

TATIANE VANESSA DE OLIVEIRA

**Efeito da dieta rica em colesterol e gordura saturada
sobre o metabolismo da lipoproteína de alta
densidade (HDL) em hamsters**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências**

São Paulo

2010

TATIANE VANESSA DE OLIVEIRA

**Efeito da dieta rica em colesterol e gordura saturada
sobre o metabolismo da lipoproteína de alta
densidade (HDL) em hamsters**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências**

Área de Concentração: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Tatiane Vanessa de

Efeito da dieta rica em colesterol e gordura saturada sobre o metabolismo da lipoproteína de alta densidade (HDL) em hamsters / Tatiane Vanessa de Oliveira. -- São Paulo, 2010

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: Raul Cavalcante Maranhão.

Descritores: 1.Lipoproteínas HDL 2.Colesterol 3.Gordura saturada 4.Nanoemulsão 5.Citostinas

USP/FM/SBD-035/10

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Oswaldo** e **Berenice**, exemplos de
coragem, solidariedade, força, família e amor!

Obrigada pelo apoio, compreensão e amor
incondicional em todos os momentos da minha
vida que permitiram a realização deste sonho!

Ao meu irmão, **Alexandre**, que sempre me apoiou
e me incentivou em todos os meus desejos e
conquistas. Exemplo de honestidade e amizade.

Muito Obrigada!

A minha amiga-irmã, **Fernanda Maniero**, pela força, conselhos, parceria, motivação e carinho incondicional nos momentos difíceis, e principalmente por compartilhar e proporcionar momentos de alegria e descontração. Obrigada pela amizade e confiança construídas no decorrer destes anos!

A meu grande amigo, **Dennys Cintra**, exemplo de professor, pesquisador e amigo. Obrigada por me iniciar na pesquisa, pelo incentivo, auxílio e ensinamentos durante todos estes anos, e principalmente, por acreditar em mim!

“Depois de algum tempo você aprende... que bons amigos são a família que nos permitiram escolher...”

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão, pela oportunidade, pela orientação, pela confiança no meu trabalho e pelos ensinamentos ao longo desta jornada.

Ao Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo e ao funcionário Victor Debbas, do laboratório de biologia vascular do InCor/HCFMUSP, pelo auxílio e disponibilidade nas análises das atividades das proteínas de transferência.

À Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi, a Dra. Nadia Vieira Sambiase e a Marília Higuchi, pelo auxílio e disponibilidade nas análises histológicas.

A todos os funcionários do Centro de Biotério da FMUSP, especialmente Luisa e Hélio, pela colaboração, pelo fornecimento dos animais e pelo espaço concedido imprescindíveis para realização deste trabalho.

A todos os funcionários do Biotério de Experimentação do Instituto de Medicina Tropical, especialmente a Profa. Dra. Hiro Goto, pela colaboração e o espaço concedido para realização desta tese.

À Profa. Dra. Roseli Soncini, pela oportunidade, confiança, respeito, incentivo e valiosos ensinamentos que me encaminharam para a pesquisa.

À amiga Débora Deus, pelas inúmeras discussões e auxílios imprescindíveis para a elaboração desta tese, pela motivação e compreensão sempre presentes em nossas conversas e nos momentos de desabafos, e principalmente, pelo suporte emocional, momentos de descontração e valiosa amizade.

À minha grande amiga Elisângela Monteiro Pereira, pelo suporte emocional, pelas discussões e incentivo, e principalmente, pelo apoio, companheirismo e amizade nos momentos mais difíceis desta jornada.

Às amigas, Camila Góes Puk, Ana Cristina Lo Prete, Fabíola M. Filippin, Thaís Contente, Iara Kretzer, Ana Carolina Moron Gagliardi, Marina Bertato, Cristina Pio de Almeida, Vanessa Monteiro, Juliana Vinagre, Fernanda Pozzi, Tatiana Solano pelo apoio, motivação, paciência, e principalmente, pela amizade, pelas experiências compartilhadas, e pelos momentos de desabafos, risos e conforto.

Aos amigos Renato Barboza e Amanda Felipe Padoveze, pelas sugestões, discussões, conselhos, motivação e auxílio durante o início desta jornada, e principalmente pela amizade.

Às colegas e funcionárias Dra. Carmen Guilherme C. de Matos Vinagre, Dra. Claudete J. Valduga, Dra. Fátima R. Freitas, Maria da Conceição M. Latrilha e Maria das Dores, pelos ensinamentos, incentivos, e auxílios durante minha passagem pelo laboratório de metabolismo de lípidos.

À ex-secretária do laboratório de metabolismo de lípidos InCor/HCFMUSP, Sheila Loyolla pela amizade, pelo auxílio, e principalmente pela competência e eficiência nos assuntos relacionados a pós-graduação.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do InCor-HC-FMUSP pelo apoio e pela hospitalidade.

Às secretárias da pós-graduação em cardiologia da FMUSP, Eva, Juliana e Neusa, pela eficiente organização e pelo auxílio na parte burocrática do meu doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de auxílio à pesquisa.

"Somos o que fazemos, mas somos, principalmente,
o que fazemos para mudar o que somos"

Eduardo Galeano

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FÍGURAS	
RESUMO	
SUMMARY	
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Lipoproteína de alta densidade (HDL) e transporte reverso do colesterol.....	02
1.2. Lipoproteína de alta densidade (HDL), dieta hiperlipídica e aterogênese.....	08
1.3. Lipoproteínas artificiais.....	15
2. OBJETIVO.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1. Materiais.....	23
3.2. Animais.....	24
3.3. Determinação do perfil lipídico.....	26
3.4. Composição em lípidos e proteína da fração HDL de hamsters <i>Golden Syrian</i>	27
3.5. Atividade da paroxonase 1 (PON 1).....	28
3.6. Determinação da atividade da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP) e da proteína de transferência de fosfolípido (PLTP).....	29
3.7. Preparo da nanoemulsão lipídica artificial.....	30
3.8. Ensaio de transferência de colesterol livre, éster de colesterol, triglicérides e fosfolípidos de uma nanoemulsão lipídica artificial para HDL.....	31
3.9. Avaliação histológica e determinação do diâmetro interno e externo da aorta de hamsters <i>Golden Syrian</i>	32
3.10. Composição de CT, CL e EC da aorta de hamsters <i>Golden Syrian</i>	33
3.11. Avaliação histológica do fígado e determinação do diâmetro dos hepatócitos de hamsters <i>Golden Syrian</i>	33
3.12. Composição em lípidos do fígado de hamsters <i>Golden Syrian</i>	34
3.13. Análise estatística.....	35

4. RESULTADOS.....	36
4.1. Peso corporal e peso do fígado de hamsters <i>Golden Syrian</i>	37
4.2. Perfil lipídico de hamsters <i>Golden Syrian</i>	38
4.3. Composição em lípidos e proteína da fração HDL de hamsters <i>Golden Syrian</i>	40
4.4. Determinação da atividade da CETP e da PLTP.....	41
4.5. Paroxonase 1 (PON 1) e ensaio de transferência de colesterol livre, éster de colesterol, triglicérides e fosfolípidos de uma nanoemulsão lipídica artificial para HDL.....	42
4.6. Avaliação histológica, diâmetro interno e externo, e composição de CT, CL e EC, da aorta de hamsters <i>Golden Syrian</i>	43
4.7. Avaliação histológica do fígado e determinação do diâmetro dos hepatócitos de hamsters <i>Golden Syrian</i>	45
4.8. Composição em lípidos do fígado de hamsters <i>Golden Syrian</i>	47
5. DISCUSSÃO.....	49
6. CONCLUSÕES.....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA1	“ATP-binding cassette transporters A1”
ACAT	acil-colesterol-acil transferase
Apo	apolipoproteína
CETP	proteína de transferência de éster de colesterol
CL	colesterol livre
CT	colesterol total
DAC	doença arterial coronária
EC	ésteres de colesterol
FL	fosfolípidos
HDL	lipoproteína de alta densidade
HDL-C	colesterol de lipoproteína de alta densidade
HMGCoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A
ICAM-1	molécula de adesão intracelular 1
IDL	lipoproteína de densidade intermediária
LE	lipase endotelial
LCAT	lecitina-colesterol-acil transferase
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	colesterol de lipoproteína de baixa densidade
LDL-r	receptor de LDL
LH	lipase hepática
LLP	lipase lipoprotéica
PLTP	proteína de transferência de fosfolípidos
PON1	paroxonase 1
SR-B1	receptor scavenger classe B tipo 1
TG	triglicérides
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade
VCAM-1	molécula de adesão celular vascular 1

