1989).

As LDL oxidadas (não as nativas) são potentes fatores quimiotáticos positivos para monócitos e, ao mesmo tempo, são inibidoras da mobilidade do macrófago. Em ambos os casos, o componente ativo está localizado na fração lipídica das LDL oxidadas (Steinbrecher et al., 1984). As LDL oxidadas, por serem altamente citotóxicas, podem

induzir a alterações funcionais nas células endoteliais que favorecem a penetração dos monócitos ou facilitam o movimento de mais LDL para o espaço subendotelial, acelerando assim, a formação das estrias gordurosas. Além disso, a citotoxicidade das LDL oxidadas é suficiente para promover a perda de células endoteliais da superfície de estrias gordurosas já estabelecidas (Steinberg et al., 1989).

Os macrófagos reconhecem então estas partículas e as captam, originando as *foam cells*. Nesta etapa ocorre a liberação de enzimas hidrolíticas, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. O recrutamento de monócitos é contínuo e as células do músculo liso migram para o interior da camada íntima (figura 1, adaptado de Ross, 1998). Como o ciclo de interações continua, as placas evoluem de estrias gordurosas para uma lesão fibrótica. As *foam cells* começam a necrosar provavelmente por causa da citotoxicidade do acúmulo lipídico; em continuidade há a formação de cristais de colesterol. As *foam cells* necrosadas migram para o espaço extracelular, acompanhadas da síntese de colágeno e maior proliferação e migração das células musculares lisas. As placas fibrosas podem sofrer ruptura seguida de hemorragia e trombose, transformando-se na lesão aterosclerótica complicada (Lusis, 2000) (figura 1, adaptado de Ross, 1998).

Endotelial na Aterosclerose

A primeira modificação que precede a formação das lesões da aterosclerose ocorre no endotélio. Estas modificações incluem aumento da permeabilidade do endotélio às lipoproteínas e outros constituintes plasmáticos.

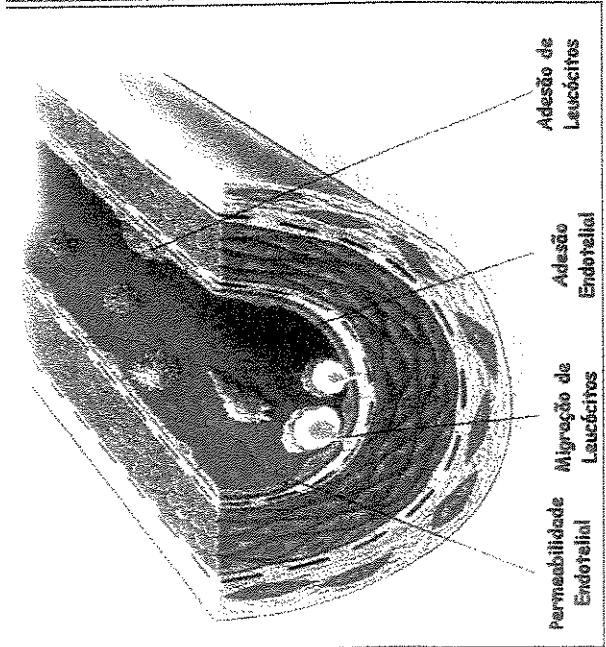
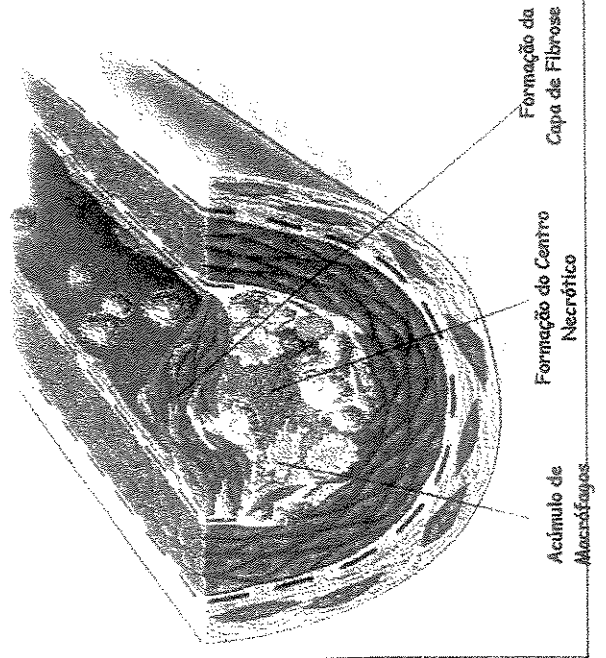
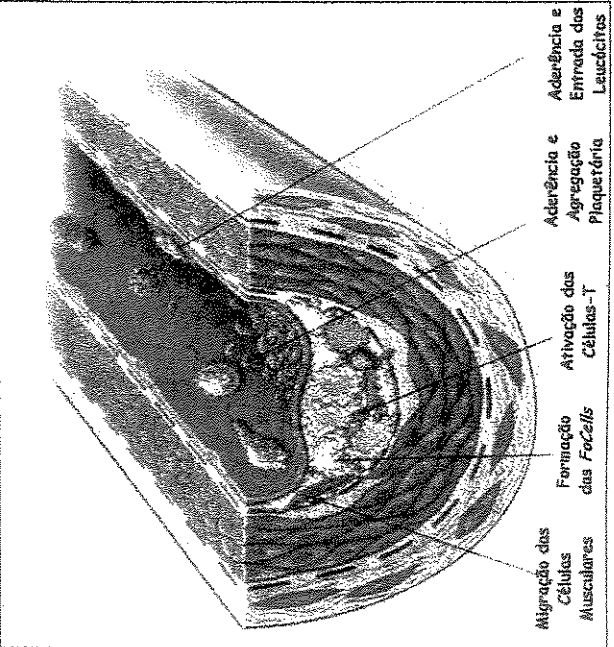


Figura 2B - Formação das Estrias de Gordura

As estrias de gordura consistem de lipídios carregados de monócitos e macrófagos juntamente com linfócitos-T. Neste processo inclui migração das células musculares, ativação das células-T, formação e aderência dos foam-cells e agregação plaquetária.



de uma Avançada e Complicada Lesão Aterosclerótica

Como as estrias de gordura progredem para a intermediária e avançada lesão, elas tendem a formar uma capa fibrótica, composta de mistura de leucócitos e lipídios. Isto representa um tipo de resposta ao processo lesado.

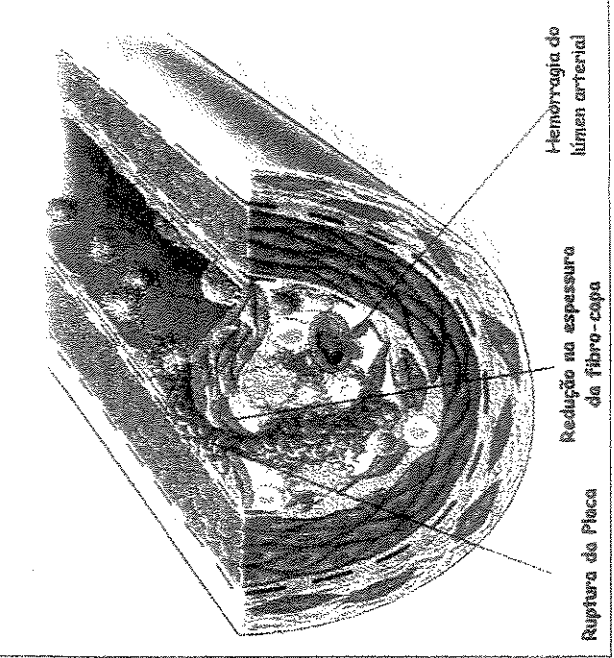


Figura 2D - Fibro-Placas na Aterosclerose

A ruptura da fibra-capla ou ulceração pode rapidamente levar à trombose promovendo a lesão avançada.

1.2. ATEROSCLEROSE E TABAGISMO

Juntamente com o tabagismo, a hipercolesterolemia e mais recentemente, a hipertrigliceridemia e a hipertensão arterial são reconhecidos como os mais importantes fatores responsáveis pelo aumento da incidência mundial da doença cardiovascular aterosclerótica documentada nas últimas décadas (Witteman et al., 1993).

O risco de DAC em indivíduos fumantes chega a ser 2-4 vezes maior do que em não fumantes e este risco cresce à medida que outros fatores de risco são adicionados (Lakier, 1992).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, quando se observa a mortalidade em âmbito mundial, vê-se um quadro bem dramático: nas décadas de 1930 a 1950, um milhão de tabagistas morreram e esta mortalidade foi se elevando a ponto de serem registrados 17 milhões de mortes por doenças tabaco-relacionadas de 1980 a 1989 (São Paulo, 1995). Atualmente, o número de óbitos chega a 3 milhões de pessoas/ano no mundo com projeção estimada em 10 milhões nas próximas décadas caso este quadro não seja revertido.

Calcula-se que há 1 bilhão e 100 milhões de tabagistas no mundo, que consomem 6 trilhões de cigarros/ano (WHO, 1998).

No Brasil, considerando o período de 1970 a 1990, o consumo de cigarros aumentou de 73 bilhões de unidades para 164 bilhões, retratando um aumento de 125%, para um crescimento populacional de apenas 61%. Em 1994, cerca de 109,2 bilhões de cigarros foram consumidos.

INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil o tabagismo está associado a 25% das mortes por doenças coronarianas e cerebrovasculares, mais de 90% das mortes por câncer do pulmão, 85% das mortes por doença pulmonar obstrutiva crônica e 30% das mortes por cânceres em geral.

O cigarro contém 4.720 componentes tóxicos, dos quais 60 são cancerígenos (Law et al, 1997). Porém, calcula-se que mais de 100.000 compostos do cigarro ainda não foram indentificados (Wakeman, 1972).

Os constituintes da fumaça do cigarro podem ser divididos em nicotina; monóxido de carbono (CO), componentes da fase de vapor, incluindo acetaldeído, formaldeído, acroleína, óxidos de nitrogênio, dióxido de carbono; e fase de partículas incluindo o alcatrão (Tabela 1).

Tabela 1 – Constituintes da fumaça em um cigarro sem filtro

Constituintes e quantidades presentes na fumaça do cigarro	
Fase de vapor	
Monóxido de carbono (10-23mg)	3-Vinilpiridina (11-30)µg
Dióxido de carbono (20-40mg)	Cianeto de hidrogênio (400-500µg)
Carbonil sulfido (18-42mg)	Amônia (50-130µg)
Benzeno (12-48mg)	Metilamina (11.5-28-7µg)
Tolueno (100-200µg)	Dimetilamina (7.8-10µg)
Formaldeído (70-100µg)	Óxidos de nitrogênio (100-600µg)
Acroleína (60-100µg)	Ácido fórmico (210-490µg)
Acetona (100-250µg)	Ácido acético (330-810µg)
Piridina (16-40µg)	Metil-cloreto (150-600µg)
3-Metilpiridina (12-36µg)	
Fase de Partículas	
Matéria Particular (15-40mg)	γ-Butirolactona (10-22µg)
Nicotina (1-2.5mg)	Quinolina (0.5-2µg)
Anabatina (2-20µg)	Ácido Benzoico (14-28µg)
Fenol (60-14µg)	Ácido láctico (62-174µg)
Catecol (100-360µg)	Ácido glicólico (37-126µg)
Hidroquinona (110-300µg)	Ácido succínico (110-140µg)
Colesterol (22µg)	

Adaptado de Hoffman et al (1998)

Esses componentes são simultaneamente liberados como um aerosol complexo composto de vários bilhões de partículas semi-líquidas/cm³, numa mistura de gases em combustão. Por este motivo, associar o risco de doenças cardiovasculares a apenas certos compostos se torna complicado (Smith et al, 2001).

A maior parte da literatura especializada enfoca os efeitos da nicotina, por ser o principal constituinte responsável nas respostas farmacológicas ao fumo (Artho et al., 1964; Emele et al., 1977), exceto com relação aos efeitos oxidantes (Loo, 1995; Frei et al., 1991). Sua toxicidade e tendência a gerar dependência em seus usuários leva este alcalóide natural a ser de grande importância médica.

A nicotina é metabolizada extensivamente pelo fígado. Aproximadamente 70% - 80% da nicotina é metabolizada à cotinina por oxidação, sendo então este seu principal metabólito. Aproximadamente 4% da nicotina é metabolizada à nicotina-N'-óxido (Benowitz et al, 1996).

Sobre o sistema cardiovascular, a ação da nicotina se faz fundamentalmente através do estímulo adrenérgico. Receptores colinérgicos nicotínicos ativam gânglios autonômicos com subsequente liberação de noradrenalina pós ganglionar e adrenalina da medula suprarrenal (Franken et al, 1980; Narkiewicz et al, 1998; Grassi et al, 2000). Observam-se, como efeito clínico, aumento de 10 a 20 batimentos/minuto na frequência cardíaca e de 5 a 10 milímetros de mercúrio na pressão arterial. O uso do cigarro também provoca aumento do consumo de oxigênio, aumento da resistência arterial periférica (Powell, 1998; Vogel, 1997), vasoconstrição, arritmias e cardiomiopatias (Jacobs et al., 1999).

A nicotina induz à ativação plaquetária e aumenta a liberação de prostaciclina e tromboxano A_2 (Iida, M. et al, 1998). Os fumantes apresentam níveis mais altos de fibrinogênio e fibrinólise diminuída com níveis mais altos de PAI-1 (inibidor-ativador do plasminogênio 1)(Nowak et al., 1987), fato que, em conjunção com o aumento da massa das hemácias e do hematócrito e a maior adesividade plaquetária, contribuem para elevar a viscosidade e a incidência de episódios trombo-embólicos (Goldsmith et al., 1967; Imaizumi et al., 1991; Price et al., 1999) neste grupo.

As ações da nicotina atuam fundamentalmente através do sistema nervoso autônomo. A nicotina se liga a receptores colinérgicos nos gânglios autônomos, na medula adrenal, na junção neuromuscular e no sistema nervoso central. A resposta ocorre de forma bifásica, em geral com estímulo colinérgico inicial, seguido de antagonismo dependendo das doses empregadas. Pequenas doses de nicotina agem nos gânglios do sistema nervoso autônomo, inicialmente como estímulo a neurotransmissão e, posteriormente, como depressor. O uso de altas doses de nicotina leva a um rápido efeito estimulante seguido de efeito depressor duradouro. A nicotina, à semelhança de outras drogas que causam dependência, ativa o sistema dopaminérgico mesolímbico. Essas ações aumentam o estado de atenção e sensação de bem estar, aumentam a capacidade de memória e provocam a dependência (Benowitz, 1999).

A nicotina causa ainda relaxamento muscular através do estímulo das células Renshaw ou dos nervos aferentes pulmonares (Benowitz, 1999).

No aparelho gastrointestinal, a nicotina estimula a produção de ácido clorídrico, podendo levar ao aparecimento de úlcera gástrica (Rosemberg, 1996). Através da ação combinada dos gânglios parassimpáticos e dos nervos colinérgicos, há um aumento da atividade do tônus intestinal. Náusea, vômito e até mesmo diarreia são observados após a absorção sistêmica da nicotina em indivíduos que não tenham sido expostos previamente a droga (Gilman et al., 1996).

A nicotina causa também estímulo seguido de inibição nas secreções salivar e brônquica (Gilman et al., 1996).

Com relação ao principal componente da fase gasosa, o monóxido de carbono (CO) forma-se principalmente na oxidação dos constituintes do cigarro quando estes se encontram em alta temperatura pela decarboxilação na zona de pirólise. Este componente do cigarro aumenta linearmente conforme o número de tragadas e estudos mostram que esta substância tem alto poder de toxicidade (Fecther et al, 1977).

Benowitz (1997) observou que a ação do monóxido de carbono na trombogênese tem efeitos mais deletérios do que a nicotina, que parece não agir diretamente no processo pró-trombótico.

Por outro lado, em um estudo epidemiológico (Smith et al, 1993) o CO não foi relacionado com o surgimento de placas ateroscleróticas; também em um grupo de não fumantes com angina crônica, a exposição aguda ao CO não afetou os níveis de lipoproteínas e apolipoproteínas (Leaf et al, 1996).

Dados recentes de Siow et al (1999) mostraram que o CO não tem ação vasoconstritora e Wang (1998) observou que esta substância serve como fator vaso-relaxante.

A inalação de ambas as fases de vapor e de partículas contribuem para a incidência de doença cardiovascular além de originar um processo inflamatório nos fumantes (Smith 2001). Macrófagos alveolares estimulados pelo cigarro promovem a liberação de mediadores pró-inflamatórios, os quais influenciam (em torno de 20-25%) no aumento dos leucócitos presentes nos fumantes (Corre, 1971). Além disso, o cigarro aumenta a síntese de fibrinogênio pelo fígado (Mackiewicz, 1991) elevando os níveis de fibrinogênio circulantes (Meade, 1987).

Os fumantes apresentam uma maior quantidade de espécies radicais livres pois: 1) a fase de vapor e a fase de partículas contém radicais livres (Zang, 1995); 2) os pulmões dos fumantes apresentam altos níveis de macrófagos e neutrófilos, que geram espécies reativas ao oxigênio (Rennard, 1993); 3) os fumantes ingerem na dieta menos alimentos contendo antioxidantes (Midgette, 1993).

A meia-vida destas espécies presentes na fase de vapor do cigarro é de apenas algumas dezenas de segundos; porém este tempo é suficiente para sua passagem através da circulação pulmonar (Smith et al, 2001). Pittilo (2000) atribuiu aos radicais livres presentes no cigarro a responsabilidade pelas modificações morfológicas e funcionais do endotélio.

O óxido nítrico (NO) é metabolizado pelas células endoteliais e é um importante componente vasodilatador que contribui para o relaxamento endotelial. O extrato do cigarro

INTRODUÇÃO GERAL

leva a uma irreversível inibição da atividade do NO, aumentando os riscos de doenças cardiovasculares (Su et al, 1998).

A Tabela 2 mostra um resumo da literatura sobre as possíveis relações entre as quatro maiores categorias dos constituintes da fumaça do cigarro e o risco cardiovascular (Smith, 2001).

Tabela 2 – Constituintes do cigarro e ações cardiovasculares

Efeito	Nicotina	CO	Fase de Partículas	Fase de Vapor
Aterogênico	Indiretamente positivo	Negativo	Positivo	Positivo
Trombogênico	Indiretamente positivo	Negativo	Positivo	Positivo
Agregação plaquetária	Indiretamente positivo	Negativo	?	?
Vasconstritor	Positivo	Negativo	?	Negativo
Indução a hipóxia	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
Indução a arritmias	?	?	Negativo	Negativo

Adaptada de Smith et al (2001)

Efeitos deletérios associados ao uso do cigarro podem envolver o metabolismo lipídico e de carboidratos.

Em fumantes podem ser observadas mudanças na concentração dos lípidos e das lipoproteínas circulantes, tais como o aumento de colesterol nas frações VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa) e LDL (lipoproteína de densidade baixa) (Cullen et

al., 1998) e dos níveis de triglicérides (Sinha et al, 1995) e redução na fração HDL (lipoproteína de densidade alta) (Price et al., 1999; Cullen et al., 1998; Celada et al., 1997).

Em uma meta-análise de Craig et al (1989) foi demonstrado aumento nos níveis de colesterol total, triglicérides, VLDL e LDL-col e diminuição na concentração de HDL-col e apo A-I em fumantes.

O cigarro aumenta os níveis de catecolaminas circulantes, decorrente da maior atividade do sistema nervoso simpático; como consequência, há um aumento da lipólise que eleva os níveis plasmáticos de AGL, aumenta sua captação pelo fígado e consequentemente maior secreção de VLDL (Cryer et al, 1976).

Os fumantes não são necessariamente dislipidêmicos. Alguns autores não mostram variação na concentração destas lipoproteínas em fumantes (Imaizumi et al., 1991; Leonard et al., 1995; Casanovas et al. 1992; Facchini et al., 1992).

O *PDAY study* (1990) (*Pathobiological Determinantes of Atherosclerosis in Youth*) relacionou o hábito de fumar com o processo inflamatório a partir da observação de que jovens fumantes pareados com não fumantes apresentaram aterosclerose abdominal.

Também pode-se observar aumento nos níveis séricos de hormônios do crescimento, antidiuréticos (Field et al, 1994), cortisol (Szostak-Wegierek et al, 1996) e na glicemia, glicerol e lactato (Eliasson et al, 1997).

O fumo agudo pode causar intolerância à glicose e resistência à insulina, aumentando a concentração de colesterol e triglicérides (Fratl et al, 1996).

Estudos têm sugerido que as modificações oxidativas das LDL pelo cigarro seja uma das possíveis explicações para o aumento do risco à aterosclerose em fumantes (Harats et al., 1989). Loo et al (1995) demonstraram que o hábito de fumar leva à LDL mais susceptíveis à modificações oxidativas. O cigarro também está associado a um aumento das pequenas e densas partículas de LDL (Eliasson et al, 1997) e disfunção endotelial (Newby et al, 2001), contribuindo assim para o surgimento de doenças cardiovasculares (Tuut et al, 2001).

1.3. METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

As lipoproteínas (Lp) plasmáticas são complexas estruturas macromoleculares de tamanho e densidade variados, contendo um núcleo hidrofóbico com componentes apolares, triglicérides (TG) e colesteril-ésteres (CE) e uma monocamada superficial externa, constituída por componentes polares, fosfolípides (FL), colesterol livre (CL) e apolipoproteínas (apo), que mantêm a solubilidade e a estabilidade das partículas no meio aquoso plasmático (Brown et al., 1981).

As apolipoproteínas são classificadas em quatro grupos principais representados por A (A-I, A-II e A-IV), B (B-48 e B-100), C (C-I, C-II e C-III) e E (Quintão et al., 1989). Elas são importantes para a solubilização dos lípidos, atuam como co-fatores de enzimas-chave no metabolismo de lípidos e mediam a interação das lipoproteínas com receptores celulares responsáveis pela remoção das partículas do plasma (Quintão et al., 1989).

INTRODUÇÃO GERAL

Através de técnicas eletroforéticas e de ultracentrifugação, as lipoproteínas plasmáticas podem ser fracionadas em 5 classes distintas, de acordo com suas densidades ($d = \text{g/mL}$) e diâmetros ($d_i = A^\circ$) (Atkinson et al., 1986, Gotto et al., 1986) A tabela 3 mostra a classificação destas lipoproteínas e seu conteúdo em lípides e proteínas.

Tabela 3 – Classificação das Lipoproteínas Plasmáticas

	QM	VLDL	IDL	LDL	HDL ₂	HDL ₃
(%)	$d < 0,95$	$d < 1,006$	$1,006 < d < 1,019$	$1,019 < d < 1,063$	$1,063 < d < 1,125$	$1,125 < d < 1,210$
	$d_i = 750-12000$	$d_i = 300-800$	$d_i = 250-300$	$d_i = 180-250$	$d_i = 90-120$	$d_i = 50-90$
COL	7	19	31	48	22	15
TG	84	55	32	9	4	4
FL	7	18	21	22	30	26
APOs					HDL TOTAL	
A-I	7,4	traços	-	-		67
A-II	4,2	traços	-	-		22
B-100	traços	36,9	50-70	98		traços
B-48	22,5	traços	traços	-		-
C-I,II,III	66	49,9	5-10	traços		5-11
E-II,III,IV	-	13,0	10-20	traços		1-2
D	-	-	-	-		traços

QM = quilomícrons ; **VLDL** = lipoproteínas de densidade muito baixa (very low density lipoproteins); **IDL** = lipoproteínas de densidade intermediária (intermediate density lipoproteins); **LDL** = lipoproteínas de densidade baixa (low density lipoproteins); **HDL₂** = subfração (2) das lipoproteínas de densidade alta (high density lipoproteins); **HDL₃** = subfração (3) das lipoproteínas de densidade alta (high density lipoproteins) **Col** = colesterol; **TG** = triglicérides; **FL** = fosfolípidos; **APO** = apolipoproteínas; **HDL total** = HDL₂+HDL₃

O transporte lipídico, que ocorre após a dieta, tem início com a absorção intestinal, quando ácidos graxos livres, monoglicerídeos e colesterol são incorporados aos enterócitos em macroagregados moleculares, denominados quilomícrons (QM). Estes são então transportados por via linfática, através do ducto torácico, à circulação sistêmica (Havel et al., 1982).