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição em nutrientes da ração comercial (controle) e da dieta hiperlipídica.....	25
Tabela 2 -	Peso corporal (inicial e final) e peso do fígado de hamsters <i>Golden Syrian</i> controle e de hamsters submetidos a dieta hiperlipídica.....	38
Tabela 3 -	Perfil lipídico (mg/dL) de hamsters controles e de hamsters submetidos à dieta hiperlipídica.....	39
Tabela 4 -	Composição em lípides e proteínas (mg/dL) da lipoproteína de alta densidade (HDL) de hamsters controle e de hamsters submetidos à dieta hiperlipídica.....	40
Tabela 5 -	Atividade da CETP e da PLTP de hamsters controle e de hamsters submetidos à dieta hiperlipídica.....	41
Tabela 6 -	Atividade da paroxonase e transferência de lípides (%) de hamsters controle e de hamsters submetidos à dieta hiperlipídica.....	43
Tabela 7 -	Diâmetro interno e externo (μm) da aorta de hamsters controle e de hamsters submetidos a uma dieta hiperlipídica durante 15 semanas.....	44
Tabela 8 -	Composição em lípides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) da aorta de hamsters controle e de hamsters submetidos à dieta hiperlipídica por 15 semanas.....	45
Tabela 9 -	Composição em lípides (mg/g de tecido) do fígado de hamsters controle e de hamsters submetidos à dieta hiperlipídica por 15 semanas.....	48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Histologia da aorta de hamster *Golden Syrian* submetidos à **(A)** Ração comercial (grupo controle) ou **(B)** Dieta Hiperlipídica: 0,5% de colesterol + 10% de óleo de coco (hematoxilina/eosina, aumento de 10x) por 15 semanas.....44
- Figura 2 -** Histologia do fígado de hamsters controle e de hamsters que receberam uma dieta hiperlipídica por 15 semanas, ilustrando a alteração no tamanho dos hepatócitos, (hematoxilina/eosina, aumento de 40x). **(A)** Controle: Ração comercial; **(B)** Dieta hiperlipídica: 0,5% de colesterol + 10% de óleo de coco.....46
- Figura 3 -** Diâmetro médio dos hepatócitos (μm) de hamsters normais e de hamsters submetidos à dieta hiperlipídica. Controle: Ração comercial (n=15); Dieta hiperlipídica: 0,5% de colesterol + 10% de óleo de coco (n=15).....47

RESUMO

RESUMO

OLIVEIRA, TV. **Efeito da dieta rica em colesterol e gordura saturada sobre o metabolismo da lipoproteína de alta densidade (HDL) em hamsters.** Tese (Doutorado). São Paulo: Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo; 2010. 84p.

A lipoproteína de alta densidade (HDL) tem várias ações protetoras contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como remover o excesso de colesterol dos tecidos periféricos. No entanto, outros aspectos do metabolismo da HDL, como o transporte de colesterol das outras classes de lipoproteínas para a HDL devem ser avaliados para verificar a sua ação protetora. Sendo assim, nosso objetivo foi verificar, em hamsters, se a dieta hiperlipídica altera fatores relacionados ao metabolismo da HDL, tais como a composição da fração HDL e a transferência simultânea de lípides para a HDL. Trinta e nove hamsters *Golden Syrian* adultos machos receberam uma dieta hiperlipídica contendo 0,5% colesterol e 10% de óleo de coco (n=20, grupo dieta hiperlipídica) ou uma ração comercial usual (n=19, grupo controle) por 15 semanas. Os animais foram sacrificados e amostras de sangue foram coletadas para determinação do perfil lipídico, atividade da paroxonase 1 (PON1), da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP) e da proteína de transferência de fosfolípides (PLTP), bem como a composição em lípides da fração HDL. A transferência simultânea de colesterol livre (CL), éster de colesterol (EC), triglicérides (TG) e fosfolípides (FL) é baseada na troca de lípides ocorrida entre uma nanoemulsão lipídica artificial, marcada radioativamente com ^{14}C -CL e ^3H -TG ou ^{14}C -FL e ^3H -EC, e a HDL. Após precipitação química da nanoemulsão e das demais lipoproteínas, a capacidade da HDL em receber lípides foi quantificada pela medida da radioatividade presente na HDL. Além disso, a aorta e o fígado dos hamsters foram coletados para a determinação da composição em lípides e para análise histológica. Em relação ao perfil lipídico o colesterol total, HDL-C, n-HDL-C, FL, CL e EC foram maiores no grupo dieta hiperlipídica comparado ao grupo controle, já a concentração de TG não diferiu entre os grupos. A concentração de CL e EC da fração HDL foram maior no grupo dieta hiperlipídica. A transferência de ^{14}C -CL, ^3H -TG, ^{14}C -FL e ^3H -EC, bem como a atividade da CETP e da PLTP foram maiores no grupo dieta hiperlipídica. A atividade da PON1 não diferiu entre os grupos. A composição de CL da aorta foi maior no grupo dieta hiperlipídica comparado ao controle, no entanto o diâmetro interno e externo da aorta não diferiu entre os grupos. No grupo dieta hiperlipídica, a composição de EC, CL, TG e FL do fígado e o diâmetro dos hepatócitos foi maior do que no grupo controle. Dessa forma, a dieta hiperlipídica, i.e., enriquecida com colesterol e gordura saturada, em hamsters, modifica a composição em CL e EC da fração HDL, a sua capacidade em receber lípides, bem como outros aspectos relacionados ao seu metabolismo, o que pode alterar as propriedades antiaterogênicas da HDL.

Descritores: Lipoproteínas HDL, colesterol, gordura saturada, nanoemulsão, hamsters.

SUMMARY

SUMMARY

OLIVEIRA, TV. **Effects of the rich diet in cholesterol and saturated fat in metabolism of the high-density lipoprotein (HDL) in hamsters.** São Paulo [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 84p.

High density lipoprotein (HDL) is known to protect against cardiovascular disease by removing the excess of cholesterol from peripheral tissues. However, other aspects of the HDL metabolism, as the transport of cholesterol of the other classes of lipoproteínas for the HDL should be sought to evaluate its protective action. Here, we tested the hypothesis whether a hyperlipidemic diet, in hamsters, alters the composition of the HDL fraction and ability of HDL to simultaneously receive lipids. Thirty-nine adult male Golden Syrian hamsters were fed hyperlipidemic diet containing 0.5% cholesterol and 10% coconut oil (n=20, hyperlipidemic diet group) or a regular chow diet (n=19, control group) for 15 wk. Then the animals were sacrificed and blood samples were collected for determination of plasma lipids, paraoxonase 1 (PON1), cholesteryl ester transfer protein (CETP) and phospholipid transfer protein (PLTP) activities, and lipids composition of the HDL fraction. Simultaneous transfer of phospholipids (PL), free cholesterol (FC), cholesteryl esters (CE) and triglycerides (TG) from an artificial lipidic nanoemulsion to HDL was performed in an in vitro assay, in which a nanoemulsion doubled labeled with either ^{14}C -FC and ^3H -TG or ^{14}C -PL and ^3H -CE was incubated with plasma and the radioactivity was counted in the HDL fraction after chemical precipitation. The aorta and the liver of the hamsters were collected for determination of the lipids composition and histological analysis. Plasma total cholesterol, HDL-C, n-HDL-C, CE, FC and PL were greater in the hyperlipidemic diet group than in the control group. However, TG levels were similar between the groups. Compared with the control group, the hyperlipidemic diet group had higher FC and CE in the HDL plasma fraction. Also, the transfer rates of ^{14}C -FC, ^3H -TG, ^{14}C -PL and ^3H -CE, CETP and PLTP were greater in the hyperlipidemic diet group compared with control group. PON1 activity was equal in both groups. The content of FC in the aorta tissue was greater in hyperlipidemic diet group, but the internal and external diameters of the aorta were equal in both groups. In hyperlipidemic diet group, the content of CE, FC, PL and TG in the liver and the diameter of the hepatocytes were greater than that measured in control group. The hyperlipidemic diet, i.e., dietary cholesterol and saturated fat, in hamsters, alters the FC and CE composition of the HDL fraction and lead to a disturbance in the ability of HDL to receive lipids. And consequently, may alter the antiatherogenic properties of this lipoprotein.

Keywords: lipoproteins HDL, cholesterol, saturated fat, nanoemulsion, hamsters.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lipoproteína de alta densidade (HDL) e transporte reverso do colesterol

A lipoproteína de alta densidade (HDL) pertence a um grupo de partículas heterogêneo, produzida pelo fígado e intestino. Apresenta densidade entre 1,063 e 1,21 g/mL, migração eletroforética alfa e é composta de 45 a 55% de proteínas, 26 a 32% de fosfolípidos, 3 a 5 % de colesterol, 15 a 20% de éster de colesterol e 2 a 7% de triglicérides. A meia vida da HDL é de cinco a seis dias, a mais longa de todas as lipoproteínas (BACHORICK et al.,1999;Jr. KWITEROVICH, 2000; BARTER et al., 2003). Dependendo do seu conteúdo lipídico, da quantidade de proteínas e, conseqüentemente, do seu tamanho, a HDL pode ser dividida em quatro subclasses: HDL1, HDL2, HDL3 e HDL4, sendo que, as populações de HDL2 e HDL3 estão presentes em maior concentração no plasma (EISENBERG, 1984). As populações HDL2 e HDL3 podem ainda ser divididas segundo a presença da apolipoproteína (apo) A-I e A-II, neste caso a HDL2 é composta principalmente por uma população que possui apo A-I e não possui apo A-II (HDL-A-I) enquanto a HDL3 é composta principalmente por uma população que possui apo A-I e apo A-II (HDL- AI/A-II) (WANG,

BRIGGS, 2004). A HDL é uma lipoproteína que está em constante remodelamento no plasma.