Os triglicérides dos quilomícrons são removidos da circulação à medida que passam pelos capilares dos tecidos periféricos, através da ação lipolítica da enzima lipoproteína lipase (LLP), cujo co-fator positivo é a apo-CII. Tanto o músculo quanto o tecido adiposo contêm grandes quantidades da enzima, localizada nas membranas das células endoteliais capilares ligada a cadeia de glicosaminoglicanos ancorada à superfície do lúmen das células endoteliais.

A LLP, uma glicoproteína com peso molecular ao redor de 60.000-72.000, é uma enzima extra-hepática sintetizada nas células subendoteliais, tais como adipócitos, e secretada aos sítios de ação no endotélio capilar. Esta enzima encontra-se em vários tecidos. Exibe as seguintes características: 1) completa inibição com 1M de cloreto de sódio e protamina; 2) depende de um co-fator - a apolipoproteína CII para sua atividade catalítica (Smith et al., 1987).

Os QM e VLDL circulantes ligam-se à enzima na parede dos capilares. A ligação é exercida por uma interação específica entre a apoC-II na partícula da lipoproteína e a LLP. Tem sido sugerido que a partícula de VLDL contém 36 moléculas de apoC-II (Smith et al., 1987); este número coincide com o número de moléculas de LLP necessárias para a

máxima hidrólise dos triglicérides contidos nesta lipoproteína, permitindo uma interação completa entre a enzima e o co-fator *in vivo*.

O contato entre a enzima e os triglicérides resulta na rápida produção de ácidos graxos, sendo que uma pequena parte destes é transportado para a circulação ligados a albumina e a maioria atravessa o endotélio, penetrando na células teciduais para sua oxidação ou reesterificação (Nilsson-Ehle, 1980).

O *pool* plasmático de triglicérides, em condições fisiológicas, é mantido em níveis constantes, enquanto há uma grande variação na taxa de hidrólise de triglicérides no tecido adiposo, dependendo da entrada de substrato. A atividade da LLP é também regulada por mecanismos hormonais, sendo que a insulina e os corticóides aumentam a atividade enzimática, o glucagon inibe-a (Nilsson-Ehle, 1980).

Após a hidrólise de triglicérides pela LLP, há a liberação de ácidos graxos livres e glicerol. As novas partículas geradas são denominadas remanescentes de QM (Windler, et al., 1980) e possuem um maior conteúdo relativo de colesterol-éster quando comparados aos QM presentes na linfa, uma vez que o colesterol-éster não é substrato para a LLP (Eckel, 1989). Também nos remanescentes de quilomícrons permanecem as apo E e apoB-48, que são reconhecidas por receptores do fígado. A lipase hepática ancorada no endotélio sinusoidal tem ação fundamental no processamento final dos remanescentes (RM) no espaço de Disse (Santamarina-Fojo et al, 1998). Os receptores de LDL ou B-E e a proteína relacionada ao receptor de LDL (LRP) possibilitam a rápida remoção destas partículas da circulação (Cooper et al, 1997).

As VLDL, de origem endógena, são sintetizadas e secretadas pelo hepatócito e seu metabolismo é muito semelhante ao dos QM, mas seu “turnover” é mais lento (Myant, 1990). No jejum de 12 horas, os triglicérides transportados no plasma provêm quase que exclusivamente da síntese hepática de VLDL, desde o aporte de ácidos graxos livres (AGL) do plasma, ligados à albumina. Nesta fase, a principal fonte de AGL é a hidrólise de triglicérides no tecido adiposo, uma vez que não há QM.

Os ácidos graxos empregados na síntese de triglicérides, de fosfolípidos e na esterificação do colesterol no hepatócito são derivados de: 1) síntese “de novo” a partir do acetil-CoA produzido pela via glicolítica e degradação de aminoácidos; 2) hidrólise de triglicérides nos tecidos, pela lipase hormônio sensível como o adiposo; 3) uma proporção menor pela hidrólise das grandes partículas (QM e VLDL) por ação da LLP e 4) hidrólise intracelular de lípidos que compõem remanescentes das Lps captadas pelo fígado, como por exemplo, os quilomicrons.

Na metabolização das VLDL a hidrólise dos triglicérides é função do tamanho das partículas, uma vez que partículas maiores são secretadas com mais moléculas de apo C, o que aumenta a interação destas com a LLP (Gotto et al., 1986). Com a depleção de triglicérides, os outros componentes, fosfolípidos, colesterol livre e apolipoproteínas C e A, são transferidos para as HDL, formando assim os chamados remanescentes de VLDL e as IDL, que contém apo B-100 e apo E como principais componentes apoproteicos. A maior parte das IDLs são rapidamente captadas pelo fígado, através dos receptores B-E e/ou LRP; uma parte perde ainda mais seu conteúdo em triglicérides, fosfolípidos e apo E, devido

também a ação da enzima lipase hepática (LH), presente nos capilares sinusóides hepáticos. Esta enzima além da ação hidrolítica, tem ação ligante.

Polimorfismos da LLP, da apo-CIII e da apo (E) além dos fatores ambientais (dieta, obesidade e fumo) são importantes determinantes da concentração de TG (Talmud, 2001) e das alterações na atividade da LLP, que tem papel crucial na remoção destas partículas devem então modular este risco (Kastelein et al, 2000). Kastelein et al (1999) observaram que as variações genéticas na LLP foram importantes moduladores dos lípides e das lipoproteínas plasmáticas.

Henderson et al (1999) mostraram que há menor atividade da LLP em pacientes com DAC quando comparados aos controles e forte relação entre LLP e modificações nos lípides e nas lipoproteínas plasmáticas.

Níveis aumentados das lipoproteínas ricas em TG aumentam o risco de DAC (Goldberg et al, 2000). Isto foi observado em pacientes portadores de deficiência de LLP (Chait & Brunzell, 1982).

Semelhantemente à LLP, a lipase hepática (peso molecular = 62500) tem um pH ótimo entre 8-9 para a hidrólise de TG. Em contraste, a LH não requer apolipoproteínas como ativador e sua atividade não sofre inibição com NaCl ou protamina. Ambas as lipases possuem a mesma composição em aminoácidos, diferenciando-se apenas na fração de carboidratos de estrutura glicoproteica (Smith et al., 1987).

A rápida liberação da lipase hepática pela heparina sugere uma localização extracelular desta enzima. Jansen et al. (1978) demonstraram que 80% da atividade desta enzima são liberadas quando o tecido hepático é perfundido com heparina *in vitro*.

A baixa atividade catalítica da lipase hepática sobre as lipoproteínas *in vitro* e a falta de uma correlação entre as atividades desta lipase e a concentração de triglicérides *in vivo* sugerem que a atividade desta enzima não é fator limitante na remoção dos triglicérides plasmáticos. Estudo desenvolvido por Nikkilä et al. (1979) mostrou que a administração de anticorpos contra a LH resultou em um significativo acúmulo de colesterol e fosfolípidos nas frações LDL e HDL e, em contraste, não provocou quaisquer efeitos sobre os níveis de triglicérides das diferentes lipoproteínas e/ou proteínas de LDL. Estes dados sugerem que a principal função da LH é a de remover colesterol e fosfolípidos das LDL e HDL durante sua passagem pelo tecido hepático.

A LH, ao agir sobre os triglicérides e os fosfolípidos (Fielding et al., 1991), transforma as IDLs em LDL; estas últimas possuem um “turnover” de aproximadamente dois dias (Myant et al., 1990). As LDL são captadas por receptores específicos permitindo o fornecimento de colesterol aos tecidos responsáveis pela esteroidogênese e aos tecidos de crescimento (Brown et al., 1988, Havel et al., 1986, Jones et al., 1984). Uma vez ligadas ao receptor, as LDL sofrem endocitose e posterior hidrólise lisossomal de seus componentes (Brown et al., 1986). A síntese do colesterol e a dos receptores de LDL é controlada pela concentração intravascular de colesterol livre. Quando esta concentração se eleva, uma das principais respostas regulatórias da célula é a inibição da ação da enzima hidroximetil

glutaril coenzima A redutase (chave na síntese de colesterol) e desses receptores (Goldstein & Brown, 1990; Brown & Goldstein, 1997). Acima de uma determinada concentração crítica de colesterol intracelular este pode precipitar-se sob a forma de cristais e lisar a célula (Small & Shipley, 1974; Beisiegel et al, 1998). Conforme a síntese de receptores de LDL diminui com o aumento do colesterol intracelular, ocorre elevação da concentração de LDL circulantes.

A maior atividade da LH leva à formação de partículas de LDL mais densas e menores, sendo estas partículas associadas ao aumento no risco de DAC em três vezes (Zambon et al, 2001). Este dado foi confirmado por Tan et al (1999) quando pacientes diabéticos mostraram maior atividade da LH e maior concentração de LDL com aquelas características quando comparados aos controles.

Sich et al (1998) observaram, em pacientes com hiperalfalipoproteinemia, reduzida atividade da LH e baixa prevalência de DAC.

O tamanho, a densidade e o conteúdo lipídico das LDL estão relacionados com a aterogênese (Austin et al., 1986). Partículas de LDL menores e mais ricas em colesterol são potencialmente mais aterogênicas, pois se infiltram mais facilmente no espaço subendotelial (Steinberg et al., 1989), onde sofrem modificações químicas principalmente oxidativas (Heinecke et al., 1984, Henricksen et al., 1981, Palinski et al., 1989, Parthasarathy et al., 1986) sendo então reconhecidas por células macrofágicas, as precursoras das células espumosas características da lesão aterosclerótica.

A etapa inicial das modificações nas LDL é a peroxidação de seus ácidos graxos poliinsaturados liberados dos fosfolípidos. Uma vez iniciada, a peroxidação lipídica propaga-se rapidamente, causando inclusive a degradação da apoB-100. Com isso, novos epítomos na apoB-100 são expostos, sendo especificamente reconhecidos pelos receptores macrofágicos (Steinbrecher et al., 1984).

A modificação oxidativa da LDL parece ocorrer em dois estágios (Brown & Goldstein, 1990): o primeiro ocorre no espaço subendotelial antes que os monócitos sejam ativados e resulta na oxidação dos lípidos da LDL, com pequena alteração na apo B (LDL minimamente oxidada - MM-LDL-OX); nesta primeira fase, a MM-LDL-OX induz a produção, pelas células endoteliais, de potentes ativadores dos monócitos, como a proteína quimiotática para monócitos (MPC-1) (Cushing et al, 1990), o fator estimulador das colônias de monócitos (M-CSF) (Rajavashisth et al, 1990) e o fator de crescimento oncogênico(GRO-KC), os quais estimulam o crescimento e a diferenciação dos monócitos e macrófagos (Jialal, 2000). Portanto, LDL-oxidadas, além de transformarem macrófagos em células espumosas, aumentam a adesão, ativação e migração dos monócitos (Cushing, et al, 1990).

O segundo estágio tem início quando os monócitos são ativados e convertidos em macrófagos, que contribuem com sua grande capacidade oxidativa. Nesse estágio, os lípidos da LDL são adicionalmente oxidados e a fração protéica (apo B-100) também o é. Essas LDL altamente oxidadas (LDL-OX) deixam de ser reconhecidas pelos receptores clássicos de LDL, porém são reconhecidas pelos receptores de LDL acetilado e/ou

receptores de LDL oxidado (Berliner et al, 1995), que não são regulados pelo conteúdo celular de colesterol.

A modificação oxidativa da LDL leva à exposição de novos epitopos reconhecíveis por anticorpos produzidos por imunização ativa ou então presentes na forma de autoanticorpos anti-LDL oxidada (anti-LDLox) (Salonen et al, 1992; Bui et al, 1996). Anticorpos anti LDL-oxidada tem sido encontrados no soro (Shoji et al, 2000; van de Vijver, 1996). Não está estabelecido se a resposta imune para a LDL-ox é anti ou pró-aterogênica *in vivo*, porém Shoji et al (2000) mostraram que a presença de anticorpos anti LDL-ox é fator de risco em pacientes com DAC.

As HDL podem originar-se no fígado, intestino e das lipoproteínas ricas em triglicérides.

Quando quilomícrons e VLDL perdem triglicérides, pela ação da lipoproteína lipase (Deckelbaum, 1986), ocorre uma diminuição da partícula e desta forma, componentes de superfície, como colesterol livre, fosfolípidos e apolipoproteínas são liberados formando macroagregados moleculares de forma discoidal. Estes precursores das HDL plasmáticas, as pré-beta HDL constituem 14% da HDL plasmática (Windler et al., 1980). A formação de partículas discóides só é demonstrada *in vitro* e em perfusão de fígado isolado. As pré-beta HDL podem ser regeneradas por três processos: pela ação combinada da CETP e da lipase hepática; como resultado da captação do CE e CL das HDL maduras pelos receptores *scavenger* SRB-I; como um produto da lipólise das partículas ricas em TG secretadas pelo fígado ou intestino delgado (Bruce et al, 1998).

As HDL no plasma podem ser divididas em duas subclasses principais com mobilidade eletroforética alfa: a HDL₂ e a HDL₃. (De Lalla et al, 1954). As duas subclasses de lipoproteínas são consideradas anti-aterogências, principalmente no que diz respeito à HDL₂. Miller et al (1981) demonstraram que há uma maior associação entre a aterosclerose e menores níveis de HDL₂ do que níveis de HDL₃. O mesmo pôde ser observado por Ballantyne et al (1982) ao demonstrar que a HDL₂, mas não a HDL₃, era reduzida em indivíduos infartados, quando comparados aos controles.

No plasma, as pré-beta HDL rapidamente modificam sua forma, que passam de discoidal para esférica, por aumento do conteúdo de colesterol esterificado no seu interior, transformando-se em HDL₃ (Dobiasová, 1983). Esse processo é mediado pela lecitina colesterol acil transferase (LCAT) secretada pelo fígado, presente nas HDL e ativada pela apolipoproteína A-I. Esta enzima é responsável pela esterificação do colesterol livre presente na superfície das HDL₃ (Ginsberg et al., 1991), e controla indiretamente os níveis de colesterol livre e esterificado em várias células e tecidos.

A LCAT possui várias funções no sistema de interconversões dos lípidos e das lipoproteínas plasmáticas. Na circulação, esta enzima está associada predominantemente a grupos heterogêneos de lipoproteínas de alta densidade, particularmente com as subfrações menores de HDL, as quais são simultaneamente substratos e reguladores da atividade da LCAT (Eisenberg et al., 1984).

Cerca de 50% da enzima está presente entre $d=1,063-1,210$ g/mL, ao passo que na $d \geq 1,210$ g/mL há aproximadamente 35%. Apenas uma pequena porcentagem da LCAT

ativa ($\approx 1\%$) está associada com a fração LDL e a fração VLDL não exibe qualquer atividade de LCAT (Dobiasová, 1983).

A principal reação molecular catalisada pela LCAT é a transferência de um ácido graxo da posição 2 da fosfatidilcolina, presente na superfície das HDL para a posição 3-beta-hidroxila colesterol livre. Este por sua vez deixa a interface com o meio aquoso e é incorporado ao núcleo hidrofóbico das HDL.

A LCAT é secretada pelas células hepáticas junto com as HDL discoidais nascentes e participa ativamente de seu processo de maturação no plasma através da troca de colesterol livre por colesterol éster, provocando modificações no volume e na forma das HDL.

Esta enzima, além de estabilizar o tamanho e a forma das lipoproteínas, através de uma contínua troca de lípidos e apoproteínas entre si, a fim de manter o balanço entre o colesterol livre e o colesterol-éster, também cria um gradiente necessário para a transferência de colesterol livre para o plasma e ao mesmo tempo a transferência de colesterol-éster para os tecidos como o hepático e o esteroideogênico, através de receptores *scavenger* classe B, tipo I (SR-BI), promovendo a captação direta da HDL, sem a necessidade da incorporação e degradação da partícula (Trigatti et al, 2000). Nos tecidos, o colesterol-éster é hidrolisado e o colesterol livre pode ser utilizado como precursor de diversas substâncias e/ou estruturas das membranas celulares.

As consequências fisiológicas da reação de esterificação do colesterol catalisada pela LCAT são dramaticamente ilustradas pelas alterações patológicas encontradas em

casos em que há deficiência de LCAT (Jonas, 1991). Por exemplo, em pacientes com deficiência de LCAT, os níveis de colesterol livre no plasma são elevados, as HDL permanecem na forma discoidal e os eritrócitos possuem membranas anormais pelo excesso de colesterol. Além disso, estes pacientes mostram uma predisposição à aterosclerose prematura e acúmulo de colesterol livre em vários tecidos (Jonas, 1991).

Com o aumento do conteúdo de colesteril-éster, as HDL₃ vão se tornando menos densas e transformando-se em HDL₂ que transferem colesteril-éster ao fígado (Kostner et al., 1987). A ação da LCAT é muito importante, pois permite que as HDL recebam progressivamente mais colesterol livre e fosfolípidos de outras lipoproteínas ou de membranas celulares. Para tanto, o colesterol esterificado das HDL₂ é transferido para as lipoproteínas ricas em triglicérides, sendo esta troca feita com os triglicérides (Tall et al., 1986a). Este processo de transferência, mediado na sua última etapa pela proteína de transferência de colesteril-éster (CETP), que promove as trocas lipídicas (Chajek et al., 1978; Tall, 1986b), é conhecido como transporte reverso de colesterol e é definido como o processo através do qual o colesterol retorna dos tecidos periféricos para o fígado, onde é excretado na bile ou armazenado pelas células como éster ou é parte de membranas como colesterol livre.

A CETP é uma glicoproteína de alto peso molecular (74000), altamente hidrofóbica e estável ao calor. A capacidade desta proteína de redistribuir os lípidos entre as diferentes partículas de lipoproteínas tem importante papel na remodelação destas lipoproteínas (Lagrost, 1994).

A CETP se distribui entre as lipoproteínas na seguinte proporção: 74% está associada à HDL; 24% à LDL; 4% à VLDL; e apenas 1% na forma livre (Nishida et al., 1993).

A interação da CETP com as lipoproteínas, que constitui o primeiro evento da reação de transferência de colesterol-éster é de natureza eletrostática. A formação do complexo lipoproteína-CETP poderia ser mediado por uma interação eletrostática entre os grupos de cargas positivas da CETP, e o grupo de cargas negativas dos componentes de superfície das lipoproteínas como, por exemplo, o grupo fosfato dos fosfolípides, grupo carboxílico dos ácidos graxos livres ou das moléculas de apolipoproteínas, induzindo uma alteração conformacional na CETP, que exporia um sítio específico de ligação com um lipídeo apolar (Nishida et al., 1993). No segundo evento, uma molécula de lipídeo apolar poderia ser trocada por uma molécula de éster de colesterol ou triacilglicerol inseridos entre cadeias acil de fosfolípides. Duas teorias sugerem que: 1) a CETP poderia atuar como uma lançadeira, transportando colesterol esterificado e triacilgliceróis entre as lipoproteínas (Barter et al., 1980) ou; 2) a CETP mediaría a formação de um complexo ternário de colisão envolvendo a lipoproteína doadora, a própria CETP e a lipoproteína aceptora (IHN et al., 1982).

As consequências metabólicas da alta ou baixa atividade da CETP foram propostas por Barter et al.(1994). Quando a atividade plasmática de CETP é baixa menos colesterol-éster torna-se disponível para as lipoproteínas que contém apo-B e a concentração de colesterol-éster das HDL₂, consequentemente, aumenta. O transporte reverso de colesterol

pela via direta levaria a um aumento da remoção do colesterol-éster (Bisgaier et al., 1991), já que após a hidrólise de triglicérides e fosfolípidos das HDL₂ pela lipase hepática, ocorre a difusão de colesterol-éster de HDL₂ pela membrana do hepatócito, através de receptores *scavenger* classe B, tipo I (SR-BI) (Trigatti et al, 2000; Busch et al., 1994; Clay et al., 1991; Blades et al., 1993).

Quando a atividade da CETP está elevada, ocorre um aumento da transferência de colesterol-éster das HDL para as lipoproteínas de baixa densidade com consequente aumento da captação de colesterol éster pelo fígado .

A relação entre a CETP e aterogênese é ainda controversa. A via direta do transporte reverso de colesterol tem sido sugerida como um mecanismo anti-aterogênico por remover colesterol-éster, presente nas HDL, diretamente pelo fígado. Porém, estudos sugerem que este caminho contribui com pouco mais de 10% para o *clearance* do colesterol corpóreo (Myant, 1981; Marcel et al., 1980). Já a via indireta tem interpretação ambígua: anti-aterogênica, uma vez que estas lipoproteínas são reconhecidamente removidas da circulação por receptores hepáticos específicos (Dullaart et al., 1991, Brown et al., 1988; Havel et al., 1982) e aterogênica por promover transferência de colesterol-éster em direção às VLDL e LDL e partículas remanescentes, que são capazes de depositar colesterol na parede arterial (Dullaart et al., 1991; Patsch et al., 1983; Zilversmit et al., 1979).

Durante o processo de transferência do colesterol-éster para as lipoproteínas de baixa densidade em troca de triglicérides, na circulação hepática, estes últimos juntamente com os fosfolípidos da HDL₂ , são hidrolisados pela lipase hepática, provocando modificação na

composição e aumento da proporção da massa de proteína em relação aos lípides. Ao final desta etapa metabólica forma-se a HDL₃ que, ao retornar aos tecidos extra-hepáticos, reinicia o ciclo de captação do colesterol.

Vários fatores modulam a atividade da CETP, incluindo a sua massa (Tall, 1995), as concentrações de VLDL (McPherson et al, 1991) e a composição química dos substratos das lipoproteínas (Mann e al, 1991). Além desses fatores, a proteína inibidora da transferência de lípidos (LTIP) modifica o padrão do fluxo de lípidos entre as lipoproteínas mediado pela CETP, através da inibição da reação de transferência de lípidos envolvendo a LDL. (Morton & Greene, 1997).

A LTIP ou apolipoproteína F é uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 30.000 e foi descrita pela primeira vez em 1981 (Morton & Zilversmit, 1981). Como a CETP, a LTIP parece ser uma proteína ativa na superfície lipídica; ela não se altera com as concentrações de CETP, mas é inversamente relacionada com as concentrações de lipoproteínas. A LTIP reside quase que exclusivamente na LDL (Morton & Greene, 1997).

Em indivíduos controles, a LTIP está associada negativamente com a taxa de transferência de lípidos entre VLDL e LDL e com o tamanho da partícula de HDL (Morton & Steinbrunner, 1993). A adição de LTIP exógena no plasma leva a uma redução na participação da LDL nos eventos da transferência de lípidos e um aumento no efluxo de colesterol-éster da HDL para VLDL, tornando a HDL excelente substrato para a LCAT (Morton & Greene, 1994).