Apolipoproteínas na forma livre ou complexada com pequenas quantidades de lípidos são os precursores da HDL. A apo A-I, produzida pelo fígado e pelo intestino, ou ainda, proveniente do catabolismo das lipoproteínas ricas em triglicérides, uma vez presente no plasma é lipídada. A lipidação ocorre pela remoção de fosfolípidos e colesterol de tecidos hepáticos e extra-hepáticos, em um processo facilitado pelo transportador de membrana “ATP-binding cassette transporter A1” (ABCA1). Como resultado, tem-se a formação da HDL discóide (pré- β -HDL), que consiste em apolipoproteína, fosfolípido e uma menor quantidade de colesterol na forma livre (BARTER et al., 2003; WANG; BRIGGS, 2004). Além do ABCA1, outros dois transportadores de membranas, ABCG 1 e ABCG 4, tem sido classificados como mediadores do efluxo do colesterol celular para a HDL, embora não para a apo A-I pobre em lípidos (WANG et al., 2004). Em contraste ao ABCA1, o ABCG1 promove o efluxo de colesterol de macrófagos para partículas de HDL maduras (SANTOS-GALLEGO et al., 2008).

Outras apolipoproteínas, como a apo A-II, A-IV e apo E, quando presentes no plasma, também sofrem lipidação por serem capazes de causar efluxo celular de fosfolípidos e colesterol, podendo dar origem a pré- β -HDL via proteínas transportadoras (ECKARDSTEIN et al., 2001; BARTER et al., 2003).

A HDL na forma discoidal também pode ser gerada a partir dos constituintes de superfície das lipoproteínas ricas em triglicérides que, ao sofrer ação da lipase lipoproteica (LLP), liberam vesículas contendo apolipoproteína e fosfolípidos acrescidos ou não de quantidades pequenas de colesterol (BARTER et al., 2003). A pré- β -HDL continua a receber lípidos via ABCA1, mas adquire também quantidades extras de colesterol de outras lipoproteínas que contém apo B (lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e lipoproteína de densidade baixa (LDL) e de membranas celulares por processo de difusão (BARTER et al., 2003).

A pré- β -HDL é um excelente substrato para a Lecitina Colesterol Acil Transferase (LCAT), uma enzima sintetizada e secretada principalmente pelo fígado, presente na circulação ligada à superfície da HDL, cuja função é converter colesterol e isolecitinas (fosfatidilcolinas) em colesterol esterificado (SCHAEFER et al., 1982; EISENBERG, 1984; WANG; BRIGGS, 2004). A esterificação do colesterol pela LCAT ocorre com a transferência de um ácido graxo da posição -2 da lecitina para o grupo hidroxila da molécula de colesterol (LEWIS; RADER, 2005). A LCAT é ativada pela apo A-I, e uma vez ativada, a LCAT esterifica o colesterol recebido pela pré- β -HDL (WANG; BRIGGS, 2004). O resultado da ação da LCAT é a formação de um núcleo hidrofóbico na pré- β -HDL, constituído de éster de colesterol, que transforma a HDL discóide em uma forma esférica, madura, a HDL3 (WANG; BRIGGS, 2004).

A HDL3 continua a receber colesterol e fosfolípidos de membranas celulares, mediado pelo receptor scavenger classe B tipo 1 (SR-B1), presente principalmente no fígado e nos monócitos, ou por difusão (WANG; BRIGGS, 2004). Neste processo existe interação dos componentes lipídicos da HDL, principalmente fosfolípidos, com a superfície celular, favorecendo a difusão de colesterol através do receptor SR-B1, que facilita a transferência de colesterol da membrana plasmática para a partícula receptora (SCARTEZINI et al., 2003). A HDL3 também recebe colesterol e fosfolípidos provenientes da lipólise dos quilomícrons e da VLDL pela LLP, em um processo facilitado pela proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP). Assim como ocorre com a pré- β -HDL, o colesterol recebido sofre ação da LCAT, é transformado em éster de colesterol e, devido a sua hidrofobicidade, deixa a superfície da lipoproteína e passa a ocupar o centro, transformando a HDL3 em uma partícula maior, a HDL2 (ECKARDSTEIN et al., 2001).

A HDL2 realiza trocas de éster de colesterol e triglicérides com as demais lipoproteínas (quilomícron, VLDL, IDL e LDL). Este processo é mediado pela proteína de transferência de éster de colesterol (CETP), uma glicoproteína hidrofóbica produzida pelo fígado e que está presente no plasma em associação com as lipoproteínas (LEWIS; RADER, 2005). O colesterol esterificado é transferido, por meio da CETP, da HDL2 para as demais lipoproteínas ricas em triglicérides. As lipoproteínas ricas em triglicérides, por sua vez, transferem triglicérides para a HDL2. A extensão da transferência depende da concentração de cada componente lipídico na

lipoproteína doadora (GLOMSET, 1970; MARCEL et al., 1980; EISEMBERG et al., 1984). Os triglicérides recebidos pela HDL2 são os substratos para a enzima lipase hepática (LH), presente nos hepatócitos e nas células endoteliais hepáticas.

Após a lipólise da HDL2 pelas LH e lipase endotelial (LE), o colesterol dessa partícula é removido pelos receptores SR-B1, responsáveis pela captação seletiva do colesterol da HDL no fígado. A HDL2 se liga ao SR-B1 com alta afinidade, resultando na transferência seletiva do éster de colesterol do centro da HDL para compartimentos intracelulares, sem que ocorra a degradação das apolipoproteínas (WANG; BRIGGS, 2004). A ligação da HDL com o receptor SR-B1 parece ser facilitada pela ação da LH (ECKARDSTEIN et al., 2001). Esse conjunto de ações das lipases e do receptor SR-B1 resulta no remodelamento da HDL2. Como resultado originam-se partículas menores, como a pré- β -HDL ou ainda a apo A-I na forma livre ou a apo A-I pobre em lípidos, que servem como aceptores de lípidos e novamente iniciam a formação de novas partículas de HDL. A apo A-I pode ainda ser filtrada pelos rins e removida do plasma (EISENBERG, 1984; ECKARDSTEIN et al., 2001; LEWIS; RADER, 2005).

O clearance da HDL pode ocorrer por duas vias: via captação seletiva do seu conteúdo lipídico, como exposto anteriormente, ou via endocitose, com a captação e subsequente degradação da partícula inteira. Neste caso, o enriquecimento da HDL com éster de colesterol leva à formação de partículas maiores com alto conteúdo de colesterol e apo E, a HDL1, que

podem ser captada pelo fígado por meio de receptores celulares específicos (RADER, 2007).

Desta forma, direta ou indiretamente, o colesterol é retirado dos tecidos periféricos e levado para o fígado, onde pode ser reaproveitado, interagindo com outras vias metabólicas, utilizado para produção de sais biliares ou ainda excretado (SCARTEZINI et al., 2003).

Por seu efeito no metabolismo lipídico, as concentrações plasmáticas de HDL estão inversamente correlacionadas com os índices de doenças cardiovasculares (TAILLEUX et al., 2001). A HDL é responsável pelo transporte reverso do colesterol para o fígado (LEITER, 2000; BALLANTYNE et al., 2001 e ASZTALOS; SCHAEFER, 2003), um dos mais importantes fatores de proteção na aterosclerose. Neste circuito, o colesterol presente nos tecidos periféricos é transferido para o fígado e para os tecidos que produzem hormônios esteróides, onde é utilizado para síntese de lipoproteínas, sais biliares, vitamina D e hormônios (ECKARDSTEIN et al., 2001). O transporte de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado é um das importantes funções da HDL. Dessa forma, o transporte reverso evita que colesterol se acumule nas células, o que seria um grave transtorno à homeostase. O transporte reverso é um processo complexo, que envolve, nas células, enzimas que hidrolisam a ligação éster do colesterol e o sistema ABCA1 possibilitando a captação do colesterol livre pela HDL (ATTIE et al., 2001). Em relação ao compartimento plasmático, envolve as proteínas de transferência, a ação da LCAT e finalmente, os receptores celulares de lipoproteínas no fígado. Além disso, as propriedades antioxidantes,

antiinflamatórias e anticoagulantes desta lipoproteína, descobertas na última década, podem modificar substancialmente o paradigma dos mecanismos preventivos da aterosclerose (SHAH et al., 2001; TOMÁS et al., 2004, BARTER & RYE, 2006).