A associação da CETP e LTIP é fortemente influenciada pela variação na composição da superfície das lipoproteínas. Enquanto que a atividade da CETP é estimulada pelo aumento do conteúdo de AGL, a atividade da LTIP é inibida. Em condições fisiológicas, porém em altos níveis, os AGL inibem a atividade da LTIP sugerindo que a atividade desta proteína sofre variações de acordo com os diferentes estados metabólicos (Morton, 1999). Pacientes com síndrome nefrótica mostraram inativação da LTIP e altos níveis de AGL (Braschi et al, 1997).

A proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP), facilita o transporte de fosfolípidos das lipoproteínas de baixa densidade para as HDL durante a lipólise. Age conjuntamente com a CETP, uma vez que HDL ricas em fosfolípidos parecem ser excelentes substratos para a atuação da CETP. Recentes estudos *in vitro* sugerem que esta proteína pode estar envolvida na regulação do tamanho da partícula de HDL (Dullaart et al., 1994a). Quanto à PLTP, Van Tol (1997) sugere que a insulina está de alguma forma envolvida na regulação desta proteína *in vivo*. Dullaart et al (1994 a e b) mostraram que a PLTP correlacionou-se positivamente com colesterol e triglicérides de VLDL e LDL, sugerindo uma ligação entre o metabolismo de lipoproteínas que contém apo-B e a PLTP.

Recentemente Van Haperen et al (2000) mostraram que a PLTP agiu como fator anti-aterogênico, prevenindo um aumento excessivo de colesterol celular através da geração de pre-beta-HDL.

Outra lipoproteína importante, denominada lipoproteína (a), ou Lp(a), descoberta há 3 décadas, tem estrutura muito similar à LDL quanto à sua composição proteica e lipídica;

possui uma apoproteína rica em carboidratos e altamente hidrofóbica denominada apo (a). A Lp(a) possui propriedades físicas e químicas peculiares e diferentemente de outras lipoproteínas plasmáticas, não pode ser classificada através da separação por ultracentrifugação e eletroforese, pois sua mobilidade eletroforética é similar à VLDL ao passo que na ultracentrifugação sua densidade estende entre 1,000-1,210 mg/dL. (Albers et al, 1975; Gaubatz et al, 1983; Fless et al, 1984).

Estudos têm demonstrado que altas concentrações de Lp (a) estão associadas a um aumento no risco de DAC. Embora os mecanismos envolvidos na aterogenicidade ou trombogenicidade da Lp(a) não sejam ainda totalmente esclarecidos, numerosos estudos metabólicos, estruturais e genéticos têm sido desenvolvidos.

Em os valores recomendados para os níveis de lípides e lipoproteínas plasmáticas foram revistos pelo The National Cholesterol Education Program (NCEP): colesterol total < 200 mg/dL; LDL < 100 mg/dL (ótimo) e entre 100-129 mg/dL (bom); HDL $\geq$ 40 mg/dL e triglicérides < 150 mg/L.

1.4. LIPOPROTEÍNAS MODIFICADAS E TABAGISMO

Em fumantes, a oxidação de componentes plasmáticos das lipoproteínas, especialmente lípides de LDL tem sido atribuída à presença de radicais livres na circulação (Sanderson et al., 1995; Harats et al., 1989).

A incubação das LDL com extrato aquoso do cigarro leva a variações na mobilidade eletroforética de LDL, extensiva fragmentação de apo-B e aumento da captação de LDL por macrófagos (Loo, 1995). Dados na literatura são bem conflitantes ao que se diz respeito ao uso do cigarro e níveis de anticorpos anti-LDL-oxidada (anti OX-LDL).

A reatividade do ácido tiobarbitúrico (TBA) foi medida também em fumantes e não fumantes antes e após a oxidação de LDL. Harats et al. (1989) e Scheffer et al. (1990) não observaram diferenças nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em LDL recém-isoladas entre os dois grupos. Entretanto, as amostras de LDL oxidadas no grupo de fumantes desenvolveram duas vezes mais TBARS quando comparados aos não fumantes, sugerindo que o cigarro leva à uma LDL plasmática mais susceptível à modificações peroxidativas.

Lentz et al. (1974) e Scheffer et al (1990) também observaram aumento nos níveis de TBARS em macrófagos alveolares pulmonares de coelhos expostos ao extrato aquoso filtrado do cigarro.

A peroxidação lipídica, medida através da reatividade do ácido tiobarbitúrico (TBARS) não se mostrou diferente entre 20 fumantes e 20 não fumantes, entre 17 e 40 anos (Leonard et al, 1995). Tais resultados estão de acordo com Siekmeir et al (1996) que ao estudar fumantes e não fumantes, não observaram quaisquer diferenças entre os grupos.

Shogi et al (2000), Marangon et al (1997) e Boullier et al (1995) não encontraram variação nos níveis plasmáticos de anti OX-LDL em indivíduos fumantes e saudáveis, e

o mesmo resultado pôde ser observado no trabalho de Lehtimäki et al (1999), porém no grupo de fumantes com DAC, os níveis de anti OX-LDL mostraram-se elevados.

Hoogerbrugge et al (1998) não observaram variação nos níveis plasmáticos de anti OX-LDL em mulheres fumantes quando comparadas com não fumantes.

Por outro lado, Liu et al (2000), Fickl et al (1996) e van Tits et al (2001) observaram maiores níveis de anti-OX-LDL em fumantes quando comparados aos controles; Heitzer et al (1999), estudando indivíduos fumantes encontraram maiores concentrações de anti OX-LDL.

Scanlon et al (1996) encontraram depósitos de epítomos de LDL oxidada em aortas de jovens fumantes.

1.5. LIPASES, ÁCIDOS GRAXOS LIVRES E TABAGISMO

O efeito do fumo sobre as atividades da LLP tem sido motivo de vários estudos na literatura. Brunzell et al. (1980) demonstraram em fumantes (n=10), que a atividade da LLP no tecido adiposo estava aumentada em 52% em relação aos não fumantes. Chajek-Shaul et al.(1990), estudando um grupo de 17 fumantes, também descreveram aumento da atividade de LLP em tecido adiposo. Em ambos os estudos os indivíduos estavam em jejum de 12 horas. Blache et al. (1992) encontraram aumento da atividade plasmática da LLP em 12 fumantes inveterados jovens, sob o efeito agudo do fumo (1 cigarro), quando comparado ao seu efeito crônico. Entretanto, Carney et al. (1984) e Eckel et al (1984) não encontraram quaisquer variação na atividade desta enzima em fumantes quando comparados a não

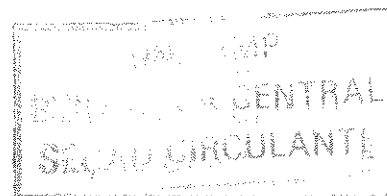
fumantes. Quensel et al. (1989), utilizando administração de nicotina em não fumantes (2mg, oito vezes ao dia, durante duas semanas), não encontraram variação da atividade da LLP.

Axelsen et al (1995) encontraram que os fumantes, comparados ao controles, tinham níveis de TG pós-prandial 50% mais altos sem apresentarem diferenças no jejum, sugerindo uma prejudicada capacidade de remoção lipolítica neste grupo. Entretanto dados mais recentes (Zaratin et al, 2001) não demonstraram variação na concentração de TG em normolipidêmicos fumantes.

A atividade da lipase hepática em fumantes tem sido menos estudada em fumantes do que a LLP. Moriguchi et al. (1990) observaram aumento na atividade plasmática desta enzima em fumantes quando comparados aos não fumantes.

Freeman et al (1998) encontraram menor atividade da lipoproteína lipase periférica, mas não da hepática, em fumantes jovens quando comparados aos não fumantes. Já Eliasson et al (1997) ao estudar fumantes e não fumantes mostraram resultados bem diferentes: lipase hepática aumentada nos fumantes, menores níveis de HDL-col e semelhantes níveis na atividade da lipase periférica entre os dois grupos, sugerindo que estas enzimas estariam contribuindo para a captação e remoção desta lipoproteína.

O fumo e a injeção de nicotina intravenosa provocam aumento da lipólise secundariamente ao estímulo simpático, levando a um aumento plasmático de AGL (Mjos, 1988).



Targher et al (1997) mostraram aumento significativo nos níveis de AGL em fumantes diabéticos não insulino dependentes quando comparados aos não fumantes.

Hellerstein et al (1994) ao estudarem o efeito do fumo e sua cessação em fumantes, mostraram que o cigarro provocou um aumento no fluxo de AGL plasmáticos em 77% ($p < 0.02$) quando comparado ao período de abstinência. Blache et al (1992) estudaram o efeito agudo do fumo, ou seja, antes de fumar e 10 minutos após o uso de 1 cigarro e observaram aumento significativo nos níveis de AGL no período pós-fumo. Estes dados diferem de Davis et al (1979), pois estes não observaram quaisquer diferenças na concentração de AGL sob o efeito agudo do fumo, (após o uso de 2 cigarros).

1.6. ESTERIFICAÇÃO DO COLESTEROL LIVRE PLASMÁTICO E TABAGISMO

A resposta da atividade da LCAT em fumantes é motivo de controvérsia na literatura. De Parscau et al. (1986) observaram menores níveis plasmáticos de apoA-I e maiores níveis de apo-B e apo-E em fumantes quando comparados a não fumantes. Observaram também tendência a menor atividade da LCAT neste grupo de indivíduos; em ambos os grupos, os voluntários eram normolipidêmicos, normoglicêmicos e possuíam excelente saúde física. Estes autores sugerem que estas modificações poderiam explicar a alta incidência da doença arterial coronariana em fumantes.

Haffner et al (1985) e Freeman et al (1998) observaram menor atividade desta enzima no grupo de fumantes quando comparados aos não fumantes e McCall et al (1994) encontraram inibição da LCAT em voluntários não fumantes expostos à fase gasosa do

cigarro. Esta alteração adversa é provavelmente mediada por radicais livres e/ou aldeídos reativos (por ex.: acetaldeído, acroleína, formaldeído) gerados durante a combustão do cigarro.

Já Dullaart et al. (1994), estudando 21 indivíduos fumantes e 21 não fumantes, ambos normolipidêmicos, não observaram variação na atividade desta enzima entre os grupos. Também Mero et al (1998), e Hojnacki et al (1986) demonstraram níveis semelhantes de LCAT; porém este último grupo de pesquisadores fez seu estudo em macacos submetidos ao tratamento de nicotina (6mg/Kg/dia) por um período de 2 anos.

1.7. TRANSFERÊNCIA DE COLESTERIL ÉSTERES (CETP) E DE FOSFOLÍPIDES (PLTP) ENTRE AS LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS, PROTEÍNA INIBIDORA DA TRANSFERÊNCIA DE LÍPIDES, NÍVEIS PLASMÁTICOS DE FOSFOLÍPIDES E TABAGISMO

Poucos estudos sobre CETP são descritos em fumantes: Freeman et al (1998) não encontraram diferenças entre os grupos quanto à atividade da CETP e De Parscau et al. (1986) demonstraram que, em indivíduos fumantes, a atividade da CETP tendeu a ser menor e a relação CETP/LCAT significativamente menor, quando comparados a não fumantes.

Já Dullaart et al. (1991), estudando pacientes diabéticos insulino-dependentes fumantes e não fumantes, observaram maior atividade da CETP no grupo de fumantes. Este

mesmo resultado foi também observado em indivíduos normolipidêmicos fumantes e não fumantes, utilizando métodos analíticos similares (Dullaart et al, 1994).

Os mecanismos prováveis pelo aumento da atividade da CETP em fumantes não estão totalmente esclarecidos, mas supõe-se que estejam relacionados não apenas a um aumento da massa de CETP, mas também a uma diminuição da atividade de um possível inibidor (Nishida et al., 1989).

Estes achados são diferentes dos observados por Mero et al (1998), que mostraram atividade de CETP estatisticamente menor em fumantes, quando comparados a não fumantes. Ambos os grupos consistiam de homens normolipidêmicos saudáveis. Freeman et al (1993) também demonstraram menores níveis da atividade da CETP em fumantes, porém seu grupo era bastante heterogêneo, uma vez que homens e mulheres e até mesmo obesos foram incluídos.

A atividade da PLTP em fumantes foi estudada por Dullaart et al (1994a) que encontrou maior atividade desta nos fumantes, quando comparados aos controles.

Já Mero et al (1998) não demonstrou diferenças na atividade da PLTP em fumantes e não fumantes no período de jejum.

A relação entre os níveis plasmáticos de fosfolípides e o fumo foi estudado por Stubbe et al (1982), que demonstraram que a cessação do cigarro provocou aumento na concentração de HDL-FL.

Latha et al (1993) observaram aumento nos níveis séricos de fosfolípides após a administração de nicotina em ratos. Marangon et al (1997), ao estudarem a relação entre o

fumo, o processo oxidativo e os níveis plasmáticos das lipoproteínas, observaram maiores níveis de fosfolípidos na fração VLDL em mulheres fumantes quando comparadas às não fumantes.

Gnasso et al (1984) estudaram o efeito agudo do fumo em 12 homens fumantes e demonstraram uma redução na concentração de fosfolípidos de HDL₃ em 2/3 após o uso de 2 cigarros. O mesmo pôde ser observado por Wallentin et al (1986) que demonstraram uma redução nos níveis de HDL₂ e HDL₃-fosfolípidos em homens com doença arterial coronariana comparados à controles sadios, independentemente do hábito de fumar.

Já Cuvelier et al (1985) demonstraram que, em um grupo de 2000 voluntários entre 4 e 70 anos, o uso do cigarro não influenciou nos níveis plasmáticos de fosfolípidos.

1.8.SUBFRAÇÕES DE HDL E TABAGISMO

Mjos (1988) mostraram menores níveis de colesterol nas subfrações 2 e 3 da HDL em indivíduos que fumavam há mais de 10 anos. Razay & Heaton (1995) mostraram queda de 16% nos níveis de colesterol de HDL₂ em mulheres fumantes quando comparadas às não fumantes.

Ito et al (1995) mostraram menores níveis de colesterol de HDL₂ e HDL₃ em fumantes quando comparados aos controles. Moriguchi et al (1990) mostraram que o cigarro levou a uma redução na concentração de colesterol de HDL₂ mas não de HDL₃, em uma população de pacientes com infarto agudo do miocárdio, sugerindo que esta diferença foi causada pela menor atividade da LH e da relação LCAT/LH encontradas neste grupo.

Eliasson et al (1983) não observaram diferenças na concentração das subfrações de HDL em fumantes quando comparados aos controles, porém após a ingestão de uma dieta rica em gordura, os níveis de HDL₂-col e HDL₂/HDL₃ aumentaram apenas nos não fumantes, sugerindo que fumantes possuem uma lipólise pós-prandial prejudicada.

Por outro lado, Zaratin et al (2001) mostraram maiores níveis de fosfolípidos de HDL₂ em fumantes, bem como maior lipólise neste grupo.

1.9. LIPOPROTEÍNA (a) E TABAGISMO

No que se refere à Lp(a), Ishikawa et al (1999) encontraram correlação positiva entre o fumo e a concentração de Lp(a) em homens e mulheres entre 39-70 anos.

Entretanto Freeman et al (1993), Sanz et al (1996) e Chien et al (1999) não observaram quaisquer efeitos do fumo sobre os níveis de Lp(a).

Por outro lado, Serrano et al (2000) mostraram que a proporção de Lp (a) acima de 30 mg/dL em pacientes não fumantes com DAC foi quase que o dobro em relação aos fumantes.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O tabagismo pode provocar modificações nas concentrações e/ou na composição dos lípides plasmáticos. As dislipidemias são um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose e o metabolismo de lípides e lipoproteínas plasmáticas têm sido intensamente estudado em fumantes.

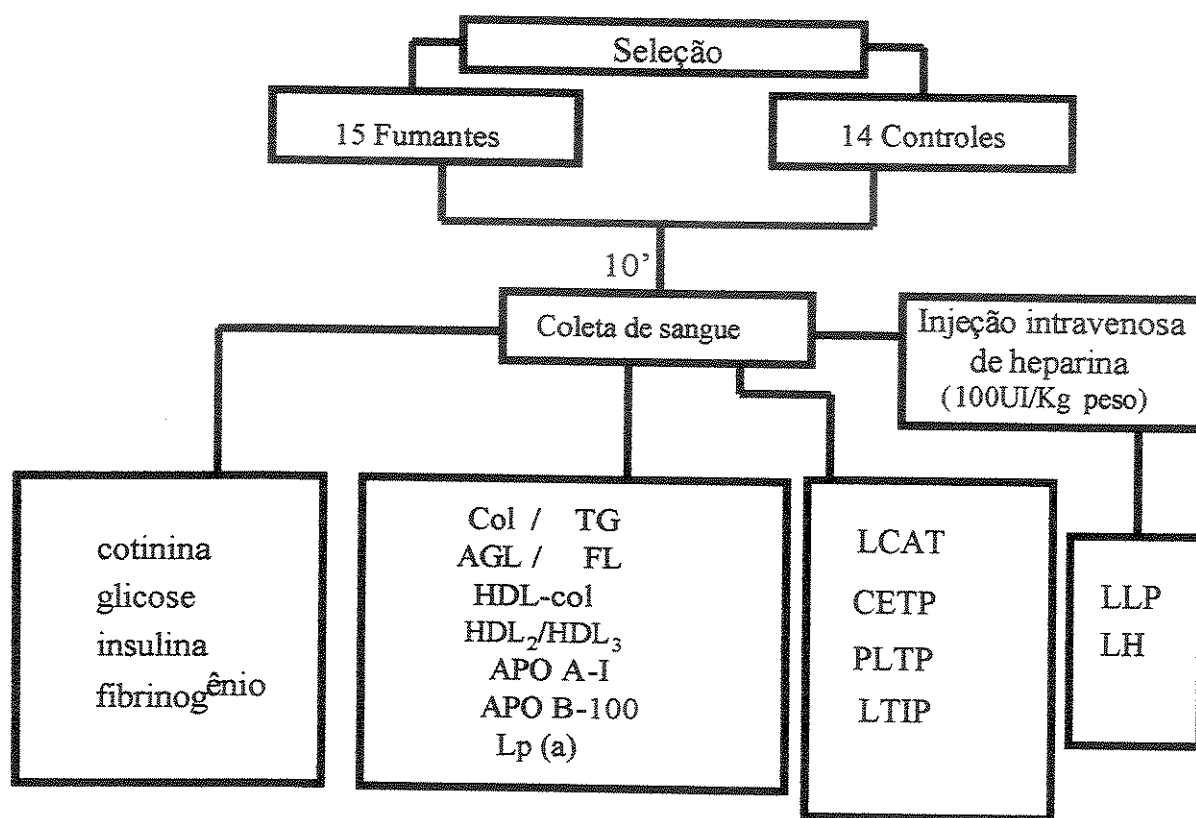
Para melhor conhecimento da ação do fumo sobre o metabolismo das lipoproteínas plasmáticas realizamos estudos em tabagistas para:

- 1- avaliar os efeitos do fumo sobre as proteínas que participam do transporte reverso de colesterol a saber: lipoproteína lipase (LLP), lipase hepática (LH), lecitina:colesterol acil transferase (LCAT), proteína de transferência de colesteril éster (CETP), proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) e proteína inibidora da transferência de lípidos (LTIP).
- 2- avaliar os efeitos do fumo sobre a composição das subfrações HDL₂ e HDL₃ das lipoproteínas de alta densidade, lipoproteínas chave no transporte reverso de colesterol
- 3- avaliar os efeitos do fumo sobre a oxidabilidade de lipoproteínas de baixa densidade e sobre a formação de autoanticorpos contra lipoproteínas de baixa densidade oxidadas

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. DESENHO EXPERIMENTAL

FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS UTILIZADOS



Foram estudados 96 voluntários, fumantes e controles, funcionários, alunos e pessoas por estes indicados, adultos, de ambos os sexos, normolipidêmicos, com índice de massa corpórea dentro dos limites de referência e de classe econômica homogênea. Os participantes foram previamente selecionados após exame clínico no Ambulatório de Dislipidemias do Departamento de Patologia Clínica – Unicamp, incluindo medidas do índice de massa corpórea e relação cintura/quadril. Os exames laboratoriais foram realizados nos Serviços de Bioquímica Clínica e Hematologia - HC-Unicamp. Os

participantes assinaram o consentimento pós-informado, aceito pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. O grupo de fumantes era composto por indivíduos com hábito moderado, mínimo de 10 cigarros/dia e, os não fumantes por aqueles que nunca fumaram.

Os voluntários foram divididos em dois sub-grupos:

1) No sub-grupo 1, 15 fumantes (F) e 14 controles (C), do sexo masculino. Neste sub-grupo foram determinadas as concentrações plasmáticas de: cotinina, ácidos graxos livres, fosfolípides, VLDL-col, LDL-col, HDL-col assim como a composição das subfrações de HDL (colesterol, triglicérides e fosfolípides) e glicose, insulina, e fibrinogênio. As atividades da LLP, LH, LCAT, CETP, PLTP e LTIP e a massa de CETP também foram quantificadas.

2) No sub-grupo 2, 31 fumantes e 36 controles participaram do protocolo (46% do sexo masculino e 54% do sexo feminino). Medidas de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e anticorpos anti LDL oxidada foram realizadas.

Os resultados obtidos nestes sub-grupos geraram os trabalhos 1 e 2 mostrados a partir da página 53.

3.2. ATIVIDADES DA LIPOPROTEÍNA LIPASE E LIPASE HEPÁTICA

As atividades de LLP e LH foram medidas pela hidrólise de substrato artificial de trioleína triciada, segundo Enholm (1986). Preparou-se 2,5 mL de uma emulsão contendo trioleína marcada com [³H] [(9,10 ³H (N)- trioleína, atividade específica de 26,8 Ci/mmol, (NEN) trioleína fria (Sigma, St Louis, MO, EUA) estabilizada com solução de goma arábica à 5% (Sigma, St Louis, MO. Para inibição da atividade da LPL foi utilizada uma solução de 1 M NaCl. A emulsão foi então seca sob nitrogênio após a adição de heptano,

sonicada em pulsos alternados, 8x30 segundos em sonicador Branson Cell Disruptor, modelo 450, com ponta de titânio de 1 cm de diâmetro (Branson Sonifier, Danbury, EUA).

Adicionou-se ao final da sonicação, 1mL de albumina bovina sérica 10% como quelante de ácidos graxos livres.

As análises da atividade das lipases total e hepática foram feitas em duplicata. Para determinação da lipase total foram adicionados aos tubos tris HCL, pH 8,5 e para a determinação da lipase hepática adicionou-se NaCl 2M para inibição da lipoproteína lipase.

Após 60 minutos, a reação foi interrompida com a adição da mistura extratora de metanol/ clorofórmio/heptano e K_2CO_3/H_3BO . Do sobrenadante da extração lipídica, foi retirada uma alíquota para contagem de radioatividade em contador de cintilação líquida Beckman modelo LS-5000.

As atividades da lipase total e LH e foram expressas pela quantidade de ácidos graxos livres liberados por hora, por mL de plasma, utilizando-se a equação:

$$\frac{\text{dpm amostra} - \text{dpm branco}}{406 \text{ dpm/nmol AGL}} \times 2,5 \times 100$$

A atividade da lipoproteína lipase foi calculada pela diferença entre a atividade da lipase total e a atividade da lipase hepática.