1.2. Lipoproteína de alta densidade (HDL), dieta hiperlipídica e aterogênese

A aterosclerose é uma doença que acomete as artérias e tem geralmente progressão lenta. É caracterizada por placas fibro-gordurosas na camada íntima, formada pela deposição de lípidos, pelo aumento da síntese de matriz extracelular e pelo infiltrado celular. A proliferação das células musculares lisas é devida provavelmente à presença de receptores para LDL nestas células (IKEDA et al., 2001) e receptores para Ox-LDL (LOX-1 - Lectinlike Ox-LDL receptor 1) nas células endoteliais da camada íntima (STEINBERG; WITZTUM, 1990)

Fisiologicamente, a migração e a atividade proliferativa das células musculares lisas são reguladas por regiões promotoras de crescimento e inibição contidas no DNA. Como fatores transcricionais atuantes nestas regiões promotoras, podemos citar: o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento básico de fibroblastos (bFgF) e a interleucina I (IL-1). Como inibidores podemos citar: o sulfato de heparan,

óxido nítrico, interferon γ (IFN- γ) e o fator de crescimento tumoral- β (TGF- β) (LIAO, 1998).

A reconstituição da parede vascular lesada, incluindo o endotélio, envolve resposta fisiológica de cicatrização com formação de uma neoíntima, envolvendo – (1) migração das células musculares lisas da camada média para a íntima; (2) subsequente multiplicação das células da íntima; e (3) síntese e deposição de matriz extracelular (BERLINIER et al., 1995).

Na placa aterosclerótica, células musculares lisas, macrófagos da camada íntima da aorta e artérias de grande calibre estão cheias de vacúolos lipídicos, muitos dos quais são constituídos por colesterol e ésteres de colesterol. Essas células têm aparência espumosa (células espumosas), e um conjunto de células espumosas na camada íntima produzem as estrias gordurosas, características do processo aterogênico. A ruptura de estrias gordurosas evoluídas (ateromas), liberando lípidos e fragmentos celulares no espaço intravascular, muitas vezes causa eventos tromboembólicos (SIMA et al., 2001).

Várias evidências indicam que a aterosclerose é um processo imunológico que envolve tanto as células da parede vascular quanto as do sangue periférico, como células mononucleares e linfócitos T. Além disso, as citocinas e fatores de crescimento desempenham papel importante na regulação dessa celularidade e na composição da matriz da parede vascular (LIBBY, 1990; LIAO, 1998; ROSS, 1999; BINDER et al., 2002; PILLARISSETTI et al., 2004; PAOLETTI et al., 2004).

Diversos fatores, como hipertensão arterial, diabetes mellitus, tabagismo e hipercolesterolemia, podem desencadear lesões no endotélio vascular iniciando o processo aterogênico. A disfunção endotelial provoca aumento da permeabilidade vascular e facilita a penetração no espaço subendotelial de lipoproteínas, como LDL pequenas e densas, remanescentes de VLDL e Lp(a). Estas lipoproteínas, quando elevadas na circulação, se ligam a proteoglicanos, aumentam seu tempo de retenção na íntima arterial e são capazes de sofrer oxidação por radicais livres produzidos por células endoteliais adjacentes, células musculares lisas ou macrófagos isolados (CHOY et al., 2004; ZIPES et al., 2005).

A LDL oxidada, altamente aterogênica, compromete o relaxamento do endotélio mediado por óxido nítrico, estimula a secreção de citocinas (interleucina-1, interleucina-6 e fator de necrose tumoral alfa) pelas células endoteliais e exerce potente ação quimiotática a monócitos (BERLINER et al., 1999; CHOY et al., 2004). Os monócitos penetram na íntima e no espaço subendotelial, se transformam em macrófagos ativados que fagocitam a LDL oxidada, formando assim as células espumosas.

A lesão endotelial pode aumentar o recrutamento de macrófagos pela secreção de proteína 1 quimioatratante para monócitos (MCP-1) e expressão de receptores celulares de superfície como E-selectina, P-selectina, molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1) (ROSS, 1999). Os macrófagos expressam em sua superfície, receptores específicos que captam a LDL oxidada, os receptores “scavenger”, que permitem o acúmulo excessivo de colesterol

esterificado no interior dessas células, sendo os principais responsáveis pelo conteúdo de colesterol da placa de ateroma.

A anormalidade no metabolismo lipídico ou dieta rica em colesterol e ácidos graxos saturados, especificamente quando superpostos a uma predisposição genética, podem desencadear o desenvolvimento do processo aterosclerótico (FARMER; TORRE-AMIONE, 2000).

A hipótese da hiperlipidemia como um fator de risco para a aterosclerose se dá principalmente pela elevação da LDL. A LDL, principalmente na forma oxidada, é um potente fator de crescimento para vários tipos de células, contribuindo desta forma para o processo inflamatório. A expressão de receptores específicos de LDL, situados na superfície da membrana plasmática celular, esta diretamente relacionada com a concentração de colesterol no plasma (HILTUNEN; YLÄ HERTTUALA, 1998a).

A redução da concentração de colesterol plasmático causa uma diminuição na progressão da aterosclerose e diminui o risco de ocorrer eventos coronarianos (STEINBERG; WITZTUM, 1990; NICHOLLS et al., 2007).

Neste contexto, a HDL reduz o efeito da LDL por remover o colesterol presente nas células da íntima arterial, via receptor ABCA1 (BARTER et al, 2003). A subpopulação de HDL menos densa e mais rica em éster de colesterol (HDL2) parece ser mais protetora que a subpopulação menor e mais densa (HDL3). Isso se deve, provavelmente, ao fato de a subpopulação de HDL2 ser composta principalmente por HDLs que contém somente apo

A-I, que são mais eficientes em receber colesterol de tecidos periféricos, via ABCA1, e também são melhores doadores hepáticos de éster de colesterol, via SR-B1, quando comparadas as HDLs que contém apo A-I e A-II (SVIRIDOV; NESTEL, 2002; RADER, 2002; MEYERS; KASHYAP, 2004). Além de retirar o excesso de colesterol celular, a HDL também atua no processo anterior a esse, impedindo que modificações oxidativas ocorram na LDL e, conseqüentemente, inibindo a captação da LDL pelos macrófagos. Ao prevenir a oxidação da LDL, a HDL também protege o endotélio dos efeitos citotóxicos da LDL-oxidada e da migração e adesão de monócitos, ambos induzidos pela LDL-oxidada (BARTER et al., 2003; RADER, 2007).

O principal mecanismo pelo qual a HDL diminui o acúmulo de peróxidos lipídicos é pela hidrólise enzimática dos hidroperóxidos dos fosfolípidos (DURRINGTON et al., 2001). A paroxonase 1 (PON1), uma enzima produzida pelo fígado e que circula em associação com a HDL, inibe a ligação de peróxidos lipídicos na LDL e também na HDL, com conseqüente limitação do desenvolvimento da aterosclerose (COSTA et al., 2005). Para exercer seu efeito antioxidante, é necessário que haja interação entre a PON1 e os lípidos oxidados, o que pode ocorrer de duas formas: uma das possibilidades é que a atividade antioxidante da PON 1 seja mediada por difusão durante a interação entre LDL e HDL, a outra e mais provável consiste na transferência dos lípidos oxidados da LDL para a HDL e posterior ação da PON1 (JAMES; DEAKIN, 2004).

Além da PON1, a HDL possui uma grande variedade de mecanismos de defesa antioxidantes, como a PON 3, que assim como a PON1 faz parte

da família das paroxonases, a apo A-I, capaz de remover lípidos oxidados da LDL para a HDL, a LCAT e a CETP, também capazes de transferir lípidos oxidados da LDL para a HDL (JAMES; DEAKIN, 2004).

Outra proteção ao processo aterosclerótico provém da capacidade da HDL de reduzir a expressão das moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1 e da E selectina, induzidas pelas citocinas nos processos inflamatórios. Essa propriedade anti-inflamatória da HDL é bastante influenciada pela composição de fosfolípidos da partícula (BARTER et al., 2003). A HDL também modula a função endotelial por promover um aumento na produção de NO por ativar a enzima NO sintetase, além de desempenhar função anti-trombogênica por inibir a agregação plaquetária (SVIRIDOV; NESTEL, 2002; RARDER, 2002; BARTER et al., 2003).

Neste contexto, têm sido muitos os esforços destinados a metodologias capazes de aumentar as concentrações plasmáticas de HDL-colesterol (HDL-C). A CETP contribui para o metabolismo das lipoproteínas e particularmente parece estar envolvida com a concentração de HDL-C (KOTAKE et al., 2002; NICHOLLS et al., 2007). A menor atividade da CETP resulta em menor troca de éster de colesterol por triglicérides e, conseqüentemente resulta em acúmulo de éster de colesterol nas partículas de HDL. Como conseqüência ocorre diminuição no catabolismo dessa lipoproteína e aumento da concentração de HDL-C.