3.3. ATIVIDADE DA LECITINA COLESTEROL ACIL TRANSFERASE (LCAT)

A atividade da enzima lecitina:colesterol acil transferase (LCAT) foi determinada através da medida de esterificação do colesterol livre radioativo nas HDL. Para tanto, foram feitas duas medidas de esterificação (30 minutos e 24 horas). As HDL foram incubadas em banho-maria (37°C) e o processo interrompido por armazenamento à 4°C. Na primeira incubação determina-se a capacidade de esterificação e na segunda obtém-se a quantidade

MATERIAIS E MÉTODOS

máxima de [colesteryl-4-¹⁴C] oleato formado. Ao final de cada tempo, alíquotas em triplicata das HDL foram obtidas para a medida direta de radioatividade, e alíquotas também em triplicata foram utilizadas para a separação das frações de colesterol livre e éster, através de cromatografia de camada delgada (CCD) sobre sílica gel H. A separação foi feita em sistema contendo hexano:éter etílico:ácido acético (70:30:1)(vol:vol:vol) e as placas reveladas em câmara contendo iodo sublimado. As radioatividades das bandas de colesterol livre e éster foram determinadas em contador de cintilação líquida (Beckman, modelo LS 6000 TA, Palo Alto, CA, USA).

A taxa percentual de esterificação do colesterol de HDL foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\frac{CE}{CL + CE} \times 100$$

onde CE = dpm de colesteryl-éster; CL = dpm de colesterol livre.

3.4. ATIVIDADE DA PROTEÍNA DE TRANSFERÊNCIA DE COLESTERIL-ÉSTER (CETP)

Os ensaios de medida da atividade endógena da CETP foram feitos utilizando-se lipoproteínas de baixa densidade de voluntários e incubando-as com HDL previamente marcada, com seus respectivos plasmas. A HDL foi obtida a partir de um volume de 4-5mL de plasma (10μL de EDTA 10%/mL de sangue), por ultracentrifugação preparativa sequencial (De Lalla et al., 1954) em ultracentrífuga Beckman modelo L5-75B, Palo Alto, CA, utilizando-se rotor 50.3 Ti à 10°C e 40.000 g.

As HDL foram marcadas através da transferência de 4-¹⁴C-colesterol, de discos de papel de filtro para as lipoproteínas. Cada disco de papel apresentando radioatividade da ordem de 10⁵ desintegrações por minuto (dpm) foi mantido a -20°C até o momento das

análises. Foram adicionadas alíquotas de solução tampão (Tris, 10mmol/l; NaCl 150 mmol/L; EDTA 0,01%; NaN₃ 0,03%) e a seguir, adicionados aos tubos 30µL de HDL de cada indivíduo. Os tubos foram mantidos a 4°C por 24 horas para a transferência do colesterol radioativo dos discos para as HDL.

Foram feitas então incubações em triplicata de HDL radioativa com plasma, por quatro horas a 4°C e 37°C. Ao término destas, as HDL foram obtidas por precipitação das lipoproteínas de baixa densidade com solução de sulfato de dextrana/MgCl₂. Uma alíquota de 10 µL do sobrenadante foi utilizada para a medida de radioatividade total e outra alíquota foi submetida a cromatografia em camada delgada para a separação das frações livre e éster do colesterol, seguida da medida da radioatividade.

Foram utilizados controles positivos humano e animal e valores de transferência de colesterol éster a 4°C como os brancos da reação para efeito de cálculos:

$$\% \text{Transferência} = \frac{1 - \text{CE (37° C)}}{\text{CE (4°C)}} \times 100$$

3.5. PROTEÍNA DE INIBIÇÃO DA TRANSFERÊNCIA DE LÍPIDES (LTIP)

3.5.1. Preparação do plasma deficiente de lipoproteínas

Ao plasma do paciente foi adicionado 100µL sulfato de dextrana (6,5%) e a mistura foi incubada por 30 minutos em gelo. Em seguida adicionou-se MnCl₂ (2M) mantendo-se a incubação por mais 60 minutos. Após esse período, a mistura foi centrifugada a 4°C por 25 minutos a 51.520g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionou-se 122µL de BaCl₂ (15%); a mistura foi incubada em gelo por 30 minutos. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi submetido à diálise em tampão Tris, pH 7,4. Os plasmas deficientes de

MATERIAIS E MÉTODOS

lipoproteínas foram filtrados em filtro 0,45µm, deixados em gelo utilizando-os no mesmo dia do ensaio de transferência.

3.5.2. Medida da transferência de ^3H -CE (Colesterol Éster)

Dez µg ^3H -CE LDL, 30µg LDL não marcada, 40µg HDL foram misturados com EDTA (100mM), BSA (3,5%), tampão Tris-HCl (50 mM), NaCl (150mM) e completado o volume final para 500µL com água e incubados em banho-maria a 37°C e mantidos sob agitação por 2 horas, nas seguintes condições:

	Transferência Total	Transferência da amostra <i>com</i> CETP exógena	Transferência da amostra <i>sem</i> CETP exógena	Transferência a branco
CETP exógena (1:4)	50µL	50µL	0	0
AMOSTRA (plasma deficiente de LP)	0	40µL	40µL	0

Após este período, interrompeu-se a transferência por 15 minutos colocando as amostras em banho de gelo. Adicionou-se 100µL Na PO₄ (0,45M, pH= 7,4) e 100µL de MnCl₂ sendo a mistura incubada por mais 30 minutos a temperatura ambiente, seguida de centrifugação a 9000 rpm por 3 minutos. Uma alíquota de 500µL do sobrenadante foi utilizada para contagem da radioatividade em contador beta.

- Cálculo da inibição da transferência de lípidos:

$$\% \text{ inibição} = \frac{100 \times [1 - (\% \text{ transferência com CETP exógena} - \% \text{ transferência sem CETP exógena})]}{\% \text{ transferência total}}$$

- Cálculo da inibição relativa /mL de plasma

Foi realizado por meio de uma curva padrão onde foi medida a % de inibição da transferência de volumes variáveis de um pool de plasma controle.

3.6. PROTEÍNA DE TRANSFERÊNCIA DE FOSFOLÍPIDES (PLTP)

Lipossomas radioativamente marcados foram preparados a partir de uma mistura contendo 10 μ moles de fosfatidilcolina, 1 μ Ci de 14 C-fosfatidilcolina e 0.1 μ mol de hidroxitolueno butilado. A mistura foi seca sob nitrogênio e em seguida adicionou-se 1mL de NaCl (150mM) contendo tris-HCl (10mM) e EDTA (1mM, pH=7.4). Os lípides foram submetidos à sonicação 3 vezes durante 5 minutos, em gelo. À mistura contendo 10 μ L do lipossoma marcado radioativamente 15 μ L HDL e 365 μ L de tampão foram adicionados 10 μ L de plasma para posterior incubação a 37°C por 1 hora. Após a incubação, as lipoproteínas ricas em apo-B foram precipitadas com sulfato de dextrana/MgCl. Duzentos μ L do sobrenadante foram separados para a medida de radioatividade total. Os brancos de cada amostra foram incubados à 4°C.

Desta forma, a transferência de FL foi determinada pelo incremento da porcentagem de radioatividade detectada na HDL, em relação ao controle a 4°C, após 1 hora de incubação a 37°C, segundo a fórmula:

$$\% \text{ FL radioativo} = \frac{\text{dpm FL na HDL } 37^{\circ}\text{C}}{\text{dpm FL na HDL } 4^{\circ}\text{C}} \times 100$$

3.7. MEDIDA DA OXIDABILIDADE DA LDL PELA QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Para a medida da oxidabilidade da LDL, uma alíquota da mesma foi dividida em duas partes: uma foi dialisada em PBS contendo EDTA (LDL normal) e outra foi dialisada em PBS sem EDTA e submetida à reação de oxidação. Esta reação foi feita através da incubação de 100µg de proteína de LDL com uma solução de sulfato de cobre de concentração 1mM (10 µl CuSO₄/mL de solução), por 8 horas em banho-maria a 37°C com agitação, em frasco aberto para facilitar as trocas com oxigênio atmosférico. A reação encerrou-se com a adição de EDTA 1mM (20 µL EDTA/mL de solução) ao meio (LDL oxidada). Após a oxidação, a LDL foi novamente dialisada em PBS contendo EDTA para a eliminação dos resíduos de cobre.

O grau de oxidação da LDL foi determinado pela quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando-se o 1,1,3,3 tetrametoxipropano (0,5mM) para a elaboração da curva-padrão, através da seguinte reação:

100µg de proteína de LDL foram utilizadas para a determinação do TBARS após acerto do volume final de amostra para 500µL, com PBS. Em seguida foi adicionado 1 mL de ácido tiobarbitúrico (0,67% em NaOH 0,05M) e após agitação, 300 µL de ácido tricloroacético 50%. A mistura foi incubada em banho-maria fervente por 30 minutos. Após este período, as amostras foram colocadas em banho de gelo, sendo em seguida centrifugadas a 2500 rpm por 15 minutos e efetuada a leitura espectrofotométrica em 532 nm.

3.8. MEDIDA DOS ANTICORPOS ANTI-LDL OXIDADA

Os anticorpos anti LDL oxidada (anti LDL-ox) foram determinados pelo método de ELISA. Amostras de soro foram incubadas a 4 °C por 18 h em microplacas contendo LDL previamente oxidada. Em seguida estas microplacas foram lavadas com PBS e adicionou-se leite Molico (5%) por 2h , à temperatura ambiente. As microplacas foram lavadas novamente. Adicionou-se PBS aos soros nas diluições [1:200] (sub-grupo 1), [1:250] e [1:500] (sub-grupo 2) seguida de nova incubação por 18 h. As microplacas foram lavadas com 0.02% Tween-20 (em PBS) e incubadas com anticorpo anti-IgG (anticorpo conjugado com peroxidase anti- imunoglobulina G humana) à temperatura ambiente por 1 h com subsequente lavagem. A mistura Tetrametilbenzidina/ DMSO (6.5%, 75 µL) foi adicionada às placas por 7 min. O desenvolvimento de cor foi bloqueado pela adição de ácido sulfúrico (10%, 25 µL) e a densidade óptica das amostras foi lida a 460 nm. Os resultados representam as percentagens das leituras relativas aos valores ranqueados do grupos estudados.

RESULTADOS

RESULTADOS

1º Trabalho

REDUCED PLASMA LIPID TRANSFER PROTEINS AND HEPATIC LIPASE ACTIVITIES IN NORMOLIPIDEMIC SMOKERS

Águeda C. M. Zaratini¹; Eder C. R. Quintão²; Valéria S. Nunes²; Ana Maria Lottenberg²; Richard E. Morton³; Eliana C. de Faria¹

¹Dept. of Clinical Pathology and Center for Experimental Medicine and Surgery, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas; ²Lipid Laboratory (LIM 10), University of São Paulo Medical School, SP, Brazil; ³Dept. Cell Biology, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland OH, USA.

ABSTRACT

Smoking is a leading cause of atherosclerosis. We measured lipid transfer proteins and enzymes involved in the reverse cholesterol transport system in 29 adults: 15 smokers (S) and 14 controls (C). The blood samples were drawn in the fasting state, immediately after the smokers smoked one cigarette. The high-density lipoproteins (HDL) were isolated by microultracentrifugation. Plasma HDL₃ phospholipids were higher in smokers. Post-heparin hepatic lipase activity (unesterified fatty acid released as nmol FFA/mL/h) and phospholipid transfer protein activity (PLTP = % of transfer) were 30% lower in smokers, respectively, 3384 ± 359 in S (n=15) x 4699 ± 298 in C (n=14), and 11.8 ± 1.0 in S (n=14) x 16.8 ± 0.5 in C (n=14), but PLTP was 40% lower after correction for plasma phospholipids. The cholesteryl ester transfer protein (CETP) concentration (mg/L) was 17% higher in S (2.9 ± 0.1 , n=13) as compared to C (2.4 ± 0.1 , n=11) but the endogenous CETP activity (% of transfer) was not statistically different. However, after correction for the plasma triglyceride (TG) levels that were higher in S, the endogenous CETP activity was in fact 57% lower in S. Lipid transfer inhibitor protein activity (LTIP = relative inhibition of exogenous CETP activity/mL of plasma) was also similar in both groups. In conclusion, smokers presented modifications in the components of the reverse cholesterol transport system that could reduce the production of pre β -HDL particles and bring about an atherogenic plasma lipoprotein profile.

Keywords: cigarette smoking, lecithin:cholesterol acyl transferase, hepatic lipase, lipoprotein lipase, lipid transfer proteins, lipid transfer inhibitor protein

*to whom correspondence should be addressed

Eliana Cotta de Faria

Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Caixa Postal 6111, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Tel/Fax: 0055-19-32893273 or Fax: 37888925

email: cotta@fcm.unicamp.br

INTRODUCTION

Cigarette smoking has been identified as an independent and strong risk factor for coronary heart disease (CHD) (1). The underlying mechanisms responsible for this association are complex and only partially understood. There are four major active components in the cigarette smoke that contribute directly or indirectly to cardiovascular risk: nicotine, carbon monoxide, other volatile constituents and particulate matter (2).

Regarding the lipoprotein metabolism, several pro-atherogenic modifications of plasma lipids and lipoproteins (3) have been described. Craig's et al meta-analysis of 54 published studies (4) shows an increase in plasma concentrations of cholesterol (3%), triglycerides (9.1%), VLDL-cholesterol (10.4%), LDL-cholesterol (1.7%), and a reduction in the concentrations of HDL-cholesterol (5.7%) and apo AI (4.2%) in smokers as compared to non-smokers. However several studies have shown that smokers do not necessarily develop dyslipidemia (5).

The reverse cholesterol transport (RCT) is an important mechanism of disposal of excess cholesterol from tissues and lipoproteins to the liver. The RCT involves free cholesterol efflux from cell membranes to nascent HDL, derived in part from the lipolysis of triglyceride rich lipoproteins by lipoprotein lipase (LPL), cholesterol esterification by lecithin:cholesterol acyl transferase (LCAT) and the transfer of the cholesteryl ester to triglyceride-rich lipoproteins mediated by cholesteryl ester transfer protein (CETP). Hepatic lipoprotein lipase (HL) and the phospholipid transfer protein

(PLTP) are involved in the interconversion of HDL sub-fractions, generating acceptors for cell cholesterol efflux (6). Furthermore, the lipid transfer inhibitor protein (LTIP or apolipoprotein F) facilitates the CETP-mediated channeling of the cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL (7).

Many plasma proteins and enzymes involved in the reverse cholesterol transport system (RCT) have been studied in smokers and a great deal of controversy persists in the literature (8, 9).

We hypothesized that smoking confers atherogenicity to normolipidemic subjects by disturbing the RCT system. Our specific aim was to measure the activities of LPL, HL, LCAT, CETP, LTIP, and PLTP in a selected homogeneous group of adult, male, normolipidemic, moderate, and chronic cigarette smokers. To our knowledge LTIP and CETP mass were never measured in smokers before.

MATERIALS AND METHODS

Experimental protocol:

Twenty-nine male volunteers, 15 smokers (S) and 14 controls (C) participated in the protocol. All procedures followed were in accordance with the Ethical Committee of the School of Medicine of the University of Campinas. All participants were selected for their normolipidemic profiles (cholesterol < 200mg/dL, triglyceride < 150mg/dL and LDL-cholesterol < 100 mg/dL in accordance with the standards of the National Cholesterol Education Program (NCEP III) (10), with body mass indexes (BMI) ≤ 25 Kg/m². We selected normolipidemic subjects and paired their IMC to avoid influences of hyperlipidemia and adiposity on the studied parameters.

Smokers had smoked at least 10 cigarettes/day for at least 1 year and the controls never smoked. Participants had their blood pressure and anthropometric data measured during the clinical exam and answered a questionnaire on the presence of CHD risk factors. Smokers did not refrain from smoking before the protocol started. The blood samples were drawn in the fasting period in all participants and 5 minutes after the smokers had smoked 1 cigarette in order to maximize the effects of smoking and to allow for an identical time-dependent effect of smoking among the participants. Then, heparin was injected intravenously (Liquemine® - Roche - 100UI/Kg of weight as described (11) for the measurement of the lipoprotein lipase activity.

Biochemical measurements:

Cotinine was analysed by gas liquid chromatography (12) by Dr. Colin Feyerabend at the Medical Toxicology Unit, New Cross Hospital, London, England.

Plasma glucose was assayed in an automated system (Selectra-Merck) using an enzymatic-colorimetric method by Labtest (Belo Horizonte, MG, Brazil). Fibrinogen was determined by a colorimetric method (13) and insulin by radioimmunoassay from Linco (São Paulo, SP, Brazil).

Lipid, Apolipoprotein and Lipoprotein analysis:

Total cholesterol (Chol) and triglyceride (Tg) were determined using enzymatic diagnostic reagents provided by Labtest (Belo Horizonte, MG, Brazil) in an automated system (Selectra-Merck). Free fatty acids (FFA), unesterified cholesterol

(UC) and phospholipids (PL) by enzymatic colorimetric assays (Waco Bioproducts); cholesteryl ester (CE) as the difference between total cholesterol and UC.

HDL-cholesterol (HDL-chol) was measured in the supernatant after precipitation of apoB-containing lipoproteins with dextran sulfate and $MgCl_2$. LDL-cholesterol (LDL-chol) was estimated by the Friedewald's formula. HDL₂ and HDL₃ were separated by sequential microultracentrifugation (Airfuge, Beckman) (14). Apolipoproteins AI, B₁₀₀ and Lp(a) were measured by nephelometric assays in the system Array 360 (Beckman, Palo Alto, CA, USA).

LCAT, Lipases, Transfer Proteins and LTIP analysis:

Lecithin:cholesterol acyl transferase activity was assayed by an endogenous radiometric method, using HDL as the substrate and source of LCAT (15). HDL was incubated with [1,2-³H(N)]cholesterol for 24h. [³H]cholesterol-labelled HDL was incubated at 37°C for 30 min and the free and esterified fractions of cholesterol were then separated by TLC. LCAT activity was expressed as the cholesterol esterification rate as percent / 30 minutes.

The cholesteryl ester transfer protein activity was measured by an endogenous assay (16). Aliquots of the whole plasma (in which LCAT activity was inhibited by DTNB 9 µL/mL) were added to HDL-[³H]cholesteryl ester fractions and simultaneously incubated at 4°C and 37°C for 4h. Apo-B containing lipoproteins, present in the incubation mixture, were then precipitated; the CE radioactivity in the supernatant represented the net rate at which CE mass was transferred and values

expressed as percent of [^3H] cholesteryl ester transferred/4 hours depended upon the plasma concentrations of HDL, TG-rich lipoproteins and CETP simultaneously.

CETP concentration was measured by radioimmunoassay by Dr. Laurent Lagrost (17) at the Laboratoire de Biochimie des Lipoprotéines, Hôpital du Bocage, Dijon, France.

Lipid transfer inhibitor protein activity was measured as previously described (7). This radiometric method uses exogenous CETP, ^3H -CE LDL and unlabeled HDL incubated in the presence of lipoprotein-deficient plasma as the LTIP source. LTIP activity was determined by comparing CETP activity in the presence and absence of the added LTIP source. To minimize inter-assay variability, LTIP activity values (% inhibition/mL) were normalized to the LTIP activity measured in a lipoprotein-deficient plasma standard run in the same experiment. These normalized values are reported as relative inhibition / mL.

The phospholipid transfer protein was measured by an exogenous radiometric method using phospholipid liposomes as the substrate (18) and an HDL pool, obtained from plasma donors as the acceptor. The activity was expressed as the rate of radioactively labeled phospholipid transfer / hour.

Lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (HL) activities were quantified in post-heparin plasma samples (15 min. after the intravenous injection of heparin, 100 U kg $^{-1}$ body weight), on the basis of fatty acid release, using a radiolabelled triolein emulsion as the substrate and NaCl (1M) as the LPL inhibitor (11); the results were expressed as nmol FFA/mL/hour.

The assays for CETP concentration, LTIP, PLTP, and lipoprotein lipases were conducted in triplicate. The inter-assays coefficients of variation were 16%, 12%, 2%, 9% and 8% respectively for CETP, LTIP, PLTP, LPL and HL.

Statistics:

Differences between the groups were measured by the Mann-Whitney test. The Spearman test was used to correlate the variables. Values were considered to be significant at the p level ≤ 0.05 .

RESULTS

Clinical and Biochemical Characteristics of the Participants:

Table 1 summarizes the clinical and biochemical characteristics of the participants. Both groups were very similar except for their diastolic blood pressure, significantly lower in S. All individuals were healthy male young adults, and did not present centripetal fat distribution. No group differences were found in metabolic variables such as glucose and insulin and these values were within the range of reference values for healthy adults. No clinical signs of atherosclerosis were found in either group.

S smoked an average of 19 cigarettes a day. They presented plasma cotinine levels above 184 ng/mL defined as a range of heavy smokers (19). Levels around 300ng/mL are associated with an average daily intake of 24 mg of nicotine (20). The plasma fibrinogen was significantly higher in S.

Lipids, Apolipoproteins and Lipoproteins

Table 2 shows plasma lipids, lipoproteins and apolipoproteins: all individuals had plasma levels within the range of reference values. Concentrations of cholesterol, LDL-Chol, HDL-Chol, apo B-100, apo AI, free fatty acids and Lp(a) did not differ between S and C. Triglycerides and phospholipids plasma concentrations were 30 and 14 percent higher, respectively, in S ($p \leq 0.05$). When the lipid composition of HDL subfractions was analyzed (Table 3), there were no differences between the groups, with the exception of a 21% increase in HDL₃-PL in S ($p \leq 0.05$), and this finding could account for their higher plasma PL shown in Table 2.

LCAT, lipases and transfer proteins

LCAT activity in S did not differ from that of C (Table 4). Fasting post-heparin plasma LPL was similar in both groups, but the activity of HL was 30% lower in S (Table 4). PLTP activity was reduced in S by 30% (Table 4). When corrected for PL as the ratio PLTP/PL, the difference was even larger (40%).

The CETP mass was 17% higher in S, but the endogenous CETP activity was not statistically different (Table 5). After correction for the higher TG level found in

S, as the CETP activity/TG ratio, the endogenous CETP activity was in fact 57% lower in S. The CETP specific activity corrected by TG (% of CE transferred per hour per mg of CETP per TG) was lower in S ($p=0.03$). LTIP activity was similar between the groups.

Several interesting correlations are disclosed in Table 6. Endogenous CETP activity showed positive correlations with plasma TG concentration ($r=0.71$) in S (Table 6) but no correlation was found in C. PLTP correlated positively with endogenous CETP activity ($r=0.77$) only in S. In S, plasma total cholesterol ($r=0.66$) and LDL-chol ($r=0.58$) concentrations correlated positively with cotinine levels, the main catabolic product of nicotine.

In S, LTIP activity correlated negatively with apo-AI ($r = -0.70$), LCAT correlated positively with plasma TG concentration ($r=0.74$), and negatively with LPL ($r = -0.55$). In controls these correlations disappeared.

HL correlated negatively with apoAI ($r=-0.53$). HL correlated negatively with LTIP ($r=-0.71$) and age ($r=0.73$) only in controls (data not shown).

There was a positive correlation between fibrinogen levels and the waist / hip ratio in smokers ($r=0.58$).