Além das mudanças na concentração plasmática da lipoproteína, ao inibir a CETP, ocorrem também mudanças no tamanho e na composição de apolipoproteínas da HDL, que se tornam maiores e mais ricas em apo E e,

consequentemente, menos eficazes na remoção tecidual de colesterol (BRUCE et al, 1998; FORRESTER et al., 2005). A princípio, reduzir a atividade da CETP pode ter ambos os efeitos: pro e antiaterogênico.

Enquanto persistir a hipercolesterolemia, haverá adesão de monócitos, migração subendotelial de células musculares lisas e acúmulo de lípidos no interior dos macrófagos e das células musculares lisas, produzindo finalmente agregados de células espumosas na íntima, que aparecem macroscopicamente como estrias gordurosas.

A utilização de dietas suplementadas com colesterol, observada por ANITSCHKOW et al. (1913) permitiu que novos conceitos fossem estabelecidos sobre o papel dos lípidos na aterosclerose. E não só o colesterol, mas também os ácidos graxos saturados vêm sendo investigados, pois evidências clínicas e experimentais demonstram que estes lípidos também têm ação aterogênica através de mecanismos ainda não totalmente esclarecidos (SILVA 1992).

Dietas contendo elevadas concentrações de gorduras saturadas aumentam as concentrações de colesterol total (CT) e de LDL-colesterol (LDL-C), estando diretamente implicadas na alta incidência de DAC em vários países do ocidente, inclusive o Brasil (CURI et al., 2002).

Os ácidos graxos saturados tendem a elevar as concentrações de LDL-C pela supressão do receptor de LDL e conseqüente diminuição do "clearance" plasmático destas partículas (SPADY et al., 1999). Além disso, em função de sua estrutura química retilínea, os ácidos graxos saturados

facilitam a entrada de colesterol nas camadas das partículas de LDL, contribuindo para o aumento das concentrações de LDL-C.

MARMILLOT, et al. (2007) observaram que o transporte reverso do colesterol da HDL, descrito anteriormente por ser afetado pelo conteúdo de colesterol e fosfolípidos, e atividade da LCAT, é também afetado pela ingestão de gordura saturada.

1.3. Lipoproteínas artificiais

A partir dos estudos das características físico-químicas das lipoproteínas plasmáticas, foram desenvolvidos modelos de emulsões, semelhantes tanto aos Qm quanto a LDL, que são utilizadas no estudo do metabolismo das lipoproteínas (GISBURG et al., 1982; MILLER; SMALL, 1983A.; MILLER; SMALL, 1983B).

Em 1987, iniciaram-se os estudos que visam reproduzir o metabolismo da LDL através de uma nanoemulsão lipídica artificial, mas sem a parte protéica da lipoproteína (MARANHÃO et al., 1993). O objetivo principal desses estudos é o uso da nanoemulsão na investigação das dislipidemias.

A nanoemulsão lipídica artificial não tem proteína, mas ao ser injetada na circulação plasmática, em contato com as lipoproteínas naturais, adquire apo E, que pode ser reconhecida pelo receptor da LDL. A

apo E serve então de ponte para a nanoemulsão ligar-se ao receptor, sendo assim captada pela célula (MARANHÃO et al., 1993). É importante ressaltar que a LDL natural não possui apo E, ligando-se ao receptor através da sua única proteína, a apo B-100. Estudos de competição em linfócitos mostraram que a LDL natural compete com a nanoemulsão lipídica artificial pela captação celular, comprovando que a remoção de ambas se dá pelo mesmo receptor específico (MARANHÃO et al., 1997). No entanto, por paradoxal que isto possa parecer, a nanoemulsão lipídica artificial tem mais afinidade pelos receptores da LDL do que a própria LDL natural (HIRATA et al., 1999). Isto acontece porque o meio ligante ao receptor utilizado pela nanoemulsão lipídica artificial é a apo E, que tem mais afinidade pelo receptor do que a apo B-100 da LDL natural.

Em outras experiências, a nanoemulsão lipídica artificial foi injetada em indivíduos normolipidêmicos e em portadores de hipercolesterolemia (MARANHÃO et al., 1997). Nesta situação, o defeito básico consiste em receptores B, E defeituosos, o que resulta em captação deficiente da LDL e seu acúmulo no plasma (RIDKER et al., 2001). Nesses pacientes a nanoemulsão lipídica artificial foi removida muito lentamente da circulação, confirmando o comportamento esperado. Desta maneira, o comportamento da nanoemulsão lipídica artificial pode servir de ferramenta para avaliarmos o metabolismo da LDL.

Outra característica importante das nanoemulsões é que se pode variar a sua composição (MARANHÃO et al., 1986) e, desta forma, estudarmos outros aspectos do metabolismo lipídico, como a esterificação

do colesterol livre, a atividade de proteínas de transferência, o efeito de drogas hipolipemiantes, mecanismos de captação vascular, bem como aspectos qualitativos da HDL e suas relações com a fisiopatologia. Entre os aspectos qualitativos da HDL, destacamos a sua capacidade de receber colesterol como o mais fundamental, porque envolve o que talvez seja a mais crucial ação protetora da HDL, a capacidade de promover o transporte reverso do colesterol – que certamente depende da capacidade da lipoproteína de receber o colesterol e de estabilizar o “pool” de colesterol, esterificando-o.

Barter et al. (2006) e Cutri et al. (2006), têm reportado que a qualidade da partícula HDL é um fator determinante para a sua ação antiaterogênica e que devido a sua heterogeneidade, ou seja, as subpopulações e o grau de modificação oxidativa da partícula, nem sempre o aumento da concentração plasmática reflete uma maior proteção cardiovascular. Embora haja muitos estudos enfatizando aspectos não ligados simplesmente à concentração plasmática das lipoproteínas, mas também aspectos qualitativos da HDL, como a capacidade da HDL em promover efluxo celular de colesterol e suas propriedades antioxidantes e antiinflamatórias (LAMARCHE et al., 1999; LIRA et al., 2000; ASZTALOS et al., 2000; SVIRIDOV et al., 2002; UINT et al., 2003; KONTUSH; CHAPMAN, 2006), o transporte de colesterol das outras classes de lipoproteínas para a HDL está praticamente inexplorado.

Com base nesses dados, viu-se a possibilidade de utilizar a nanoemulsão lipídica artificial como modelo de lipoproteína doadora de

lípidos. Lo Prete et al. (2009) padronizou um método prático “in vitro” capaz de quantificar a capacidade simultânea da HDL em receber seus principais constituintes lipídicos: fosfolípidos (FL), colesterol livre (CL), éster de colesterol (EC) e triglicérides (TG).

Assim em nosso laboratório vários trabalhos foram realizados com o intuito de avaliar não somente a concentração da HDL, e sim de estudar uma das vias do transporte reverso do colesterol em diversas condições fisiopatológicas como: após o transplante cardíaco, DAC com e sem tratamento de estatinas, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) com e sem microalbuminúria, síndrome metabólica, síndrome do ovário policístico, síndrome da imunodeficiência adquirida, mulheres pré e pós-menopausa, jovens saudáveis, idosos, e após intervenção dietética (SEYDELL, 2007; AZEVEDO, 2007; DAMINELLI et al., 2008; STRUNZ et al., 2008; MANIERO, 2009; FEITOSA-FILHO et al., 2009; FEITOSA et al., 2009; GIRIBELA et al., 2009, PUK et al., 2009; LO PRETE et al., 2009; ROCHA et al., 2009).