TABLE 1– ANTHROPOMETRIC AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF SMOKERS AND CONTROLS

	SMOKERS (n)	CONTROLS (n)
Age (years)	28 ± 1 (15)	26 ± 1 (14)
BMI (Kg/m ²)*	22 ± 0.5 (15)	22 ± 0.6 (14)
Waist/hip	0.8 ± 0.01 (13)	0.8 ± 0.02 (14)
BP (Sistolic)(mmHg)	122 ± 5 (13)	121 ± 3 (14)
(Diastolic)(mmHg)	76 ± 2 (13) [‡]	81 ± 1 (14)
Number Cigarettes/day	19 ± 1.0 (15)	-
Smoking time (years)	11 ± 1 (15)	-
Cotinine (ng/mL)	261 ± 28 (14)	-
Glucose (mg/dL)	88 ± 3 (14)	84 ± 2 (14)
Insulin (μIU/mL)	9 ± 1 (15)	7 ± 1 (14)
Fibrinogen (mg/dL)	307 ± 19 (15) ^{‡‡}	233 ± 13 (12)

Data presented as mean ± standard error of the mean (SEM) (n = number of subjects).

*BMI: body mass index; Statistical comparisons between smokers and controls by Mann-Whitney test: [‡]p ≤ 0.05; ^{‡‡}p ≤ 0.01

TABLE 2 – LIPIDS, LIPOPROTEINS AND APOLIPOPROTEINS IN SMOKERS AND CONTROLS

	SMOKERS	CONTROLS
Cholesterol (mg/dL)	157 ± 6 (15)	156 ± 6 (14)
LDL-chol (mg/dL)	89 ± 6 (15)	96 ± 6 (14)
HDL-chol (mg/dL)	49 ± 3 (15)	45 ± 3 (14)
Triglyceride (mg/dL)	99 ± 11 (15) [‡]	69 ± 12 (14)
Free fatty acids (mEq/L)	0.6 ± 0.09 (14)	0.8 ± 0.09 (14)
Phospholipids (mg/dL)	140 ± 6 (14) [‡]	120 ± 8 (14)
Apolipoprotein A-I (mg/dL)	134 ± 7 (15)	125 ± 5 (14)
Apolipoprotein-B (mg/dL)	64 ± 3 (15)	67 ± 4 (14)
Lp (a) (mg/dL)	20 ± 5 (15)	11 ± 3 (13)

Data presented as mean ± standard error of the mean (SEM) (n = number of subjects).

Statistical comparisons between smokers and controls by Mann-Whitney test: [‡]p ≤ 0.05

TABLE 3 - COMPOSITION OF HDL AS TOTAL AND UNESTERIFIED CHOLESTEROL, CHOLESTERYL ESTER, PHOSPHOLIPIDS AND TRIGLYCERIDES IN SMOKERS AND CONTROLS

	SMOKERS (n)	CONTROLS (n)
HDL ₂ -free-Chol (mg/dL)	5 ± 1 (14)	4 ± 1 (14)
HDL ₂ -Chol-ester (mg/dL)	10 ± 2 (14)	11 ± 1 (14)
HDL ₂ -TG (mg/dL)	15 ± 2 (15)	12 ± 2 (14)
HDL ₂ -PL (mg/dL)	23 ± 2 (14)	20 ± 3 (14)
HDL ₃ -free-Chol (mg/dL)	12 ± 2 (14)	11 ± 1 (14)
HDL ₃ -Chol-ester (mg/dL)	29 ± 3 (14)	25 ± 3 (14)
HDL ₃ -TG (mg/dL)	28 ± 3 (15)	24 ± 2 (14)
HDL ₃ -PL (mg/dL)	74 ± 4 (14) [‡]	59 ± 6 (14)

Data presented as mean ± standard error of the mean (SEM) (n = number of subjects). Statistical comparisons between smokers and controls by Mann-Whitney test: [‡]p ≤ 0.05

TABLE 4 -ESTERIFICATION RATE OF FREE CHOLESTEROL, LIPOPROTEIN LIPASE, HEPATIC LIPASE AND PHOSPHOLIPID TRANSFER PROTEIN ACTIVITIES IN SMOKERS AND CONTROLS

	SMOKERS (n)	CONTROLS (n)
LCAT (% / 30min.)	6.9 ± 0.6 (13)	7.0 ± 0.7 (14)
LPL (nmol FFA/mL/h)	3094 ± 384 (15)	2819 ± 299 (14)
HL (nmol FFA/mL/h)	3384 ± 359 (15) ^{‡ †}	4699 ± 298 (14)
PLTP (% /h)	11.8 ± 1.0 (14) ^{‡ †}	16.8 ± 0.5 (14)
PLTP/PL (%/mg/dL) *	0.09 ± 0.01 (14) ^{‡ †}	0.15 ± 0.01 (14)

Data presented as mean ± standard error of the mean (SEM) (n = number of subjects).

* PLTP activity corrected by total plasma PL; Statistical comparisons between smokers and controls by Mann-Whitney test: ^{‡ †}p ≤ 0.01

TABLE 5 - PERCENTAGE OF TRANSFER OF CHOLESTERYL ESTER TO APO B CONTAINING LIPOPROTEINS, CETP MASS, CETP SPECIFIC ACTIVITY AND LIPOPROTEIN TRANSFER INHIBITOR PROTEIN ACTIVITY IN SMOKERS AND CONTROLS

CETP (%)	31 ± 6 (10)	39 ± 4 (10)
CETP / TG (%/mg/dL) *	0.3 ± 0.03 (10) ^{‡ †}	0.7 ± 0.2 (10)
CETP (mg/L)	2.9 ± 0.1 (13) [‡]	2.4 ± 0.1 (11)
CETP (Specific Activity (%/mg/L)	12 ± 2 (8)	15 ± 2 (8)
LTIP (rel.inh/mL)	498 ± 68 (14)	599 ± 79 (14)

Data presented as mean ± standard error of the mean (SEM) (n = number of subjects);

* Endogenous CETP corrected by total plasma TG; Statistical comparisons between smokers and controls by Mann-Whitney test: ^{‡ †}p ≤ 0.01; [‡]p ≤ 0.05

TABLE 6 – UNIVARIATE LINEAR REGRESSION COEFFICIENT MATRIX IN SMOKERS

	NC	COT	FIBR	TG	APO A-I	HDL ₂ -PL	HDL ₂ -FC	LPL	PLTP	PL	W/H	TC	LDL-C	HDL ₂ -CE	HL	LCAT	CETP (E)	CETP (M)	LTIP
NC	1																		
COT	ns	1																	
FIBR	ns	ns	1																
TG	ns	ns	ns	1															
APOA-I	ns	ns	ns	ns	1														
HDL ₂ -PL	ns	ns	ns	ns	ns	1													
HDL ₂ -FC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1												
LPL	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1											
PLTP	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1										
PL	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1									
W/H	ns	ns	0.58 [†]	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1								
TC	ns	0.66 ^{††}	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1							
LDL-C	ns	0.58 [†]	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1						
HDL ₂ -CE	0.72 [†]	ns	-0.55 [†]	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1					
HL	ns	ns	ns	ns	-0.53 [†]	0.69 ^{††}	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1				
LCAT	ns	ns	ns	0.74 ^{††}	ns	ns	ns	-0.55 [†]	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1			
CETP (E)	ns	ns	ns	0.71 [†]	ns	ns	ns	ns	0.77 [†]	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1		
CETP (M)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0.68 ^{††}	ns	ns	0.64 [†]	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1	
LTIP	ns	ns	ns	ns	-0.70 ^{††}	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1

Spearman correlation coefficients: [†]p≤ 0.05; ^{††}p≤ 0.01

NC= number of cigarettes; COT = cotinine; FIBR = fibrinogênio; TC = total cholesterol; CETP (E) = endogenous CETP; CETP (M) = mass CETP

DISCUSSION

In the present study we examined the presence of plasma cardiovascular risk profiles, with emphasis on components of the plasma reverse cholesterol transport system, in smokers and in non-smoking control individuals.

Several significant changes that could be pro-atherogenic were observed in S: an increase in blood phospholipids and in the HDL₃-PL sub-fraction, reductions in the activities of hepatic lipase, phospholipid transfer protein and cholesteryl ester transfer protein, an increased plasma fibrinogen and a reactive reduction in diastolic blood pressure.

Even though selected as normolipidemic, the smokers presented significantly higher plasma and HDL-PL levels (14%) (Table 2), a finding partially explained by their elevated HDL₃-PL level (Table 3). This altered composition of HDL could be secondary to changes in PLTP activity (21). Some studies have shown a positive correlation of HDL-PL with atherosclerosis risk, even in normolipidemic individuals (22). No other changes or trends in the composition of HDL were observed in S in this study.

Although smoking did not induce hypercholesterolemia there was a strong positive association between serum cotinine and cholesterol and LDL-chol. levels, suggesting an effect of cigarette smoke on LDL-chol metabolism. No changes of LDL-chol, HDL-chol, Apo-AI and ApoB100 were observed.

In this study we were not able to demonstrate variation in LCAT activity between the groups. These results are in agreement with those of Moriguchi et al (23), Dirican et al (24), Mero et al (4)

Dullaart et al (25), De Parscau et al (26) and Ito et al (27).

A positive correlation of TG with LCAT activity is explained by induction of the latter by a greater concentration of the TG-rich lipoproteins (28). TG modulates positively CETP activity and creates through LCAT a positive unesterified cholesterol esterification gradient. The negative association that occurred with LPL only in smokers, could be ascribed to inhibition of LCAT activity by apoCII, a LPL activator (29). The number of cigarettes smoked associated negatively with HDL₂-Chol ester suggesting a direct action of smoking in reducing LCAT activity.

Even though normotriglyceridemic S had TG levels 30% higher (Table 2) than C, this fact could reflect a decreased residual lipolysis rate of triglyceride-rich lipoproteins in S due to their lower hepatic lipoprotein lipase activity. The trend to a 25% lower free fatty acids serum levels in S could reflect an impaired adipose tissue lipolysis (30), and / or a reduced ligand function of LPL. A higher extraction of FFA from the circulation by the liver in smokers could also lead to an increased hepatic production of VLDL.

LPL activity was comparable between the groups in accordance with the majority of the studies in the literature, like in Eliasson's et al (31), Carney's et al (32) and Eckel's et al (33).

In the present study we found a significant reduction of HL activity in S, a result not previously described in the literature: Mero et al (3), Freeman et al (8) and Quensel et al (34) did not show changes in HL; in contrast, in Dugi's et al study (35) S exhibited higher levels, leading to decreased HDL levels.

In S, HL correlated negatively with HDL-C as expected for an enzyme that hydrolyses HDL particles that had gained TG after being processed by CETP. Also HL correlated positively with HDL₂-PL, which as a very good substrate for the enzyme might have stimulated its activity. The inverse correlation of HL with apoAI could be explained by an HL inhibition effect as already shown by other authors (36). An interesting positive association observed was between HDL₃-PL and the number of smoked cigarettes, suggesting a direct effect of smoking in reducing HL activity.

Low hepatic lipase has been indicated as a novel risk factor for the development of atherosclerosis (37) but the literature is not definitive about its proatherogenic role: 1) studies on genetic polymorphisms on HL are not conclusive (38); 2) the risk of atherosclerosis due to increase in remnant lipoproteins may be balanced out in HL deficiency by the increase in HDL concentration (39); 3) some authors described premature CHD in HL deficiency (40); in 1995 Hirano et al (41) showed CHD in normolipidemic patients with low HL and Dugi et al in 1997 (35) described that atherosclerotic plaques were inversely related to HL activity; 4) Hirano et al (41) demonstrated atherosclerotic disease in subjects with both CETP and HL reduced.

In our study phospholipid transfer protein's activity was reduced in S including after correction by PL concentration. This result is corroborated by a study of Dullaart et al (25) where CETP and PLTP act synergistically to the extent that there was a strong positive association between PLTP and endogenous CETP in S. Dullaart et al (25) also showed

higher PLTP activity in a group of S. On the other hand, differently from the present study, Mero's et al reported (3) lower PLTP in S only in the post-prandial period. We conclude that smoking may blunt the PLTP antiatherogenic properties, like the stimulation of cholesterol efflux, the formation of pre β -HDL and of large α -HDL rich in CE, providing anti-oxidants to LDL (42).

In the present study, despite the higher CETP mass found in S, there was a reduced net transfer of endogenous CE, probably driven by chemical modifications of the donor and acceptor lipoprotein pools as well as by reductions in HL and PLTP activities, in accordance to Mero et al (43). The combination of the higher TG and HDL₃-PL levels compensated partially for the lower CETP activity. Corroborating with this hypothesis, the endogenous CETP activity was positively associated with TG.

There was also as expected, a negative association of CETP mass with HDL₃ - unesterified cholesterol only in S. CETP mass was associated with PL, and that is in agreement with the fact that HDL enriched in PL is a better substrate for CETP (44). The high correlation seen in this study between the two methods ($r=0.90$) used for CETP measurement, suggests that the endogenous assay depends far more on the CETP mass than on the concentrations of the CETP substrates.

CETP also mediates the bidirectional transfer of oxidized lipids between LDL and HDL (45). Tall et al (46) and Chiba et al (47) demonstrated in CETP-deficient patients higher levels of oxidized LDL. On the other hand, Castilho et al (48) showed that the reverse transfer of CE from oxidized LDL to HDL was about 1.4 to 3.6-fold greater than from native LDL, leading

to a reduced CE net transfer. Data from our laboratory indicated that smokers have higher levels of oxidized LDL (submitted to the Am J Cardiol). Since the endogenous assay is dependent on the composition and quantity of HDL and of acceptor lipoproteins (49) it is likely that the latter are chemically modified by smoking, reducing their transfer capacity.

Low plasma cholesteryl ester transfer protein has been associated with atherosclerosis (50) in a complex relationship. In several studies in patients presenting CETP deficiency premature atherosclerosis was present (51).

Dullaart et al (25) suggested that the higher levels in CETP activity observed in smokers could be due to a higher inhibition of lipid transfer inhibitor protein activity. In this study, for the first time, LTIP activity was measured in smokers and was shown similar to controls. A negative correlation between LTIP and apo-AI was observed only in S suggesting an inhibitory effect of this apolipoprotein on LTIP. We did not find the inverse relationship described by others between TG and LTIP (52); nevertheless, the TG upper level in our study was below 150 mg/dL. Also, it is not known whether LTIP plays any role in atherosclerosis.

CETP in conjunction with HL transforms large HDL particles into small ones, a process that has an antiathrogenic role (53). It has been suggested also that HDL-TG hidrolisis by HL facilitates CETP-mediated transfer of TG from VLDL to HDL in exchange for CE. As well phospholipid transfer mediated by PLTP has an important place in the reverse cholesterol pathway. Studies *in vitro* show that PLTP enhances the CE transfer activity of CETP (54) and phospholipid-enriched

HDL are better substrates for CETP than phospholipid-poor HDL. In the present study, PLTP correlated positively with CETP only in smokers. Since α -HDL is the substrate for PLTP and CETP, their activities could be modified by any chemical changes in this lipoprotein pool.

We conclude that in this group of smokers, in which a large number of components of the reverse transport cholesterol was studied, the simultaneous changes of the regulator proteins, that is, decreased HL, PLTP and CETP activities-generate less pre β -HDL particles, favoring a reduced reverse cholesterol transport, a pro-atherogenic situation. The α -HDL particles likely generated, are relatively poor in CE, and consequently can not be good substrates for cholesteryl ester transfer protein. Surprisingly, but novel informations, the CETP mass was increased and the activity of LTIP was not altered by smoking.

In conclusion, taken together the results of this study show that in normolipidemic smokers several metabolic changes occurred along the pathways of the reverse cholesterol transport system that help explaining the atherogenicity of smoking.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge Dr. Laurent Lagrost for the CETP measurements. We thank the technical assistance of M. Danelon. This work was supported in part by grants from the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*: 99/07446-5.

REFERENCES

- (1) Goldstein LB, Adams R, Becker K, Furberg CD, Gorelick PB, Hademenos G, Hill M, Howard G, Howard VJ, Jacobs B, Levine SR, Mosca L, Sacco RL, Sherman DG, Wolf PA, del Zoppo GJ. Primary prevention of ischemic stroke: A statement for healthcare professionals from the Stroke Council of the American Heart Association. *Circulation* 2001;103(1):163-182
- (2) Smith CJ, Fischer TH. Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2001;158(2):257-267
- (3) Mero N, Van Tol A, Scheek L.M, Van Gent T, Labeur C, Rosseneu M, Taskinen MR. Decreased postprandial high density lipoprotein cholesterol and apolipoproteins A-I and E in normolipidemic smoking men: relations with lipid transfer proteins and LCAT activities. *J Lipid Res.* 1998;39(7):1493-1502
- (4) Craig WI, Palomaki GE, Haddow JE. Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data. *Br Med J* 1989;298:784-788
- (5) Leonard MB, Lawton K, Watson ID, MacFarlane I. Free radical activity in young adult cigarette smokers. *J Clin Pathol* 1995;48:385-387
- (6) Bruce C, Chouinard RA Jr, Tall AR. Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Annu Rev Nutr* 1998;18:297-330
- (7) Morton RE, Nunes V, Izem L, Quintao E. Markedly elevated lipid transfer inhibitor protein in hypercholesterolemic subjects is mitigated by plasma triglyceride levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(10):1642-1649
- (8) Freeman DJ, Caslake MJ, Griffin BA, Hinnie J, Tan CE, Watson TD, Packard CJ, Shepherd J. The effect of smoking on post-heparin lipoprotein and hepatic lipase, cholesteryl ester transfer protein and lecithin:cholesterol acyl transferase activities in human plasma. *Eur J Clin Invest.* 1998;28(7):584-591
- (9) Chen C, Loo G. Inhibition of lecithin: cholesterol acyltransferase activity in human blood plasma by cigarette smoke extract and reactive aldehydes. *J Biochem Toxicol* 1995;10(3):121-128
- (10) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285(19):2486-2497
- (11) Ehnholm C, Kuusi T. Preparation, characterization, and measurement of hepatic lipase. *Methods Enzymol* 1986;129:716-738
- (12) Feyerabend C, Russell MA. A rapid gas-liquid chromatographic method for the determination of cotinine and nicotine in biological fluids. *J Pharm Pharmacol* 1990;42(6):450-452
- (13) Clauss, A. Gerinnungsphysiologische schnellmethode zur bestimmung. *Acta Haematol* 1957;17:237
- (14) Bronzert TJ, Brewer HB Jr. New micromethod for measuring

- cholesterol in plasma lipoprotein fractions. Clin Chem 1977;23(11):2089-2098
- (15) Dobiasová, M. Lecithin cholesterol acyltransferase and the regulation of endogenous cholesterol transport. Adv Lipid Res 1983;20:107-194
- (16) Guerin M, Dolphin PJ, Chapman MJ. A new in vitro method for the simultaneous evaluation of cholesteryl ester exchange and mass transfer between HDL and apoB-containing lipoprotein subspecies. Identification of preferential cholesteryl ester acceptors in human plasma. Arterioscler Thromb 1994;14(2):199-206
- (17) Lagrost L. Determination of the mass concentration and the activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP). Methods Mol Biol 1998;110:231-241
- (18) Damen J, Regts J, Scherphof G. Transfer of [14C]phosphatidylcholine between liposomes and human plasma high density lipoprotein. Partial purification of a transfer-stimulating plasma factor using a rapid transfer assay. Biochim Biophys Acta. 1982;712(3):444-452
- (19) Benowitz NL. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. Epidemiol Rev 1996;18(2):188-204
- (20) Woodward M, Tunstall-Pedoe H, Smith WC, Tavendale R. Smoking characteristics and inhalation biochemistry in the Scottish population. J Clin Epidemiol 1991;44(12):1405-1410
- (21) Wolfbauer G, Albers JJ, Oram JF. Phospholipid transfer protein enhances removal of cellular cholesterol and phospholipids by high-density lipoprotein apolipoproteins. Biochim Biophys Acta 1999;1439(1):65-76
- (22) Perova NV, Shcherbakova IA, Nechaev AS, Nikitina NA, Metel'skaia VA. [Indicators of the atherogenic properties of plasma lipoproteins and coronary atherosclerosis (selective angiography data)]. Kardiologiya 1985;25(10):91-95
- (23) Moriguchi EH, Fusegawa Y, Tamachi H, Goto Y. Effects of smoking on HDL subfractions in myocardial infarction patients: effects of lecithin:cholesterol acyl transferase and hepatic lipase. Clinica Chimica Acta 1990;195:139-144
- (24) Dirican M, Sarandol E, Ulukaya E, Tokullugil HA. Effects of smoking on serum lipid and lipoprotein concentrations and lecithin:cholesterol acyltransferase activity. J Med Invest. 1999;46(3-4):169-172
- (25) Dullaart RP, Hoogenberg K, Dikkeschei BD, van Tol A. Higher plasma lipid transfer protein activities and unfavorable lipoprotein changes in cigarette-smoking men. Arterioscler Thromb 1994;14(10):1581-1585
- (26) de Parscau L, Fielding CJ. Abnormal plasma cholesterol metabolism in cigarette smokers. Metabolism 1986;35:1070-1073
- (27) Ito T, Nishiwaki M, Ishikawa T, Nakamura H. CETP and LCAT activities are unrelated to smoking and moderate alcohol consumption in healthy normolipidemic men. Jpn Circ J 1995;59(8):541-546

- (28) Wallentin L, Vikrot O. Lecithin:cholesterol acyl transfer in plasma of normal persons in relation to lipid and lipoprotein concentration. *Scand J Clin Lab Invest* 1975;35(7):669-676
- (29) Nishida HI, Nakanishi T, Yen EA, Arai H, Yen FT, Nishida T. Nature of the enhancement of lecithin-cholesterol acyltransferase reaction by various apolipoproteins. *J Biol Chem* 1986;261(26):12028-12035
- (30) Chajek-Shaul T, Berry EM, Ziv E, Friedman G, Stein O, Scherer G, Stein Y. Smoking depresses adipose lipoprotein lipase response to oral glucose. *Eur J Clin Invest* 1990;20(3):299-304
- (31) Eliasson B, Mero N, Taskinen MR, and Smith U. 1997 The insulin resistance syndrome and postprandial lipid intolerance in smokers. *Atherosclerosis* 1997;129:79-88.
- (32) Carney RM, Goldberg AP. Weight gain after cessation of cigarette smoking. A possible role for adipose-tissue lipoprotein lipase. *N Engl J Med* 1984;310(10):614-616
- (33) Eckel RH, Sadur CN, Yost TJ. Smoking, weight change, and lipoprotein lipase. *N Engl J Med* 1984;311(4):259-260
- (34) Quensel M, Soderstrom A, Agardh CD, Nilsson-Ehle P. High density lipoprotein concentration after cessation of smoking: the importance of alteration in diet. *Atherosclerosis* 1989;75:189-193
- (35) Dugi KA, Feuerstein IM, Hill S, Shih J, Santamarina-Fojo S, Brewer HB Jr, Hoeg JM. Lipoprotein lipase correlates positively and hepatic lipase inversely with calcific atherosclerosis in homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(2):354-364
- (36) Shinomiya M, Sasaki N, Barnhart RL, Shirai K, Jackson RL. Effect of apolipoproteins on the hepatic lipase-catalyzed hydrolysis of human plasma high density lipoprotein2-triacylglycerols. *Biochim Biophys Acta* 1982;713(2):292-299
- (37) Miller GJ, Miller NE. Plasma high-density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet* 1975;1:16-19.
- (38) Cohen JC, Vega GL, Grundy SM. Hepatic lipase: new insights from genetic and metabolic studies. *Curr Opin Lipidol* 1999;10(3):259-267
- (39) Thuren T. Hepatic lipase and HDL metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2000;11(3):277-83
- (40) Hegele RA, Little JA, Vezina C, Maguire GF, Tu L, Wolever TS, Jenkins DJ, Connelly PW. Hepatic lipase deficiency. Clinical, biochemical, and molecular genetic characteristics. *Arterioscler Thromb* 1993;13(5):720-728
- (41) Hirano K, Yamashita S, Kuga Y, Sakai N, Nozaki S, Kihara S, Arai T, Yanagi K, Takami S, Menju M, et al. Atherosclerotic disease in marked hyperalphalipoproteinemia. Combined reduction of cholesteryl ester transfer protein and hepatic triglyceride lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(11):1849-1856
- (42) Mero N, Syvanne M, Eliasson B, Smith U, Taskinen MR. Postprandial elevation of ApoB-48-containing triglyceride-rich particles and retinyl