Em um estudo piloto realizado em nosso laboratório, observou-se em hamsters *Golden Syrian* hiperlipidêmicos uma alteração na capacidade da HDL em receber lípidos. Julgamos então ser importante investigar no presente trabalho o efeito da dieta hiperlipídica, ou seja, dieta rica em colesterol e gordura saturada, sob aspectos envolvidos no metabolismo da HDL, tais como a composição da HDL e a sua capacidade em receber lípidos, bem como a histologia e composição em lípidos da aorta e do fígado de hamsters *Golden Syrian*, pois este apresenta o metabolismo e transporte plasmático de lípidos semelhantes ao dos seres humanos (SINGHAD et al.,

1983; SPADY et al., 1983; SPADY et al., 1986; BERRY-LORTSCH, SABLE-AMPLIS, 1981; GROOT et al., 1992; CHAPMAN; GOULINET, 1993; TSUTSUMI et al., 2001), e por ser um modelo animal nos permite avaliar e elucidar de forma mais completa e controlada as possíveis alterações no metabolismo da HDL.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

Verificar, em hamsters, se a dieta hiperlipídica altera fatores relacionados ao metabolismo da HDL, tais como a atividade antioxidante, a atividade das proteínas de transferência de éster de colesterol e fosfolípidos, a composição em lípidos da fração HDL e a sua capacidade em receber lípidos, bem como a composição em lípidos da aorta e do fígado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Os isótopos radioativos [1- ^{14}C] oleato de colesterol, [7(n)- ^3H] colesterol, [^{14}C -FL] ^{14}C -fosfatidilcolina e [^3H -TG] ^3H -triglicerídeos foram obtidos da Amersham International (Little Chalfont, Inglaterra). Os lípidos trioleína, oleato de colesterol, colesterol e fosfatidilcolina, utilizados para a o preparo da emulsão foram adquiridos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, USA). O colesterol e o óleo de coco utilizado para o preparo da dieta hiperlipídica foram obtidos, respectivamente, da Dolder AG (Basel, Suíça) e da A.Azevedo Óleos Ltda (São Paulo, Brasil). Os kits para determinação enzimática de triglicérides, colesterol total e de HDL foram obtidos da Labtest Diagnostica S. A. (Minas gerais, Brasil). Os kits para determinação da atividade da CETP e da PLTP foram obtidos da BioVision (Califórnia, USA). Os kits para determinação colesterol livre e fosfolípide foram obtidos da Wako Chemicals USA, Inc. (Virginia, USA). A ração comercial usual para hamsters da Nuvilab® (Brasil).

3.2. Animais

Foram utilizados hamsters *Golden-Syrian*, machos, pesando aproximadamente 120-160g provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), estes foram mantidos no Biotério de Experimentação do Instituto de Medicina Tropical do Hospital das Clínicas da FMUSP em ambiente com temperatura controlada a 20 °C com ciclo claro/escuro de 12h.

Os hamsters receberam uma dieta hiperlipídica constituída a partir da ração comercial em pó (Nuvilab®, Brasil), acrescida de óleo de coco e colesterol. A composição em nutrientes e ácidos graxos das dietas foi determinada no Laboratório de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz (tabela 1).

Os grupos estão descritos abaixo com suas respectivas dietas:

Grupo Controle (n=19): ração comercial durante 15 semanas;

Grupo Dieta hiperlipídica (n=20): ração comercial acrescida de 0,5% de colesterol + 10% de óleo de coco durante 15 semanas.

A dieta e a água foram oferecidas *ad libitum*. Cada animal foi pesado no mesmo período para o controle de peso e aceitação da dieta.

Após 15 semanas os hamsters foram sacrificados com injeção intraperitoneal de ketamina e xilazina (0,1 mg/kg) e punção cardíaca para realização dos procedimentos descritos abaixo.

Tabela 1. Composição em nutrientes da ração comercial (controle) e da dieta hiperlipídica.

Nutrientes (g/100g)	Controle (n=19)	Dieta Hiperlipídica (n=20)
Proteína	22,2	19,9
Carboidrato	49,1	44,0
Fibras	5,8	5,2
Lípides	4,3	13,8
Colesterol	-	0,5
Substâncias Voláteis a 105 °C	10,7	9,5
Resíduo mineral fixo	7,9	7,1
Ácidos Graxos		
Monoinsaturados	0,73	2,13
Poliinsaturados	2,78	2,81
Saturados	0,57	8,81
Calorias (kcal)	336	391

Composição realizada no Instituto Adolfo Lutz.

3.3. Determinação do perfil lipídico

O perfil lipídico sérico dos hamsters foi determinado após o consumo da dieta durante 15 semanas. As amostras de sangue venoso foram coletadas após jejum de 12h e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C para separação do soro.

Os triglicérides e colesterol total (CT) foram determinados pelo método enzimático Triglicérides GPO-ANA e Colesterol Liquiform Labtest, respectivamente, e pelo sistema de medida colorimétrica (Life Science UV/Vis Spectrophotometer, DU[®]530, Beckman). O HDL-C foi determinado pelo mesmo método utilizado para o CT, após precipitação das VLDL e LDL segundo Burnstein et al. (1970). O colesterol não HDL (n-HDL-C) foi obtido pela diferença entre o CT e o HDL-C. O colesterol livre (CL) e os fosfolípides (FL) foram determinados pelo método enzimático da Wako Chemicals, utilizando “Leitor de Microplacas” (Microplate Reader, Benchmark, Bio-RAD). E a concentração de éster de colesterol (EC) foi obtida pela diferença entre a concentração de CT e de CL do plasma.

Para controle interno de qualidade, foi utilizada a preparação estabilizada Qualitrol 1 da Labtest Diagnostica S. A.

3.4. Composição em lípides e proteína da fração HDL de hamsters *Golden Syrian*

A fração HDL foi separada por precipitação das lipoproteínas contendo apo B. Para isso, foi adicionado ao plasma, o precipitante (ácido fosfotúngstico 1,5 mmol/L e magnésio 54 mmol/L), a mistura foi agitada por 30 segundos e centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm. No sobrenadante, fração HDL, foi determinada a concentração de CL e FL pelo método enzimático da Wako Chemicals, utilizando “Leitor de Microplacas” (Microplate Reader, Benchmark, Bio-RAD). O TG foi determinado pelo método enzimático Triglicérides GPO-ANA pelo sistema de medida colorimétrica (Life Science UV/Vis Spectrophotometer, DU[®]530, Beckman). A concentração de EC foi obtida pela diferença entre a concentração de HDL-C e de CL da fração HDL. E a proteína da fração HDL foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951).

A composição em lípides e proteína da fração HDL foram expressas como mg/dL.

3.5. Atividade da paroxonase 1 (PON 1)

A atividade da PON1 foi medida pela adição de 500 µl de tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,05 contendo 2 mmol/L de CaCl₂ e 1,1 mmol/L de paraoxon (Sigma Chemical Co.) a 25 µL de soro. A amostra foi, então, distribuída em placa de 96 poços fundo chato, 200 µL por poço (em duplicata). A leitura foi feita em comprimento de onda de 405 nm e temperatura de 37°C utilizando “Leitor de Microplacas” (Microplate Reader, Benchmark, Bio-RAD). Para o cálculo da atividade, foram feitas seis leituras em intervalos de um minuto cada (MACKNESS et al., 1991). O resultado foi obtido multiplicando-se a média da variação das absorbâncias pelo fator descrito abaixo, sendo expressos em nmol. min⁻¹. mL⁻¹.

Cálculo do Fator:

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

onde,

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

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

VA (volume da amostra) = 25 µL

E (espessura do poço da placa) = 1 cm

Substituindo os valores e ajustando para as unidades internacionais temos:

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

Cálculo da Atividade:

Atividade da Paroxonase = Fator x $\Delta\text{abs}/\text{min}$ = $1163,43 \times \Delta\text{abs nmol. min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$, onde: Δabs = é média da variação das absorbâncias medidas a cada 1 minuto.

3.6. Determinação da atividade da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP) e da proteína de transferência de fosfolípide (PLTP)

A atividade da CETP e da PLTP dos hamsters foi determinada após 15 semanas de dieta comercial ou dieta hiperlipídica. As amostras de sangue venoso foram coletadas após jejum de 12h e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C para separação do soro. Os kits para determinação da atividade da CETP e da PLTP foram adquiridos da BioVision (Califórnia, USA). A fluorescência foi quantificada utilizando-se um leitor de fluorescência de placa em excitação de 456 nm e emissão de 535 nm (Spectramax, M5, Molecular Devices). Os resultados foram expressos em pmoles de lípidos neutro transferido por μL de amostra por hora (pmol/ $\mu\text{L}/\text{h}$).

A análise das atividades da CETP e PLTP foi conduzida no mesmo dia para diminuir a variabilidade do ensaio.

3.7. Preparo da nanoemulsão lipídica artificial

A nanoemulsão lipídica artificial foi preparada segundo a técnica descrita por GINSBURG et al. (1982) modificada por MARANHÃO et al. (1993). Em um frasco foram pipetados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol, diluídos em clorofórmio: metanol (2:1). Posteriormente, foram adicionados à mistura de lípidos os isótopos ^3H -éster de colesterol ($^3\text{H-EC}$) e ^{14}C -fosfatidilcolina ($^{14}\text{C-FL}$) ou ^3H -triglicerídeos ($^3\text{H-TG}$) e ^{14}C -colesterol livre ($^{14}\text{C-CL}$). Os solventes residuais foram então evaporados da mistura sob fluxo de nitrogênio e dessecação a vácuo, por 16h, a 4°C. Após a adição de 10 mL de tampão tris-HCl 0,01M, pH 8; a mistura de lípidos foi emulsificada por irradiação ultra-sônica, utilizando-se equipamento Branson, modelo 450A (Arruda Ultra-Som, São Paulo, Brasil) potência 125 watts, durante 3 horas, sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando entre 51 a 55°C. Para obtenção da nanoemulsão lipídica artificial na faixa de diâmetro e tamanho desejados, a solução lipídica foi purificada em duas etapas de ultracentrifugação (ultracentrífuga, rotor Beckman SW -41). Na primeira etapa, o material da parte superior do tubo, resultante da centrifugação a 200.000 x g por 30

minutos, a 4°C, foi removido por aspiração (1 mL) e desprezado. Ao restante do material foi adicionado brometo de potássio (KBr) ajustando a densidade para 1,21g/mL. Após a segunda centrifugação (200.000 x g por 2 horas a 4°C), a nanoemulsão foi recuperada no topo do tubo por aspiração. O excesso de KBr foi removido por diálise, contra 2 trocas de 1000 volumes tampão tris HCl 0,01 M, pH 8. Finalmente, a emulsão foi esterilizada por filtração em membrana Milipore de 0,22 µm de porosidade sob fluxo laminar e armazenada a 4°C por no máximo 15 dias.