- esters in normolipemic males who smoke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(10):2096-2102.
- (43) van Haperen R, van Tol A, Vermeulen P, Jauhiainen M, van Gent T, van den Berg P, Ehnholm S, Grosveld F, van der Kamp A, de Crom R. Human plasma phospholipid transfer protein increases the antiatherogenic potential of high density lipoproteins in transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(4):1082-1088
- (44) Tall, A.R. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J. Lipid Res*. 1993;34:1255-1274
- (45) Christison JK, Rye KA, Stocker R. Exchange of oxidized cholesteryl linoleate between LDL and HDL mediated by cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res* 1995;36(9):2017-2026
- (46) Tall, A. Plasma lipid transfer proteins. *Ann Rev. Biochem* 1995;64:235-257
- (47) Chiba H, Akita H, Kotani K, Kanno T, Manabe M. [Complete cholesteryl ester transfer protein deficiency increases oxidized-LDL in plasma]. *Rinsho Byori* 1997;45(1):55-57
- (48) Castilho LN, Oliveira HC, Cazita PM, de Oliveira AC, Sesso A, Quintao EC. Oxidation of LDL enhances the cholesteryl ester transfer protein (CETP)-mediated cholesteryl ester transfer rate to HDL, bringing on a diminished net transfer of cholesteryl ester from HDL to oxidized LDL. *Clin Chim Acta* 2001;304(1-2):99-106
- (49) Bruce C, Chouinard RA Jr, Tall AR. Plasma lipid transfer proteins, high density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Ann. Ver. Nutr* 1998;18:297-330.
- (50) Hirano K, Yamashita S, Matsuzawa Y. Pros and cons of inhibiting cholesteryl ester transfer protein. *Curr Opin Lipidol* 2000;11(6):589-596
- (51) Zhong S, Sharp DS, Grove JS, Bruce C, Yano K, Curb JD, Tall AR. Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J Clin Invest* 1996;97(12):2917-2923
- (52) Morton RE. Related Articles Cholesteryl ester transfer protein and its plasma regulator: lipid transfer inhibitor protein. *Curr Opin Lipidol*. 1999;10(4):321-327
- (53) Yamashita S, Maruyama T, Hirano KI, Sakai N, Nakajima N, Matsuzawa Y. Molecular mechanisms, lipoprotein abnormalities and atherogenicity of hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 2000;152(2):271-285
- (54) Lagrost L, Athias A, Gamber P, Lallemand C. Comparative study of phospholipid transfer activities mediated by cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein. *J Lipid Res* 1994;35(5):825-835

2º TRABALHO

**ANTIBODIES AGAINST OXIDIZED LOW-DENSITY LIPOPROTEIN IN
NORMOLIPIDEMIC SMOKERS**

Águeda Zaratin¹; Magnus Gidlund²; Paulo Boschcov³; Lúcia Castilho¹; Eliana de Faria¹
Department of Clinical Pathology, NMCE, UNICAMP¹; Laboratory of
Immunophysiopathology, ICB-USP and IMT-SP²; Dept. of Biophysics, Federal University
of São Paulo³, Brazil

*Address for reprints:

Eliana Cotta de Faria

Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Caixa
Postal 6111, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Tel/Fax: 0055-19-32893273 or Fax: 37888925

email: cotta@fcm.unicamp.br

INTRODUCTION

Oxidative LDL damage caused by oxidants present in cigarette smoke may be involved in the pathogenesis of CHD (1), but there is a controversy in the literature regarding this subject: Gouazé et al (2) have demonstrated increased oxidizability in smokers, Siekmeier et al (3) could not confirm these results and Chen et al (4) found an antioxidant property of cigarette smoke extract by measuring its effect on LDL oxidizability *in vitro*.

We have evaluated the contribution of cigarette smoking on LDL oxidizability and plasma levels of anti OX-LDL in a well defined healthy population of normolipidemic smokers. The blood samples were drawn a few minutes after the subjects have smoked one cigarette, in order to ensure higher blood levels of oxidative products from cigarette smoke (5).

MATERIALS, METHODS AND RESULTS:

Sixty seven healthy volunteers (46% women and 54% men) were evaluated clinically before being included in the study. Thirty-one were smokers (10 women and 21 men) and thirty-six controls, (21 women and 15 men). All were normolipidemic and had body mass indexes (BMI) ≤ 27 Kg/m². The subjects from smoking group had smoked at least 10 cigarettes/day (an average of 18) for at least 1 year prior to the experiment; non smokers (controls) had never smoked. Blood samples were drawn in the fasting period a short time (up to 10 minutes) after the smokers had smoked 1 cigarette and they did not refrain from smoking the night before. In a sub-group of individuals, (10 male smokers and 9 male controls) a larger

blood sample was drawn for lipoprotein fractionation.

All procedures followed were in accordance with the Ethical Committee of the School of Medicine of the University of Campinas.

HDL-cholesterol was measured in the plasma supernatant after precipitation of apoB containing lipoproteins with dextran sulphate and MgCl₂ (6) and LDL-cholesterol was estimated by the Friedewald equation (7). Cholesterol and triglyceride were analysed by enzymatic methods (Merck).

LDL susceptibility to oxidation was measured in a sub-group (10 smokers and 9 controls) after its separation from plasma by sequential preparative ultracentrifugation at the density range to $1.019 < d < 1.063$ g/mL adjusted with KBr (8). One part of LDL was desalted by dialysis against phosphate-buffered saline (PBS) with ethylenediaminetetraacetic acid (control sample) and kept at 4 °C for 72 hours. Another part was dialysed without ethylenediaminetetraacetic acid and this LDL fraction (100 µg protein) was then incubated with CuSO₄ (10 µM) during 8 h in an opened tube in a bath shaker at 37 °C. The reaction was stopped by adding ethylenediaminetetraacetic acid (1 mM). The samples were dialysed further in order to remove the copper residues. The oxidizability of the resulting LDL was evaluated by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay, that measures aldehyde formation (9) and the results were expressed in nmols of malondialdehyde / 100 µg LDL protein.

The antibodies against OX-LDL (anti OX-LDL) were evaluated in all participants by ELISA (10): diluted sera samples were incubated at 4 °C for 18 h in microtiter plates pre-coated with copper-oxidized LDL. After washing with PBS the

remaining free surface in the wells was blocked with a 5% solution of powder unskimmed milk (Molico/Nestlé) (in PBS) for 2 h at room temperature. The wells were washed again and PBS was added to sera at [1:200] (sub-group 1), [1:250] and [1:500] (sub-group 2) and incubated for 18 h. The wells were washed with 0.02% Tween-20 (in PBS) and incubated with anti-IgG antibody (peroxidase-conjugated rabbit anti-human IgG) at room temperature for 1 h with a subsequent wash. Tetramethylbenzidine/ dimethyl sulfoxide (6.5%, 75 μ L) was added in the wells for 7 min. Color development was stopped by adding sulfuric acid (10%, 25 μ L) and the optical density of the samples was read in a photometric plate reader at 460 nm. The results are presented as percentages of the optical density readings relative to the group ranked values.

Differences between the groups were determined by the Mann-Whitney test. Spearman test was used to correlate the variables. The tests were considered significant at the p level of 0.05 or less.

Table 1 shows the clinical and biochemical data for the groups. Both groups were very similar in their anthropometric characteristics, except for

the waist/hip ratio, that was slightly higher (4%) in smokers' group. They were healthy, not obese and presented no centripetal fat distribution. Lipids and lipoproteins measurements were found to be within the reference ranges and were not different between smokers and controls. Likewise, no present or previous record of cardiovascular disease was found in the participants' history.

The TBARS values for smokers and non-smokers sera and even though the smokers' values tended to be higher, the observed difference was not statistically significant (data not shown). TBARS values correlated positively with waist/hip ratio in smokers ($r=0.70$, $p=0.03$).

The levels of antibodies against OX-LDL were significantly lower in smokers than in non-smokers, as shown in Fig.1. Most interestingly when the smokers were separated by sex (Table 2) this difference could be accounted for the female population, that showed a 31% decrease in OX-LDL antibody activity. No significant correlations were found involving autoantibodies anti OX-LDL.

TABLE 1 – ANTHROPOMETRIC AND BIOCHEMICAL AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF SMOKERS AND CONTROLS

PARAMETERS	SMOKERS	CONTROLS
	n = (31)	n = (36)
Age (years)	31 ± 2	28 ± 1
BMI (Kg/m ²)*	22.8 ± 0.4	23.0 ± 0.4
Waist/hip	0.82 ± 0.01 ‡	0.79 ± 0.01
Blood Pressure (Sistolic)(mmHg)	115 ± 2	116 ± 2
(Diastolic)(mmHg)	75 ± 1	76 ± 1
Number of cigarettes/day	18 ± 1	-
Smoking time (years)	13 ± 1.6	-
Total serum cholesterol (mg/dL)	164 ± 4	172 ± 4
Triglyceride (mg/dL)	101 ± 8	86 ± 7
HDL-cholesterol (mg/dL)	46 ± 2	49 ± 2
LDL-cholesterol (mg/dL)	99 ± 4	106 ± 4

Data presented as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical comparisons between smokers and controls by Mann-Whitney test: ‡p ≤ 0.05

TABLE 2 – LEVELS OF PLASMA AUTOANTIBODIES AGAINST OXIDIZED LDL SEPARATED BY SEX IN SMOKERS AND CONTROLS

PARTICIPANTS	Anti OX-LDL (percentage)	
	SMOKERS (n)	CONTROLS (n)
Men	40 ± 5 (21)	35 ± 3 (15)
Women	33 ± 4 (10) ‡‡	48 ± 3 (21)
Both sexes	37 ± 4 (31) ‡	45 ± 3 (36)

Data presented as mean ± standard error of the mean (SEM) (n = number of subjects). Statistical comparison by Mann-Whitney test (‡p ≤ 0.05) (‡‡p ≤ 0.01)

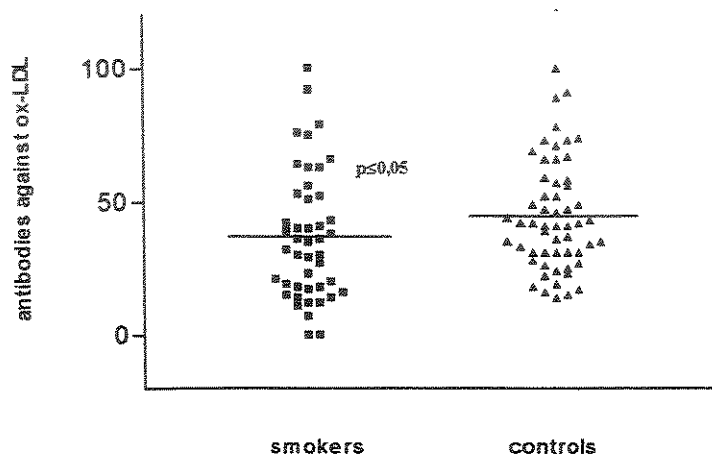


FIGURE 1- Dot plot of plasma levels of autoantibodies anti OX-LDL in smokers and controls. The horizontal lines represent the means. Statistical comparison by Mann-Whitney test ($^{\dagger}p \leq 0.05$)

DISCUSSION

Immediately after smoking one cigarette, the smokers in this study presented an LDL oxidizability to copper oxidation, similar to non-smokers. However their plasma autoantibodies against oxidized LDL were lower. This is the first time such results have been obtained in smokers.

No correlations were found between the number of cigarettes smoked a day, the duration of the smoking habit, and LDL oxidizability or OX-LDL antibody titers, for either sex, in this study. OX-LDL was positively correlated with waist/hip ratio in smokers, being high waist/hip ratios associated with increased risk of cardiovascular disease (11). This association suggests a metabolic link with oxidizability in smokers.

There can be more than one reason for the equal oxidizability in the groups. One is the fact that the sensitivity of the assay is not high enough to discriminate subtle differences that could exist. Another reason is the size of the sub-group, which was not large. A third explanation is that the assay has been done with purified LDL which could not represent the initial native LDL population, due to the presence of small amount of various sub-populations of OX-LDL.

Considering plasma autoantibodies anti OX-LDL and the atherosclerotic disease as detected either in the coronaries, carotid and/or peripheral arteries, different

associations are described in the literature: positive (12, 13), inverse (14), and absent (15). Of particular interest is the Wu et al study (13), that found decreased levels of autoantibodies in boderline hypertension, know to occur among smokers.

We hypothesized that the reduced levels of anti OX-LDL autoantibodies found in smokers in this study are a consequence of immune complexes formation with free antigen, leaving less free antibodies to be detected by the ELISA. If is true, this would indicate that there may exist a sex difference in circulating free OX-LDL that could be due to difference in susceptibility to oxidation. No studies have been done mainly due to the difficulty to measure directly the level of free circulating OX-LDL.

There are two possible interpretations of these results. One is that anti OX-LDL has a role in the clearance of OX-LDL from both the circulation and the arterial wall through the Fc receptor pathway (in the endothelial reticulum system) and is protective. Compelling indirect evidence for this comes from the influence of diet on the devolpment of the autoantobodies and progression of the atherosclerotic lesion (16) and that immunization against OX-LDL have a protective effect (17). The other is that anti OX-LDL is atherogenic, as lipoprotein immune complexes so formed can be avidly taken up by tissue macrophages leading to massive intracellular cholesteryl

ester accumulation. The present study did not look into the formation of soluble antigen-antibody complexes. It has been shown that these complexes are markers of the atherosclerotic process and could modify autoantibodies anti OX-LDL titers (18). In addition, the titers of anti-OX-LDL autoantibodies could vary along the atherosclerotic process, including the formation and stability of the atherosclerotic plaques.

Recently published studies are in accord with our results. Shoji et al (19) described in healthy subjects an inverse relation between circulating OX-LDL and anti OX-LDL and suggested that the enhanced uptake of OX-LDL immune complexes indicate a role for anti OX-LDL in maintaining the level of circulating OX-LDL low. In another study an inverse correlation was also shown between the levels of circulating anti OX-LDL antibodies and the carotid intima-media thickness, using high-resolution B-mode ultrasonography (14); the authors suggested a protective effect of the anti OX-LDL in an early stages of the lesion. Also Hulthe et al (20) have found lower anti OX-LDL titers in patients with a history of myocardial infarction, but similar levels in patients with familial hypercholesterolemia, and highlighted the complexity of the auto-immune response to OX-LDL.

Our results suggest that in normolipidemic smoking women, an increase in the formation of OX-LDL immune complexes occurs, secondary to a higher circulating level of OX-LDL.

ACKNOWLEDGEMENTS

The assistance of A. S. Pereira for the recruitment of the participants is acknowledged, as well as the excellent technical assistance of M.G.L. Valim.

This work was supported in part by grants from the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*: 99/00158-4 and 99/07446-5 and the *Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq)*.

REFERENCES

1. Hulea SA, Olinescu R, Nita S, Crocna D, Kummerow FA. Cigarette smoking causes biochemical changes in blood that are suggestive of oxidative stress: a case-control study. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1995;14:173-180.
2. Gouazé V, Dousset N, Ddousset JC, Valdiguie P. Effect of nicotine and cotinine on the susceptibility to *in vitro* oxidation of LDL in healthy non smokers and smokers. *Clin Chim Acta* 1998;277:25-37.
3. Siekmeier R, Wulfroth P, Wieland H, Gross W, Marz W. Low-density lipoprotein susceptibility to *in vitro* oxidation in healthy smokers and nonsmokers. *Clin Chem* 1996;42:524-530.
4. Chen C, Loo G. Cigarette smoke extract inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 1995 20;112:177-185.
5. Porkka KV, Ehnholm C. Smoking, alcohol and lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:162-166.
6. Bachorik PS, Albers JJ. Precipitation methods for quantification of lipoproteins. *Methods Enzymol* 1986;129:78-100.
7. Friedewald, WT, Levy RI, Fredrickson, DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-502.
8. De Lalla O, Gofman JW. Ultracentrifugal analysis of serum

- lipoproteins and proteins in man. In: Glick, D. ed. *Methods of Biochemical Analysis*. New York: Interscience Rub Inc, 1954:459-478.
9. Puhl H, Waeg G, Esterbauer H. Methods to determine oxidation of low-density lipoproteins. *Methods Enzymol* 1994;233:425-441.
10. Gidlund, Damasceno NR, Lindoso JA, Abdalla DS, Goto H. Monoclonal antibodies against low density lipoprotein with various degrees of oxidative modifications. *Braz J Med Biol Res* 1996;29:1625-1628.
11. Rimm EB, Stampfer MJ, Giovannucci E, Ascherio A, Spiegelman D, Colditz GA, Willett WC. Body size and fat distribution as predictors of coronary heart disease among middle-aged and older US men. *Am J Epidemiol* 1995;141:1117-1127.
12. Holvoet P, Mertens A, Verhamme P, Bogaerts K, Beyens G, Verhaeghe R, Collen D, Muls E, Van de Werf F. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:844-848.
13. Wu R, de Faire U, Lemne C, Witztum JL, Frostegard J. Autoantibodies to OXLDL are decreased in individuals with boderline hypertension. *Hypertension* 1999;33:53-59.
14. Fukumoto M, Shoji T, Emoto M, Kawagishi T, Okuno Y, Nishizawa Y. Antibodies against oxidized LDL and carotid artery intima-media thickness in a healthy population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:703-707.
15. Uusitupa MI, Niskanen L, Luoma J, Vilja P, Mercuri M, Rauramaa R, Yla-Herttuala S. Autoantibodies against oxidized LDL do not predict atherosclerotic vascular disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1236-1242.
16. Damasceno NRT; Goto H; Rodrigues FMD; Dias CTS; Okawabata FS; Abdalla DSP; Gidlund M. Soy protein isolated reduces the oxidizability of LDL and generation of oxidized LDL autoantibodies in rabbits with diet-induced atherosclerosis. *J Nutr* 2000;130:2641-2647.
17. Shoenfeld Y, Harats D, George J. Heat shock protein 60/65, beta 2-glycoprotein I and oxidized LDL as players in murine atherosclerosis. *J Autoimmun.* 2000;15:199-202.
18. Mustafa A, Nityanand S, Berglund L, Lithell H, Lefvert AK. Circulating immune complexes in 50-year-old men as a strong and independent risk factor for myocardial infarction. *Circulation* 2000;102:2576-2581.
19. Shoji T, Nishizawa Y, Fukumoto M, Shimamura K, Kimura J, Kanda H, Emoto M, Kawagishi T, Morii H. Inverse relationship between circulating oxidized low density lipoprotein (OX-LDL) and anti-OX-LDL antibody levels in healthy subjects. *Atherosclerosis* 2000;148:171-177.
20. Hulthe J, Wikstrand J, Lidell A, Wendelhag I, Hansson GK, Wiklund O. Antibody titers against oxidized LDL are not elevated in patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1203-1211.

CONCLUSÕES GERAIS

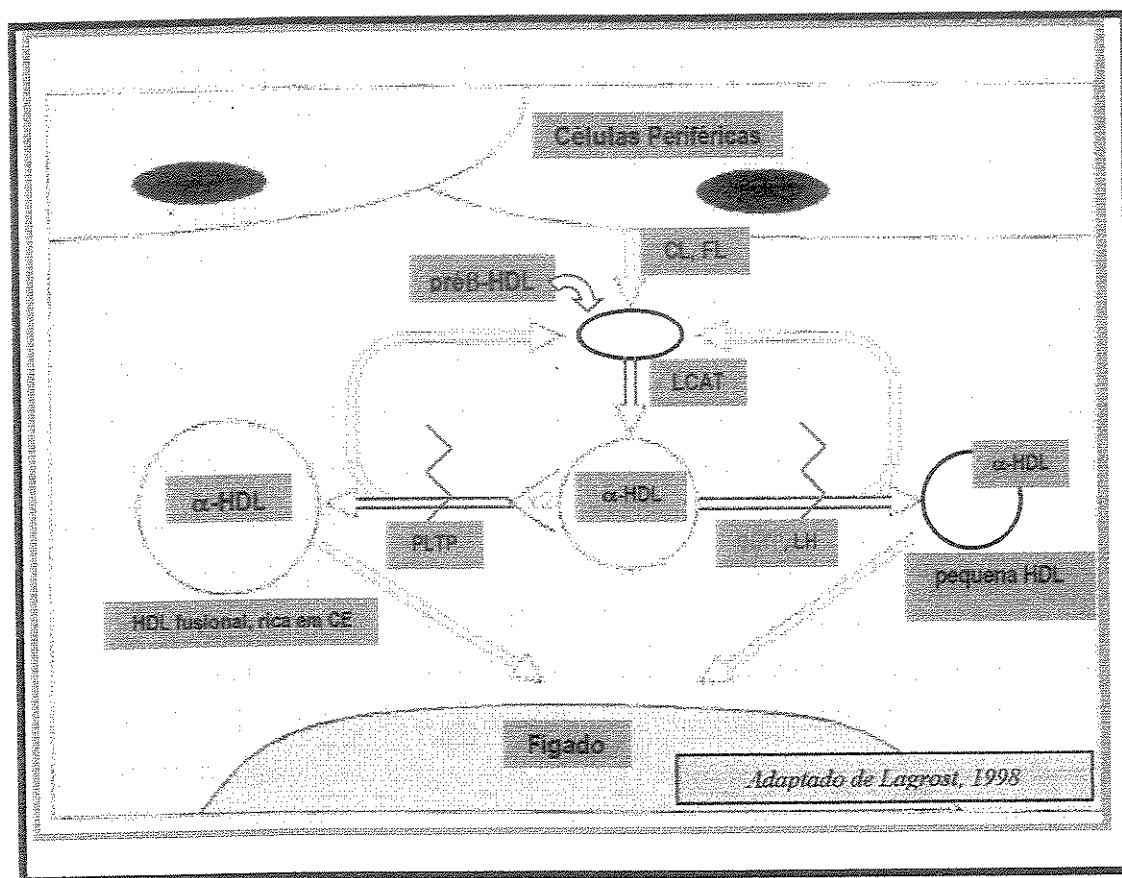
CONCLUSÕES GERAIS

Neste estudo foi possível demonstrar que o tabagismo induz a modificações no transporte reverso de colesterol e aumenta a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade.