3.8. Ensaio de transferência de colesterol livre, éster de colesterol, triglicérides e fosfolípidos de uma nanoemulsão lipídica artificial para HDL

Para o ensaio de transferência de EC, FL, CL e TG de uma nanoemulsão lipídica artificial para a HDL, foram incubados 50 µL da nanoemulsão lipídica artificial marcada radioativamente com ³H-EC e ¹⁴C-FL ou ³H-TG e ¹⁴C-CL com 200 µL de plasma por 60 minutos, a 37°C, em agitador orbital Gyromax 706R, sob agitação de 40 rpm. Após incubação, foram adicionados à mistura 250 µL de reagente de precipitação de lipoproteínas contendo apo B (sulfato de dextran 0,2%/ MgCl₂ 3M, v/v). A mistura foi agitada por 30 segundos e posteriormente centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm. Alíquotas de 250 µL do sobrenadante, contendo a

HDL, foram pipetadas em frascos de cintilação com solução cintiladora Ultima Gold e a radioatividade presente nas amostras foi quantificada em contador Beta (Liquid Scintillation Analyzer, Packard 1600 TR, Palo Alto, CA). A quantificação dos lípidos transferidos da nanoemulsão lipídica artificial para HDL plasmática foram expressas como percentagem (%) em relação à radioatividade total incubada (LO PRETE et al., 2009).

3.9. Avaliação histológica e determinação do diâmetro interno e externo da aorta de hamsters *Golden Syrian*

Após o sacrifício dos animais, foi realizado uma perfusão de 20 mL de salina e 40 mL de paraformaldeído a 4% para a fixação da artéria in vivo. Em seguida, as aortas foram dissecadas, limpas, lavadas com salina, pesadas e fixadas em formaldeído a 4 %. Após a fixação, os segmentos foram embebidos em parafina e os cortes histológicos de cada segmento foram corados com solução de hematoxilina/eosina. A determinação do diâmetro interno e externo (μm) da aorta foi medida por planimetria pelo programa computacional Image Analysis System Quantiment500+ (Leica Cambridge Ltd., Cambridge, UK).

3.10. Composição de CT, CL e EC da aorta de hamsters *Golden Syrian*

A aorta foi removida, limpa e acondicionada em solução fisiológica gelada. Em seguida, foram pesadas e maceradas deixando-as com aspecto pastoso para a extração lipídica e determinação da concentração de CT e CL como descrito previamente (DELANEY et al., 2003). O CT e o CL foram determinados pelos métodos enzimáticos da Colesterol Liquiform Labtest e da Wako Chemicals, respectivamente, e pelo sistema de medida colorimétrica (Life Science UV/Vis Spectrophotometer, DU[®]530, Beckman), Beckman). A concentração de EC foi obtida pela diferença entre a concentração de CT e a de CL.

3.11. Avaliação histológica do fígado e determinação do diâmetro médio dos hepatócitos de hamsters *Golden Syrian*

Fragments do fígado de hamsters *Golden-Syrian* foram coletados de cada animal, dissecados, limpos, lavados com salina, pesados e fixados em formaldeído a 4%. Após a fixação, os fragmentos foram embebidos em parafina e os cortes histológicos foram corados com solução contendo hematoxilina/eosina. O diâmetro médio (μm) dos hepatócitos dos hamsters normais e dos hamsters submetidos à dieta hiperlipídica foram medidos por

planimetria pelo programa computacional Image Analysis System Quantiment500+ (Leica Cambridge Ltd., Cambridge, UK).

3.12. Composição em lípides do fígado de hamsters *Golden Syrian*

O fígado foi removido, limpo e acondicionado em solução fisiológica gelada. Em seguida, os fígados foram pesados e macerados deixando-os com aspecto pastoso. As amostras foram colocadas em tubos de extração adicionando-se clorofórmio: metanol (2:1) e deixadas em repouso “overnight” para extração dos lipídeos, segundo o método de FOLCH, LEES & SLOANE (1957). Após a extração, a solução (clorofórmio: metanol) foi evaporada em nitrogênio, posteriormente foi adicionado 1 mL de clorofórmio com 1% de Triton-100, homogeneizou-se e evaporou-se a solução em banho-maria a 37°C sob N₂. As amostras foram ressuspendidas em água destilada (500 µL) e colocadas em banho-maria a 37°C sob agitação por 20 min para solubilização total dos lípides (CARR et al., 1993; DELANEY et al., 2003). O CL e o FL foram determinados pelo método enzimático da Wako Chemicals USA, Inc. (Virginia, USA). Os TG e CT foram determinados pelo método enzimático Triglicérides GPO-ANA e Colesterol Liquiform Labtest, respectivamente. Todas as determinações foram realizadas pelo sistema de medida colorimétrica (Life Science UV/Vis Spectrophotometer, DU[®]530,

Beckman). A concentração de EC foi obtida pela diferença entre a concentração de CT e a de CL.

3.13. Análise estatística

Os dados foram apresentados com média \pm desvio padrão. As diferenças entre os dados obtidos de transferência de lípidos, parâmetros bioquímicos, paroxonase, CETP, PLTP, composição em lípidos da fração HDL, aorta e fígado, diâmetro da aorta e dos hepatócitos, peso corporal inicial e final dos grupos estudados foram avaliadas pelo *teste t*, Mann Whitney test (não-paramétrico), utilizando o programa estatístico GraphPad Prism v3.02 (GraphPad Software, San Diego, CA).

A probabilidade de significância considerada foi de $p < 0,05$ em todas as comparações efetuadas.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Peso corporal e peso do fígado de hamsters *Golden Syrian*

A tabela 2 mostra o peso corporal inicial e final (após 15 semanas) e o peso do fígado dos hamsters controles e dos que foram submetidos à uma dieta hiperlipídica durante 15 semanas. A média do peso corporal inicial e final dos hamsters não diferiu entre os grupos, no entanto houve aumento no peso corporal dos animais em ambos os grupos após 15 semanas de dieta.

Os hamsters que receberam a dieta hiperlipídica apresentaram peso total do fígado e peso relativo do fígado (% peso do fígado em relação ao peso corporal final) aproximadamente 1,7 vezes maior em relação ao grupo controle ($p < 0,001$).

Tabela 2. Peso corporal (inicial e final) e peso do fígado de hamsters *Golden-Syrian* controle e de hamsters submetidos à dieta hiperlipídica.

Parâmetros	Controle (n=19)	Dieta Hiperlipídica (n=20)
Peso corporal inicial (g)	151±8	143±23
Peso corporal final (g)	239±17	224±23
Peso do Fígado (g)	8,0±1,8	13,2±1,5*
Peso relativo (% peso do fígado em relação ao peso corporal final)	3,7±0,4	6,2±0,9*

*p<0,001 vs Controle. Resultados expressos em média ± DP, *test- t* – Mann Whitney test.

4.2. Perfil lipídico de hamsters *Golden Syrian*

A tabela 3 mostra os dados da concentração sérica de CT, EC, CL, TG, FL, HDL-C, e da fração n-HDL-C (mg/dL) determinados nos hamsters controle e submetidos à dieta hiperlipídica durante 15 semanas. As concentrações séricas de CT, HDL-C e fração n-HDL-C no grupo que recebeu a dieta hiperlipídica foram aproximadamente 2, 1,8 e 2,4 vezes, respectivamente, maiores do que no grupo controle (p<0,001). A concentração das duas formas de colesterol, ou seja, CL e EC foram

maiores 167% e 145%, respectivamente, no grupo que recebeu a dieta hiperlipídica em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$). A concentração sérica de FL foi maior no grupo que recebeu dieta hiperlipídica ($p < 0,001$), no entanto a concentração de TG não diferiu entre os grupos.

Tabela 3. Perfil lipídico (mg/dL) de hamsters controle e de hamsters submetidos à dieta hiperlipídica .