No primeiro trabalho apresentado a atividade reduzida da lipase hepática, no contexto metabólico da diminuição da proteína de transferência de fosfolípidos encontrados nos fumantes, levam à redução da formação da fração pré-beta de lipoproteínas de alta densidade, a qual inicia o processo do transporte reverso de colesterol das células para o fígado, onde é excretado na bile ou reutilizado metabolicamente. A redução da atividade destas proteínas interfere na atividade da proteína transportadora de colesteril-éster. Acumula-se então uma lipoproteína rica em fosfolípidos. Neste trabalho houve redução relativa da atividade da proteína transportadora de colesteril-éster, pois o aumento da sua massa não foi acompanhado do aumento de atividade. Uma provável explicação para esta dissociação é a modificação química do *pool* acceptor de colesteril-éster (trabalho 2), a qual reduz a transferência líquida deste das lipoproteínas de alta densidade para lipoproteínas de baixa densidade. Excluímos também o efeito inibitório da proteína de inibição da transferência de lípidos.

Outra observação de caráter pró-aterogênico foi o aumento de fibrinogênio observado nos fumantes e que leva a um estado pró-coagulante. Da mesma forma, a variação da pressão arterial é parte do quadro pressórico oscilatório gerado pelo tabagismo.

A figura abaixo mostra um esquema da situação metabólica demonstrada neste estudo:



CE – Colesteril éster

CETP – Proteína de transferência de colesteril éster

CL – Colesterol livre

FL - Fosfolípidos

LCAT – Lecitina colesterol acil transferase

LH- Lipase hepática

PLTP – Proteína de transferência de fosfolípidos

No segundo trabalho propusemos que a redução nos níveis de anticorpos anti lipoproteínas de baixa densidade oxidadas se deva ao aumento destas na circulação com consequente formação de imunocomplexos. Os anticorpos anti lipoproteínas de baixa densidade oxidada tem função ambivalente na sua relação com a aterogênese: quando os imunocomplexos são captados pelo sistema retículo endotelial tem função anti-aterogênica retirando a lipoproteína oxidada da circulação, porém se captados por macrófagos da região sub-endotelial são pró-aterogênicos. Como o fumo provoca lesão endotelial que predispõe à migração de LDL e células mononucleares para o espaço sub-endotelial, propomos neste estudo a ação pró- aterogênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albers, J.J., Bergelin, R.O., Adolphson, J.L., Wahl, P.W. (1982). Population-based reference values for lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT). *Atherosclerosis*, 43(2-3): 369-379.
- Artho, A.J. et al. Nicotine absorption from cigarette smoke.(1986). *Zeitschrift fuer Praeventivmedizin*, v. 9, p. 14-25.
- Atkinson, D., Small, D.M. (1986). Recombinant lipoproteins implications for structure and assembly of native lipoprotein. *Annual Review of Biophysics and Biophysycal Chemistry*, 15: 403-456.
- Austin, M.A., Breslow, J.L., Hennezens, C.H., Buring, J.E., Willett, W.C., Kraemer, R.M. (1988). Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardium infarction. *Journal of the American Medical Association*, 260: 1917-1921.
- Axelsen, M., Eliasson, B., Joheim, E., Lenner, R.A., Taskinen M.R., Smith, U. (1995). Lipid intolerance in smokers. *Journal of Internal Medicine*, 237(5): 449-55.
- Ballantyne, F.C., Clark, R.S., Simpson, H.S., Ballantyne, D. (1982). High density and low density lipoprotein subfractions in survivors of myocardial infarction and in control subjects. *Metabolism*, 31: 433-437.
- Barter, P.J. et al. (1994). Role of hepatic lipase and cholesteryl ester transfer protein in HDL metabolism. *Atherosclerosis*, 109: 335.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barter, P.J., Jones, M.E. (1980). Kinetic studies of the transfer of sterified cholesterol between human-plasma low and high-density lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, 21: 238-249.
- Batlouni, M. (1997). Hipótese oxidativa da aterosclerose e emprego dos antioxidantes na doença arterial coronariana. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 68(1): 55-63.
- Beisiegel, U. (1998). Lipoprotein metabolism. *European Heart Journal*, 19: A20-A23.
- Benowitz, N.L. (1999). Nicotine addiction. *Primary Care*, 26(3):611-31.
- Benowitz, N.L. (1997). The role of nicotine in smoking-related cardiovascular disease. *Preventive Medicine*, 26(4):412-417.
- Benowitz, N.L., Jacob, P.I., Fong, I., Gupta, S. (1994). Nicotine metabolic profile in man: comparison from cigarette smoking and transdermal nicotine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 268: 296 –303.
- Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M., Frank, J.S., Demer, L.L., Edwards, P.A., Watson, A.D., Lusis, A.J. (1995). Atherosclerosis: basic mechanisms. oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*, 91: 2488-2496.
- Bisgaier, C.L., Siebenkas, M.V., Brown, M.L., Inazu, Koizumi, J., Mabuchi, H. (1991). Familial cholesteryl ester transfer protein deficiency is associated with triglyceride-rich low density lipoproteins containing cholesteryl ester of probable intracellular origin. *Journal of Lipid Research*, 32: 21-33.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blache, D., Bouthillier, D., Davignon, J. (1992). Acute influence of smoking on platelet behaviour, endothelium and plasma lipids and normalization by aspirin. *Atherosclerosis*, 93: 179-188.
- Blades, B., Vega, G.L., Grundy, S.M. (1993). Activities of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in postheparin plasma of patients with low concentrations of HDL cholesterol. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 13: 1227-1235.
- Boullier, A., Hamon, M., Walters-Laporte, E., Martin-Nizart, F., Mackereel, R., Fruchart, J.C., Bertrand, M., Duriez, P. (1995). Detection of autoantibodies against oxidized low-density lipoproteins and of IgG-bound low density lipoproteins in patients with coronary artery disease. *Clinical Chimica Acta*, 238(1):1-10.
- Braschi, S., Masson, D., Rostoker, G., Florentin, E., Athias, A., Martin, C., Jacotot, B., Gamberti, P., Lallemand, C., Lagrost, L. (1997). Role of lipoprotein-bound NEFAs in enhancing the specific activity of plasma CETP in the nephrotic syndrome. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 17:2559-2567.
- Brown, M.S. (1988). The LDL receptor concept : clinical and therapeutic considerations. *Atherosclerosis Review*, 18: 85-93.
- Brown M.S., Goldstein, J.L. (1990). Scavenging for receptors. *Nature*, 343: 508-509
- Brown, M.S. (1986). The LDL receptor concept: clinical and therapeutic implications. *Atherosclerosis Review*, 18: 85.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, 89(3): 331-340.
- Brown, M.S., Kovanen, P.T., Goldstein, J.L. (1981). Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science*, 212: 628-635.
- Bruce, C., Chouinard Jr., R.A., Tall, A.R. (1998). Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Annual Review of Nutrition*, 18: 297-330.
- Brunzell, J.D., Goldberg, A.P., Schwartz, R.S. (1980). Cigarette smoking and adipose tissue lipoprotein lipase. *International Journal of Obesity*, 4:101-103.
- Bui, M.N., Sack, M.N., Moutsatsos, G., Lu, D.Y., Katz, P., McCown, R., Breall, J.A., Rackley, C.E. (1996). Autoantibody titers to oxidized low-density lipoprotein in patients with coronary atherosclerosis. *American Heart Journal*, 131(4):663-667
- Busch, S.J., Barnhart, R.L., Martin, G.A., Fitzgerald, M.C., Yates, M.T., Mao, S.J.T., Thomas, C.E., Jackson, R.L. (1994). Human hepatic triglyceride lipase expression reduces high density lipoprotein and aortic cholesterol in cholesterol-fed transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 16376-16382.
- Carney, R.M., Goldberg, A.P. (1984). Weight-gain after cessation of cigarette-smoking – a possible role for adipose-tissue lipoprotein-lipase. *The New England Journal of Medicine*, 310: 614-616.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Casasnovas, J.A., Lapetra, A., Puzo, J., Pelegrin, J., Hermosilla, T., Devicente, J., Garza, F., Delrio, A., Giner, A., Ferreira, I.J. (1992). Tobacco, physical activity and lipid profile. *European Heart Journal*, 13:440-445.
- Celada MM, Reguero JR, Cubero GI. (1997). The interrelationship among tobacco consumption, high-density lipoprotein cholesterol and leukocyte counts. *J Cardiovasc Risk*, 1997 Aug;4(4):279-81.
- Chajek, T., Fielding, C.J. (1978). Isolation and characterization of a human serum cholesteryl ester transfer protein. *Proceedings National Academy Science USA*, 75(7):3445-3449.
- Chien, K.L., Lee, Y.T., Sung, F.C., Su, T.C., Hsu, H.C., Lin, R.S. (1999). Lipoprotein(a) level in the population in Taiwan: relationship to sociodemographic and atherosclerotic risk factor. *Atherosclerosis*, 143: 267-273.
- Clay, M.A., Newnham, H.H., Barter, P.J. (1991). Hepatic lipase promotes a loss of apolipoprotein A-I from triglyceride-enriched human high density lipoproteins during incubation *in vitro*. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 11: 415.
- Cooper AD. Hepatic uptake of chylomicron remnants. (1997). *Journal of Lipid Research*, Nov;38(11):2173-92
- Corre, F., Lellouch, J., Schwatz, D. (1971). Smoking and leucocyte counts. Results of an epidemiology study. *Lancet*, 2: 632-634.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Craig, W.Y., Palomaki G.E., Haddow, J.E. (1989). Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data. *British Medical Journal*, 298(6676):784-788.
- Cryer, P.E., Haymond, M.W., Santiago, J.V., Shah, S.D. (1976). Norepinephrine and epinephrine release and adrenergic mediation of smoking-associated hemodynamic and metabolic events. *New England Journal of Medicine*, 295(11):573-7.
- Cullen, P., Schulte, H., Assmann, G. (1998). Smoking, lipoproteins and coronary heart disease risk. Data from the Munster Heart Study (PROCAM). *European Heart Journal*, 19(11): 1632-41.
- Cushing, S.D.; Berliner, J.A.; Valente, A.J., Territo, M.C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C.J., Fogelman, A.M. (1990). Minimally modified LDL induces monocyte chemostatic protein 1 in human endothelial and smooth muscle cells. *Proceedings National Academy Science USA*, 87: 5134-5138.
- Cuvelier I, Steinmetz J, Mikstacki T, Siest G. (1985). Variations in total phospholipids and high-density lipoprotein phospholipids in plasma from a general population: reference intervals and influence of xenobiotics. *Clinical Chemistry*, May;31(5):763-6.
- Davis JW, Davis RF. Acute effect of tobacco cigarette smoking on the platelet aggregate ratio. (1979). *American Journal of Medical Science*, Sep-Oct;278(2):139-43.
- De Lala, O. Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins and proteins in man. In: *Methods of Biochemical Analysis*. Glick, D. editor. Interscience Rub. Inc., New York, v.1, p. 459-478, 1954.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- De Mills, G.L. In: A guidebook to lipoprotein technique. Elsevier, Amsterdam, p. 3, 1984.
- De Parscau, L., Fielding, C.J. (1986). Abnormal plasma cholesterol metabolism in cigarette smokers. *Metabolism*, 35: 1070-1073.
- Deckelbaum, R.J., Eisenberg, S., Oschry, Y., Granot, E., Sharon, I., Bengtssonolivecrona, G. (1986). Conversion of human plasma high density lipoprotein-2 to high density lipoprotein-3: roles of neutral lipid exchange and triglyceride lipases. *Journal of Biological Chemistry*, 261: 5201-5208.
- Dobiasova, M. (1983). Lecithin: cholesterol acyltransferase and the regulation of endogenous cholesterol transport. *Advances in Lipid Research*, 20: 107-194.
- Dullaart, R.P.F., Groener, J.E.M., Dikkeschei, B.D., Erkelens, D.W., Doorenbos, H. (1991). Elevated cholesteryl ester transfer protein activity in IDDM men who smoke. *Diabetes Care*, 14(4):338-341.
- Dullaart, R.P.F., Hoogenberg, K., Dikkeschei, B.D., Vantol, A. (1994b). Higher plasma-lipid transfer protein activities and unfavorable lipoprotein changes in cigarette-smoking men. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 14: 1581-1585.
- Dullaart, R.P.F., Sluiter, W.J., Dikkeschei, L.D., Hoogeneberg, K., Vantol, A. (1994a). Effect of adiposity on plasma-lipid transfer protein activities – a possible link between insulin-resistance and high-density-lipoprotein metabolism. *European Journal of Clinical Investigation*, 24: 188-194.
- Eckel, R.H., Sadur, C.N., Yost, T.J. (1984). Smoking, weight change, and lipoprotein-lipase. *New England Journal of Medicine*, 311: 259-260.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Eckel, Spiegelman, B., Kahn, B., Flier, J. (1989). Lipoprotein-lipase – a multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *New England Journal of Medicine*, 320(16): 1060-1068.
- Eisenberg, S. (1984). High density lipoprotein metabolism. *Journal of Lipid Research*, 25: 1017-1058.
- Eliasson, B., Smith, U., Lonnroth, P. (1997). No acute effects of smoking and nicotine nasal spray on lipolysis measured by subcutaneous microdialysis. *European Journal of Clinical Investigation*, 27(6):5 03-509.
- Emele, J.F. Pharmacology of nicotine. In: Steinfeld, J. Et al. (Editors). Proceedings of the third world conference on smoking and health, New York, June 2-5, 1975. Volume II. Health consequences, education, cessation activities, and social action. U.S. Department of health, education, and welfare, public health service, National Institute, DHEW Publication, n. 77-1413, p. 561-567, 1977.
- Ernst, E.; Resch, K.L. (1993). Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Annals of Internal Medicine*, 118: 956-963.
- Facchini, F.S. (1992). Insulin resistance and cigarette smoking. *Lancet*, 339: 1128-1130.
- Fecther, L.D., Annau, Z. (1977). Toxicity of mildprenatalcarbon monoxide exposure. *Science*, 197: 680-682.
- Fickl, H., Van Antwerpen, V.L., Richards, G.A., Van der Westhuyzen, D.R., Davies, N., Van der Walt, R., Van der Merwe, C.A., Anderson, R. (1996). Increased levels of autoantibodies to cardiolipin and oxidised low density lipoprotein are inversely

- associated with plasma vitamin C status in cigarette smokers. *Atherosclerosis*, 124(1): 75-81.
- Field, A.E., Colditz, G.A., Willett, W.C., Longcope, C., McKinlay, J.B. (1994). The relation of smoking, age, relative weight, and dietary intake to serum adrenal steroids, sex hormones, and sex hormone-binding globulin in middle-aged men. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 79(5): 1310-1316.
- Fielding, P.E., Fielding, C.J. Dynamics of lipoprotein transport in the circulatory system. In: *Biochemistry of lipid, lipoproteins and membranes*. Ed. D. E. Vance & J. Vance, New York, Elsevier, p. 427-429, 1991.
- Fless GM, Rolih CA, Scanu AM. Heterogeneity of human plasma lipoprotein (a). (1984). Isolation and characterization of the lipoprotein subspecies and their apoproteins. *Journal of Biology and Chemistry*, Sep 25;259(18):11470-8.
- Franken, R.A., Martinez, E.E., Sasso, S.W. (1980). Histoquímica da fibra muscular cardíaca em jovens e senis sob a influência da nicotina. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, 34: 289-293.
- Frati, A.C., Iniestra, F., Ariza, C.R. (1996). Acute effect of cigarette smoking on glucose tolerance and other cardiovascular risk factors. *Diabetes Care*, 19(2): 112-118.
- Freeman, D.J., Caslake, M.J., Griffin, B.A., Hinnie, J., Tan, C.E., Watson, T.D., Packard, C.J., Shepherd, J. (1998). The effect of smoking on post-heparin lipoprotein and hepatic lipase, cholesteryl ester transfer protein and lecithin:cholesterol acyl transferase activities in human plasma. *European Journal of Clinical Investigation*, 28(7):584-91.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Freemann, Griffin, B.A., Murray, Y.E., Lindsay, G.M., Gaffney, D., Packard, C.J., Sheperd, J. (1993). Smoking and plasma-lipoproteins in man – effects on low-density-lipoprotein cholesterol levels and high-density-lipoprotein subfraction distribution. *European Journal of Clinical Investigation*, 23(10): 630-640.
- Frei, B., Forte, T.M., Ames, B.N., Cross, C.E. (1991). Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoproteins properties in human blood plasma. *Biochemical Journal*, 277: 133-138.
- Gaubatz, J.W., Heideman, C., Gotto, A.M., Morrisett, J.D., Dahlen, G.H. (1983). Human – plasma lipoprotein(a) structural-properties. *Journal of Biological Chemistry*, 258: 4582.
- Gilman, A.G. The pharmacological basis of therapeutics - 9th edition. The Mc Graw Hill, p. 192-195, p. 565-566, 1996.
- Ginsberg, H.N. (1991). Lipoprotein physiology in non diabetic and diabetic states. Relationship to atherogenesis. *Diabetes Care*, 14:839-855..
- Gnasso A, Haberbosch W, Schettler G, Schmitz G, Augustin J. (1984). Acute influence of smoking on plasma lipoproteins. *Klin Wochenschr*;62 Suppl 2:36-42
- Goldberg, I.J., Vanni-Reyes, T., Ramakrishnan, S., Holleran, S., Ginsberg, H.N. (2000). Circulating lipoprotein profiles are modulated differently by lipoprotein lipase in obese humans. *Journal of Cardiovascular Risk*, 7(1):41-47.
- Goldsmith, J.R. (1967). Carbone monoxide. *Science*, 157: 842.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Goldstein, J.L., Brown, M.S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 343(6257): 425-430.
- Gotto Jr., A.M., Pownall, H.J., Havel, R.J. (1986). Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods in Enzymology*, 128: 3- 41.
- Grassi, G., Seravalle, G., Magnoni, M., Mancia, G. (2000). Effects of cigarette smoking on systemic hemodynamics. In: Sessa A, Conte F, Meroni M, Battini G, eds. Cigarette smoking and the kidney. *Contrib Nephrol. Basel: Karger*, 130: 21-30.
- Haffner, S.M., Applebaum-Bowden, D, Wahl, P.W., Hoover, J.J., Warnick, G.R., Albers, J.J., Hazzard, W.R. (1985). Epidemiological correlates of high density lipoprotein subfractions, apolipoproteins A-I, A-II, and D, and lecithin cholesterol acyltransferase. Effects of smoking, alcohol, and adiposity. *Arteriosclerosis*, 5(2):169-77.
- Harats, D., Ben-Naim, M., Dabach, Y., Hollander, G., Stein, O., Stein, Y. (1989). Cigarette smoking renders LDL susceptible to peroxidative modification and enhanced metabolism by macrophages. *Atherosclerosis*, 79(2-3): 245-52.
- Havel, R.J. (1982). Approach to the patient with hyperlipidemia. *Medical Clinics of North America*, 66:319-333.
- Havel, R.J. (1986). Functional activities of hepatic lipoprotein receptors. *Annual Review of Physiology*, 48: 119-134.
- Heinecke, J.W., Rosen, H., Chait, A. (1984). Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *Journal of Clinical Investigation*, 74(5): 1890-1894.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Heitzer, T., Yla Herttuala, S., Wild, E., Luoma, J., Drexler, H. (1999). Effect of vitamin E on endothelial vasodilator function in patients with hypercholesterolemia, chronic smoking or both. *Journal of the American College of Cardiology*, 33(2):499-505.
- Hellerstein, M.K., Benowitz, N.L., Neese, R.A., Schwartz, J.M., Hoh, R., Jacob T. 3rd, Hsieh, J., Faix, D. (1994). Effects of cigarette smoking and its cessation on lipid metabolism and energy expenditure in heavy smokers. *Journal of Clinical Investigation*, 93, 265-272.
- Henderson, H.E., Kastelein, J.J., Zwinderman, A.H., Gagne, E., Jukema, J.W., Reymers, P.W., Groenemeyer, B.E., Lie, K.I., Bruschke, A.V., Hayden, M.R., Jansen, H. (1999). Lipoprotein lipase activity is decreased in a large cohort of patients with coronary artery disease and is associated with changes in lipids and lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, 40(4):735-43
- Henriksen, T., Henriksen, T., Mahoney, E.M., Steinberg, D. (1981). Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cell: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proceedings National Academy Science USA*, 78: 6499-6503.
- Hoffman, D., Hoffman, I. Chemistry and Toxicology. In: Cigars: health effects and trends. NIH Publication # 98-4302. Chapter 3, 1998.
- Hojnacki J, Mulligan J, Cluette-Brown J, Igoe F, Osmolski T. (1986). Oral nicotine impairs clearance of plasma low density lipoproteins. *Proc Soc Exp Biol Med*, Jul;182(3):414-8.

- Hoogerbrugge, N., Zillikens, M.C., Jansen, H., Meeter, K., Deckers, J.W., Birkenhager, J.C. (1998). Estrogen replacement decreases the level of antibodies against oxidized low-density lipoprotein in postmenopausal women with coronary heart disease. *Metabolism*, 47(6): 675-680.
- Hughes K, Choo M, Kuperan P, Ong CN, Aw TC. (1998). Cardiovascular risk factors in relation to cigarette smoking: a population-based survey among Asians in Singapore. *Atherosclerosis*, Apr;137(2):253-8
- Ihm, J., Ellsworth, J.L., Chataing, B., harmony, J.A.K. (1982). Plasma protein facilitated coupled exchange of phosphatidylcholine and cholesteryl ester in the absence of cholesterol esterification. *Journal of Biological Chemistry*, 257: 4818-4827.
- Iida, M., Iida, H., Dohi, S., Takenaka, M., Fujiwara, H. (1998). Mechanisms underlying cerebrovascular effects of cigarette smoking in rats *in vivo*. *Stroke*, 29(8):1656-65.
- Ikewaki, K., Rader, D.J., Sakamoto, T., Nishiwaki, M., Wakimoto, N., Schaefer, J.R., Ishikawa, T., Fairwell, T., Zech, L.A., Nakamura, H., Nagano, M., Brewer, H.B. (1993). Delayed catabolism of high density lipoprotein apolipoprotein A-I and A-II in human cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Journal of Clinical Investigation*, 92: 1650-1658.
- Imaizumi, T., Satoh, K., Yoshida, H., Kawamura, Y., Hiramoto, M., Takamatsu, S. (1991). Effect of cigarette smoking on the levels of platelet-activating factor-like lipid(s) in plasma lipoproteins. *Atherosclerosis*, 87: 47-55.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ishikawa, S., Deguchi, T., Hara, K., Takuma, K., Tsutsumi, A., Kario, K., Igarashi, M. (1999). Lipoprotein(a) levels and apolipoprotein(a) isoforms related to life style risk factors. *Journal of Epidemiology*, 32.
- Ito, T., Nishiwaki, M., Ishikawa, T., Nakamura, H. (1995). CETP and LCAT activities are unrelated to smoking and moderate alcohol consumption in healthy normolipidemic men. *Japanese Circulation Journal*, 59(8): 541-546.
- Jacobs, D.R., Jr. Adachi, H., Mulder, I., Kromhout, D., Menotti, A., Nissinen, A., Blackburn, H. (1999). Cigarette smoking and mortality risk: twenty-five-year follow-up of the Seven Countries Study. *Archives of Internal Medicine*. 159(7):733-40.
- Jansen H, Garfinkel AS, Twu JS, Nikazy J, Schotz MC. (1978). Regulation of lipoprotein lipase immunological study of adipose tissue. *Biochimica Biophysica Acta*, Oct 25;531(1):109-14
- Jansen, H., Hulsmann, W.C. (1985). Enzymology and physiological role of hepatic lipase. *Biochememical Society Transactions*, 13(1):24-26.
- Jialal, I. (1998). Evolving lipoprotein risk factors: lipoprotein (a) and oxidized low-density lipoprotein. *Clinical Chemistry*, 44(8B):1827-1832.
- Jonas, A. (1991). Lecithin cholesterol acyltransferase in the metabolism of high density lipoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1084: 205-220.
- Jones, A.L., Hradek, G.T., Hornick, C., Renaud, G., Windler, E.E.T., Havel, R.J. (1984). Uptake and processing of remnants of chylomicrons and very low density lipoproteins by rat liver. *Journal of Lipid Research*, 25: 1151-1158.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kannel, W.B. Epidemiologic studies on smoking in cerebral and peripheral vascular disease. DHEW Publication, 1976, 257.
- Kastelein, J.J., Jukema, J.W., Zwinderman, A.H., Clee, S., Van Boven, A.J., Jansen, H., Rabelink, T.J., Peters, R.J., Lie, K.I., Liu, G., Bruschke, A.V., Hayden, M.R. (2000). Lipoprotein lipase activity is associated with severity of angina pectoris. REGRESS Study Group. *Circulation*, 102(14):1600-1601.
- Kastelein, J.J., Ordovas, J.M., Wittekoek, M.E., Pimstone, S.N., Wilson, W.F., Gagne, S.E., Larson, M.G., Schaefer, E.J., Boer, J.M., Gerdes, C., Hayden, M.R. (1999). Two common mutations (D9N, N291S) in lipoprotein lipase: a cumulative analysis of their influence on plasma lipids and lipoproteins in men and women. *Clinic Genetic*, 56(4):297-305.
- Kostner, G.M., Kinpping, G., Groener, J.E., Zechner, R., Dieplinger, H. (1987). The role of LCAT and cholesteryl transfer proteins for the HDL and LDL structure and metabolism. *Advances in Experimental Medicine Biology*, 210: 79-86.
- Kuusi, T., Kinnunen, K.J., Nikkilä, E.A. (1979). Hepatic endothelial lipase antiserum influences rat plasma low and high density lipoproteins *in vivo*. *FEBS Letters*, 104: 384-388.
- Lagrost, L. (1994). Regulation of cholesteryl ester transfer protein (CETP) activating: review of *in vitro* and *in vivo* studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1215: 209-236.
- Lagrost L, Desrumaux C, Masson D, Deckert V, Gambert P. (1998). Structure and function of the plasma phospholipid transfer protein. *Curr Opin Lipidol*, Jun;9(3):203-9.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lakier, J.B. (1992). Smoking and cardiovascular disease. *The American Journal of Medicine*, 93(1A): 8S-12S.
- Latha MS, Vijayammal PL, Kurup PA. (1993). Effect of nicotine administration on lipid metabolism in rats. *Indian J Med Res*, Feb;98:44-9
- Law, M.R., Morris, J.K., Wald, N.J. (1997). Environmental tobacco smoke exposure and ischemic heart disease: an avaluation of the evidence. *British Medicine Journal*, 315: 973-980.
- Leaf, D.A., Kleinman, M.T. (1996). Acute exposure to carbon monoxide does not affect plasma lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. *Angiology*, 47: 337-341.
- Lee, A.J., Smith, W.C.S., Lowe, G.D.O., Tunstall-Pedoe, H. (1990). Plasma fibrinogen and coronary risk factors: The Scottish Heart Health Study. *Journal of Clinical Epidemiology*, 43: 913-919.
- Lehtimäki, T., Lehtinen, S., Solakivi, T., Nikkila, M., Jaakkola, O., Jokela, H., Ylä-Herttuala, S., Luoma, J.S., Koivula, T., Nikkari, T. (1999). Autoantibodies against oxidized low density lipoprotein in patients with angiographically verified coronary artery disease. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 19:23-27.
- Lentz, P.E., Di Luzio, N.R. (1974). Peroxidation of lipids in alveolar macrophages. Production by aqueous extracts of cigarette smoke. *Archives of Environmental Health*, 28: 279-282.
- Leonard, M.B., Lawton, K., Watson, I.D., MacFarlane, I. (1995). Free radical activity in young adult cigarette smokers. *Journal of Clinical Pathology*, 48: 385-387.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Liao, J.K. (1998). Endothelium and acute coronary syndromes. *Clinical Chemistry*, 44(8B):1799-1808.
- Liu, C.S., Lii, C.K., Ou, C.C., Tsai, C.H., Wei, Y.H., Chen, H.W. (2000). Autoantibody against oxidized low-density lipoproteins may be enhanced by cigarette smoking. *Chemical Biological Interaction*, 127(2):125-137.
- Loo, C.G.C. (1995). Cigarette smoke extract inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis*, 112: 177-185.
- Luis, A. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, 407: 233-41
- Mackiewicz, A., Speroff, T., Ganapathi, M., Kushner, I. (1991). Effects of cytokine combinations on acute phase protein-production in two human hepatoma-cells-lines. *Journal of Immunology*, 146: 3032-3037.
- Mann, C.J., Yen, F.T., Grant, A.M., Bihain, B.E. (1991). Mechanism of plasma cholesteryl ester transfer in hypertriglyceridemia. *Journal of Clinical Investigation*, 88(6):2059-2066.
- Marangon, K., Herbeth, B., Artur, Y., Esterbauer, H., Siest, G. (1997). Low and very low density lipoprotein composition and resistance to copper-induced oxidation are not notably modified in smokers. *Clinica Chimica Acta*, 265(1):1-12.
- Marcel, Y.L., Vezina, C., Teng, B., Sniderman, A. (1980). Distribution and concentration of cholesteryl ester transfer protein in plasma of normolipidemic subjects. *Atherosclerosis*, 35:127-133.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- McCall, M.R., Van den Berg J.J., Kuypers, F.A., Tribble, D.L., Krauss, R.M., Knoff, L.J., Forte, T.M. (1994). Modification of LCAT activity and HDL structure. New links between cigarette smoke and coronary heart disease risk. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 14(2):248-253.
- McPherson, R., Mann, C.J., Tall, A.R., Hogue, M., Martin, L., Milne, R.W., Marcel, Y.L. (1991). Plasma concentrations of cholesteryl ester transfer protein in hyperlipoproteinemia. Relation to cholesteryl ester transfer protein activity and other lipoprotein variables. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 11(4): 797-804.
- Meade, T.W., Imerson, J., Stirling, Y. (1987). Effects of changes in smoking and other characteristics on clotting factors and the risk of ischemic heart disease. *Lancet*, 2: 986-988.
- Meade, T.W., Vickers, M.V., Thompson, S.G. (1985). Epidemiological characteristics of platelet aggregability. *British Medical Journal*, 290:428-432.
- Mero, N., Van Tol, A., Scheek, L.M., Van Gent, T., Labeur, C., Rosseneu, M., Taskinen, M.R. (1998). Decreased postprandial high density lipoprotein cholesterol and apolipoproteins A-I and E in normolipidemic smoking men: relations with lipid transfer proteins and LCAT activities. *Journal of Lipid Research*, 39(7):1493-1502.
- Midgette, A.S., Baron, J.A., Rohan, T.E. (1993). Do smokers have diets that increase their risks of coronary heart disease and cancer? *American Journal of Epidemiology*, 137: 521-529.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Miller, G.J., Miller, N.E. (1975). Plasma high-density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet*, 1:16-19.
- Miller, N.E., Hammett, F., Saltissi, S., Rao, S., Vanzeller, H., Coltart, J., Lewis, B. (1981). Relation of angiographically defined coronary-artery disease to plasma-lipoprotein subfractions and apolipoproteins. *British Medical Journal*, 282: 1741-1744.
- Mjos OD. (1988). Lipid effects of smoking. *Am Heart J*, Jan;115(1 Pt 2):272-5.
- Montalescot, G., Collet, J.P., Choussat, R., Thomas, D. (1998). Fibrinogen as a risk factor for coronary heart disease. *European Heart Journal*, 19: H11-H17.
- Moriguchi, E.H., Fusegawa, Y., Tamachi, H, Goto, Y. (1991). Effects of smoking on HDL subfractions in myocardial infarction patients: effects of lecithin-cholesterol acyltransferase and hepatic lipase. *Clinica Chimica Acta*, 195: 139-143.
- Morton, R.E. (1999). Cholesteryl ester transfer protein and its plasma regulator: lipid transfer inhibitor protein. *Current Opininnion in Lipidology*, 19:321-327.
- Morton, R.E., Greene, D.J. (1994). Regulation of lipid transfer between lipoproteins by an endogenous plasma protein: selective inhibition among lipoprotein classes. *Journal of Lipid Research*, 35(5):836-847.
- Morton, R.E., Greene, D.J. (1997). Suppression of lipid transfer inhibitor protein activity by oleate. A novel mechanism of cholesteryl ester transfer protein regulation by plasma free fatty acids. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 17(11):3041-3048.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Morton, R.E., Steinbrunner, J.V. (1993). Determination of lipid transfer inhibitor protein activity in human lipoprotein-deficient plasma. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 13(12): 1843-1851.
- Morton, R.E., Zilversmit, D.B. (1981). A plasma inhibitor of triglyceride and cholesteryl ester transfer activities. *Journal of Biological Chemistry*, 256(23): 11992-11995.
- Myant NB. (1983). The transport of cholesterol through the plasma in normal man. *Boll Soc Ital Biol Sper*, Sep 30;59(9 (Pt 2)):51-100.
- Myant, N.B. Cholesterol and related Steroids. San Diego, Academic Press., p. 465, 1990.
- Nakandakare ER, Lottenberg SA, Oliveira HC, Bertolami MC, Vasconcelos KS, Sperotto G, Quintao EC. (1994). Simultaneous measurements of chylomicron lipolysis and remnant removal using a doubly labeled artificial lipid emulsion: studies in normolipidemic and hyperlipidemic subjects. *Journal of Lipid Research*, 1994 Jan;35(1):143-52.
- Narkiewicz, K., Van der Borne, P.J., Hausbeg, M., Colley, R.L., Winniford, M.D., Davidson, D.E., Somers, V.K. (1998). Cigarette smoking increases sympathetic outflow in humans. *Circulation*, 98: 528-534.
- Newby, D.E., McLeod, A.L., Uren, N.G., Flint, L., Ludlam, C.A., Webb, D.J., Fox, K.A., Boon, C. (2001). Impaired coronary tissue plasminogen activator release is associated with coronary atherosclerosis and cigarette smoking: direct link between endothelial dysfunction and atherothrombosis. *Circulation* 103(15):1936-41

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Nishida, H.I., Arai, H., Nishida, T. (1993). Cholesterol ester transfer mediated by lipid transfer protein as influenced by changes in the charge characteristics of plasma lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 16352-16360.
- Nishide, T., Tollefson, J.H., Alberts, J.J. (1989). Inhibition of lipid transfer by a unique high density lipoprotein subclass containing an inhibitor protein. *Journal of Lipid Research*, 30: 149-158.
- Nowak, J., Murray, J.J., Oates, J.A., Fitzgerald, G.A. (1987). Biochemical evidence of a chronic abnormality in platelet and vascular function in healthy individuals who smoke cigarettes. *Circulation*, 76: 6-14.
- Palinski, W., Rosenfeld, M.E., Yla-Herttuala, S., Gurtner, G.C., Socher, S.S., Butler, S.W., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Steinberg, D., Witztum, J.L. (1989). Low density lipoprotein undergoes oxidative modification *in vivo*. *Proceedings National Academy Science USA*, 86:1372-1376.
- Parthasarathy S, Printz DJ, Boyd D, Joy L, Steinberg D. (1986). Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis*, 6: 505-510.
- Pathobiological Determinantes of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. Relationship of atherosclerosis in young men to serum lipoprotein cholesterol concentrations and smoking. *J. Am. Med. Assoc.* 1990; 264(23):3018-3024.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Patsch, J.R., Karlin, J.B., Scott, L.W., Smith, L.C., Gotto, A.M. (1983). Inverse between blood levels of high density lipoprotein subfraction 2 and magnitude of postprandial lipemia. *Proceedings National Academy Science USA USA*, 80: 1449-1453.
- Pittilo, M.R. (2000). Cigarette smoking, endothelial injury and cardiovascular disease. *International Journal of Experimental Pathology*, 81(4):219-230.
- Powell, J.T. (1998). Vascular damage from smoking: disease mechanisms at the arterial wall. *Vascular Medicine*, 3: 21-28.
- Quensel, M., Soderstrom, A., Agardh, C.D., Nilsson-Ehle, P. (1989). High density lipoprotein concentration after cessation of smoking: the importance of alteration in diet. *Atherosclerosis*, 75: 189-193.
- Quintão, E.C.R. (1989). Apolipoproteínas e aterosclerose. *Revista Brasileira de Medicina*, 46: 66-71.
- Rajavashisth, T.B., Andalibi, A., Territo, M.C., Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M., Lusis, A.J. (1990). Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low density lipoproteins. *Nature*, 344: 254-257.
- Razay G, Heaton KW. (1995). Smoking habits and lipoproteins in British women. *QJM*, 1995 Jul;88(7):503-8
- Redgrave, T.G., Zech, L.A. (1987). A kinetic-model of chylomicron core lipid-metabolism in rats: the effect of a single meal. *Journal of Lipid Research*, 28:473-482.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rennard, S.I., Daughton, D.M. (1993). Smoking reduction and biological markers of response. *Monaldi Arch. Chest Dis*, 48: 580-582.
- Ross, R. (1993a). The pathogenesis of atherosclerosis – a perspective for the 1990s. *Nature*, 362:801-809.
- Ross, R. (1993b). Atherosclerosis: a defense mechanism gone away. *American Journal of Pathology*, 143(4): 987-1002.
- Ross, R. (1998). *The New England Journal of Medicine*, 340(2): 115-126.
- Ross, R., Glomset, J.A. (1973). Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*, 180:1332-1339.
- Ross, R., Glomset, J.A. (1976). Platelet activity in pathogenesis of atherosclerosis. *New England Journal of Medicine*, 295:420-425.
- Salonen, J.T., Yla-Herttuala, S., Yamamoto, R., Butler, S., Korpela, H., Salonen, R., Nyyssonen, K., Palinski, W., Witztum, J. (1992). Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet*, 339:883-887.
- Sanderson K.J., Van Rij, A.M., Wade, C.R., Sutherland, W.H. (1995). Lipid peroxidation of circulating low density lipoproteins with age, smoking and in peripheral vascular disease. *Atherosclerosis*, 118(1): 45-51.
- Sanz, E.J., Cazorro, A.M., Bellido, A.L., Martin, I.M.L. (1996). Cigarette consumption and lipoprotein (a) concentrations. *Clinical Chemistry*, 42(3):479.

- SÃO PAULO (ESTADO). *Secretaria do Estado de São Paulo. Relatório Final sobre Tabagismo*, dezembro de 1995.
- Scanlon, C.E., Berger, B., Malcom, G., Wissler, R.W. (1996). Evidence for more extensive deposits of epitopes of oxidized low density lipoprotein in aortas of young people with elevated serum thiocyanate levels. PDAY Research Group. *Atherosclerosis*, 121(1): 23-33.
- Scheffler E, Huber L, Fruhbis J, Schulz I, Ziegler R, Dresel HA. (1990). Alteration of plasma low density lipoprotein from smokers. *Atherosclerosis*, Jun;82(3):261-5
- Schenke, D.C., Carew, T.E. (1989). Initiation of atherosclerosis lesions in cholesterol-fed rabbits. I. Focal increases in arterial LDL concentrations preced development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis*, 9:908-918.
- Serrano, M., Irala, J., Palácio, M. (2000). Lipoprotein (a), tobacco use, and risk of coronary heart disease. *International Journal of Cardiology*, 74: 233-234.
- Shamburek, R.D., Nishiwaki, M., Ishikawa, T., Nakamura, H., Ikewaki, K., Zech, L.A., Rader, D.J., Brewer, H.B., Schwartz, C.C. (1993). Cholesteryl ester transfer protein-deficiency – *in vivo* metabolism of free and esterified cholesterol. *Circulation*, 88: 75.
- Shoji, T., Nishizawa, Y., Fukumoto, M., Shimamura, K., Kimura, J., Kanda, H., Emoto, M., Kawagishi, T., Morii, H. (2000). Inverse relationship between circulating oxidized low density lipoprotein (OX-LDL) and anti-OX-LDL antibody levels in healthy subjects. *Atherosclerosis*, 148(1):171-177.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sich, D., Saidi, Y., Giral, P., Lagrost, L., Egloff, M., Auer, C., Gautier, V., Turpin, G., Beucler, I. (1998). Hyperalphalipoproteinemia: characterization of a cardioprotective profile associating increased high-density lipoprotein 2 levels and decreased hepatic lipase activity. *Metabolism* 47(8):965-73.
- Siekmeier, R., Wulfroth, P., Wieland, H., Gross, W., Marz, W. (1996). Low-density lipoprotein susceptibility to in vitro oxidation in healthy smokers and nonsmokers. *Clinical Chemistry*, 42(4): 524-530.
- Sinha, A.K., Misra, G.C., Patel, D.K. (1995). Effect of cigarette smoking on lipid profile in the young. *Journal of the Association Physicians India*, 43(3):185-188.
- Siow, R.C.M., Sato, H., Mann, G.E. (1999). Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic action of bilirubin and carbon monoxide? *Cardiovascular Research*, 41: 385-394.
- Small DM, Shipley GG. (1974). Physical-chemical basis of lipid deposition in atherosclerosis. *Science*, Jul 19;185(147):222-9.
- Smith, C.J, Fischer, T.H. (2001). Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis*, 158(2):257-267.
- Smith CJ, Steichen TJ. (1993). The atherogenic potential of carbon monoxide. *Atherosclerosis*, Mar;99(2):137-49.
- Smith SJ, Cooper GR, Henderson LO, Hannon WH. (1987). An international collaborative study on standardization of apolipoproteins A-I and B. Part I. Evaluation of a

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- lyophilized candidate reference and calibration material. *Clinical Chemistry*, 1987 Dec;33(12):2240-9.
- Sparrow, C.P., Parthasarathy, S., Steinberg, D. (1989). A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 2599-2604.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., Witztum, J.L. (1989). Beyond cholesterol-modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *New England Journal of Medicine*, 320: 915-924.
- Steinbrecher, U.P., Zhang, H.F., Loughheed, M. (1984). Role of oxidatively modified in atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(2): 155-168.
- Stubbe, I., Eskilsson, J., Nilssonehler, P.(1982). High-density lipoprotein concentration increase after stopping smoking. *British Medical Journal*, 284: 1511-1553.
- Su, Y., Han, H., Giraldo, C., De Li, Y., Block, E. (1998). Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology*, 19(5): 819-825.
- Szostak-Wegierek, D., Bjorntorp, P., Marin, P., Lindstedt, G., Andersson, B. (1996). Influence of smoking on hormone secretion in obese and lean female smokers. *Obesity Research*, 4(4):321-328.
- Tall, A. R. (1995). Plasma lipid transfer proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 64: 235-257.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Tall, A.R. (1986). Plasma lipid transfer proteins. *Journal of Lipid Research*, 27(4): 361-367.
- Tall, A.R.; Sammett D.; Granot E. (1986a). Mechanisms of enhanced cholesteryl ester transfer from high density lipoproteins to apolipoprotein B-containing lipoproteins during alimentary lipemia. *Journal of Clinical Investigation*, 77: 1163-1172.
- Talmud, P.J. (2001). Genetic determinants of plasma triglycerides: impact of rare and common mutations. *Current Atherosclerosis Reports*, 3(3): 191-199.
- Tan, K.C., Shiu, S.W., Chu, B.Y. (1999). Roles of hepatic lipase and cholesteryl ester transfer protein in determining low density lipoprotein subfraction distribution in Chinese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 145(2): 273-278.
- Targher G, Alberiche M, Zenere MB, Bonadonna RC, Muggeo M, Bonora E. (1997). Cigarette smoking and insulin resistance in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, Nov;82(11):3619-24.
- Trigatti, B., Rigotti, A., Krieger, M. (2000). The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism. *Current Opinon in Lipidology*, 11:123-131.
- Tuut, M., Hense, H.W. (2001). Smoking, other risk factors and fibrinogen levels. evidence of effect modification. *Annals of Epidemiology*, 11(4):232-238.
- Van de Vijver, L.P., Steyger, R., Van Poppel, G., Boer, J.M., Kruijssen, D.A., Seidell, J.C., Princen, H.M. (1996). Autoantibodies against MDA-LDL in subjects with severe and

- minor atherosclerosis and healthy population controls. *Atherosclerosis*, 122(2): 245-253.
- Van Haperen, R., Van Tol, A., Vermeulen, P., Jauhiainen, M., Van Gent, T., Van der Berg, P., Ehnholm, S., Grosveld, F., Van der Kamp, A., De Crom, R. (2000). Human plasma phospholipid transfer protein increases the antiatherogenic potential of high density lipoproteins in transgenic mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 20(4): 1082-1088.
- Van Tits, L.J.H., De Waart, F., Hak-Lemmers, H.L.M., Van Heijst, P., De Graaf, J., Demacker, P.N.M., Stalenhoef, A.F.H. (2001). Effects of α -tocopherol on superoxide production and plasma intercellular adhesion molecule-L and antibodies to oxidized LDL in chronic smokers. *Free Radical Biology & Medicine*, 30(19): 1122-1129
- Van Tol, A., Urgert, R., De Jong-Caesar, R., Van Gent, T., Scheek, L.M., De Roos, B., Katan, M.B. (1997). The cholesterol-raising diterpenes from coffee beans increase serum lipid transfer protein activity levels in humans. *Atherosclerosis*, 132(2): 251-254.
- Vogel, R.A. (1997). Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: a review. *Clinical Cardiology*, 20:426-432.
- Wakeman, H. Recent trends in tobacco and tobacco smoke research. In: Schmeltz, I., editor. Proceedings of the symposium on the chemical composition of tobacco and tobacco smoke, 162nd National Meeting, American Chemical Society, September, 1971, Washington DC, 1972, pp.1-20, New York:Plenum Press.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Wallentin L, Fahraeus L. (1986). Cholesterol esterification rate and its relation to lipoprotein levels in plasma in normal human pregnancy. *J Lab Clin Med*, Mar;107(3):216-20.
- Wang, R. (1998). Resurgence of carbon monoxide: an endogenous vasorelaxing factor. *Canadian Journal of Pharmacology*, 76:1-15.
- Windler, E., Chao, Y., Havel, R.J. (1980). Determinants of hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants in the rat. *Journal of Biological Chemistry*, 255: 5475-5480.
- Wittman, J.C.M. (1993). Cigarette smoking and the development and progression of aortic atherosclerosis. *Circulation*, 88: 2156-2162.
- Witztum J.L. (1993). Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *British Heart Journal*, 69: S12-S18.
- Zambon, A., Brown, B.G., Deeb, S.S., Brunzell, J.D. (2001). Hepatic lipase as a focal point for the development and treatment of coronary artery disease. *Journal of Investigative Medicine*, 49(1):112-118.
- Zang, L., Stone, K., Pryor, W.A. (1995). Detection of free radicals in aqueous extracts of cigarette tar by electron spin resonance. *Free Radical Biology & Medicine*, 19:161-167.
- Zaratin A.C., Bertolami, M.C., Faludi, A.A., Rocha, J.C., Nunes, V.S., Nakandakare, E.R., Quintao, E.C., de Faria, E.C. (2001). Acute in vivo chylomicron metabolism and

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- postalimentary lipoprotein alterations in normolipidemic male smokers. *Clinical Chimica Acta*, 305(1-2): 99-105.
- Zilversmith, D.B. (1979). Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation*, 60:473-485.