Perfil lipídico	Controle (n=19)	Dieta Hiperlipídica (n=20)
Colesterol		
Total	106±24	228±55*
HDL	41±15	72±26*
n-HDL	65±34	154±56*
Colesterol Livre	30±10	80±37*
Ester de Colesterol	74±22	181±70*
Triglicérides	192±46	199±71
Fosfolípidos	218±30	332±82*

Abreviatura: HDL – lipoproteína de alta densidade. * $p < 0,001$ vs controle.

Resultados expressos em média ± DP, *test- t* – Mann Whitney test.

4.3. Composição em lípidos e proteína da fração HDL de hamsters *Golden Syrian*

A tabela 4 mostra os dados da composição em lípidos e proteína da fração HDL determinados nos hamsters controle e submetidos à dieta hiperlipídica durante 15 semanas. As concentrações de CL e EC da fração HDL no grupo que recebeu a dieta hiperlipídica foram 60 e 67%, respectivamente, maiores do que no grupo controle ($p < 0,001$). As concentrações de TG, FL e proteína não diferiram entre os grupos.

Tabela 4. Composição em lípidos e proteína (mg/dL) da lipoproteína de alta densidade (HDL) de hamsters controle e de hamsters submetidos à dieta hiperlipídica.

Parâmetros	Controle (n=10)	Dieta Hiperlipídica (n=10)
Lípidos (mg/dL)		
Ester de colesterol	45 ± 5	72 ± 17*
Colesterol livre	6 ± 1	10 ± 1 *
Triglicérides	38 ± 6	53 ± 21
Fosfolípidos	159 ± 29	179 ± 46
Proteína (mg/dL)	379 ± 58	346 ± 38

Resultados expressos em média ± DP, *test- t* – Mann Whitney test. * $p < 0,001$ vs controle.

4.4. Determinação da atividade da CETP e da PLTP

A tabela 5 mostra os valores das atividades da CETP e da PLTP em hamsters controles e submetidos à dieta hiperlipídica durante 15 semanas. Verificou-se que a atividade da CETP e da PLTP estão aproximadamente 2 vezes maiores no grupo que recebeu a dieta hiperlipídica em comparação ao grupo controle.

Tabela 5. Atividade da CETP e da PLTP de hamsters controle e de hamsters submetidos à dieta hiperlipídica.

Parâmetros	Controle (n=12)	Dieta Hiperlipídica (n=14)
CETP (pmol/μL/h)	6,5 ± 1,7	13,9 ± 4,2*
PLTP (pmol/μL/h)	18,3 ± 5,8	38,9 ± 10,1*

Abreviatura: CETP – Proteína de transferência de éster de colesterol; PLTP – Proteína de transferência de fosfolípidos. Resultados expressos em média ± DP, $p < 0,05$, *test- t* – Mann Whitney test. * $p < 0,001$ vs controle

4.5. Paroxonase 1 (PON 1) e ensaio de transferência de colesterol livre, éster de colesterol, triglicérides e fosfolípidos de uma nanoemulsão lipídica artificial para HDL

A tabela 6 mostra os valores da atividade da PON1 e das taxas de transferência do $^{14}\text{C-CL}$, $^3\text{H-EC}$, $^3\text{H-TG}$ e $^{14}\text{C-FL}$ de uma nanoemulsão lipídica artificial para a HDL dos hamsters controles e submetidos a uma dieta hiperlipídica durante 15 semanas. Não foram observadas diferenças na atividade da PON1 entre os grupos. Verificou-se uma maior capacidade da HDL em receber os quatro lípidos no grupo que recebeu a dieta hiperlipídica em comparação ao grupo controle. No entanto, a transferência das duas formas de colesterol para HDL no grupo dieta hiperlipídica foi aproximadamente 100% maior, enquanto o aumento na transferência de $^3\text{H-TG}$ e $^{14}\text{C-FL}$ foi de 26% e 17%, respectivamente.

Tabela 6. Atividade da paroxonase e transferência de lípidos (%) de hamsters controle e de hamsters submetidos à dieta hiperlipídica.

Parâmetros	Controle (n=19)	Dieta Hiperlipídica (n=20)
Paroxonase (nmol.mL ⁻¹ .min ⁻¹)	59±16	63±12
% de Transferência		
¹⁴ C-fosfolípidos	23,4±2,0	27,5±2,5*
¹⁴ C-colesterol livre	3,7±0,8	7,7±1,6*
³ H-éster de colesterol	1,9±0,6	4,0±1,2*
³ H-triglicérides	19,0±3,4	23,9±2,4*

*p<0,001 vs Controle. Resultados expressos em média ± DP, *test- t* – Mann Whitney test.

4.6. Avaliação histológica, diâmetro interno e externo, e composição de CT, CL e EC, da aorta de hamsters *Golden Syrian*

A figura 1 ilustra a histologia da artéria de hamsters *Golden-Syrian* controles e hamsters que foram submetidos a uma dieta hiperlipídica durante 15 semanas, observou-se por microscopia óptica que as aortas não apresentaram diferenças histológicas entre os grupos.

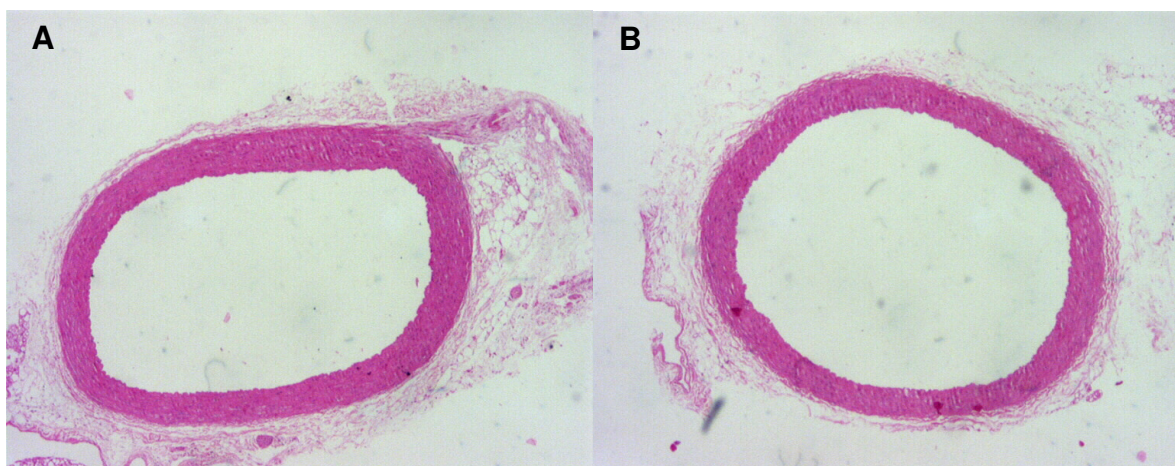


Figura 1. Histologia da aorta de hamster *Golden Syrian* submetidos à **(A)** Ração comercial (grupo controle) ou **(B)** Dieta Hiperlipídica: 0,5% de colesterol + 10% de óleo de coco (hematoxilina/eosina, aumento de 10x) por 15 semanas.

A tabela 7 mostra o diâmetro interno e externo dos fragmentos arteriais de hamsters controles e que foram submetidos à dieta hiperlipídica durante 15 semanas. Observou-se que não houve diferença no diâmetro interno e externo entre os grupos analisados.

Tabela 7. Diâmetro interno e externo (μm) da aorta de hamsters controle e de hamsters submetidos a uma dieta hiperlipídica durante 15 semanas.

Parâmetros (μm)	Controle (n=8)	Dieta Hiperlipídica (n=8)
Diâmetro Interno	1188 \pm 101	1325 \pm 217
Diâmetro Externo	1400 \pm 105	1580 \pm 170

Resultados expressos em média \pm DP, *test- t* – Mann Whitney test.

A tabela 8 mostra a composição em lípides da aorta de hamsters controle e submetidos à dieta hiperlipídica durante 15 semanas. A concentração de CT e CL na aorta foram 1,5 vezes maiores no grupo dieta hiperlipídica, comparado ao grupo controle ($p < 0,01$). A concentração de EC na aorta não diferiu entre os grupos.

Tabela 8. Composição em lípides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) da aorta de hamsters controle e de hamsters submetidos à dieta hiperlipídica por 15 semanas.

Parâmetros ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tecido)	Controle (n=8)	Dieta Hiperlipídica (n=8)
Colesterol total	$2,7 \pm 0,6$	$4,0 \pm 0,3^*$
Colesterol livre	$2,0 \pm 0,4$	$3,1 \pm 0,6^*$
Colesterol esterificado	$0,7 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,3$

* $p < 0,001$ vs Controle. Resultados expressos em média \pm DP, *test- t* – Mann Whitney test.

4.7. Avaliação histológica do fígado e determinação do diâmetro dos hepatócitos de hamsters *Golden Syrian*

A figura 2 ilustra a histologia do fígado de hamsters *Golden-Syrian* controles e hamsters que foram submetidos a uma dieta hiperlipídica durante

15 semanas, observou-se que a histologia do fígado se difere entre os grupos estudados.

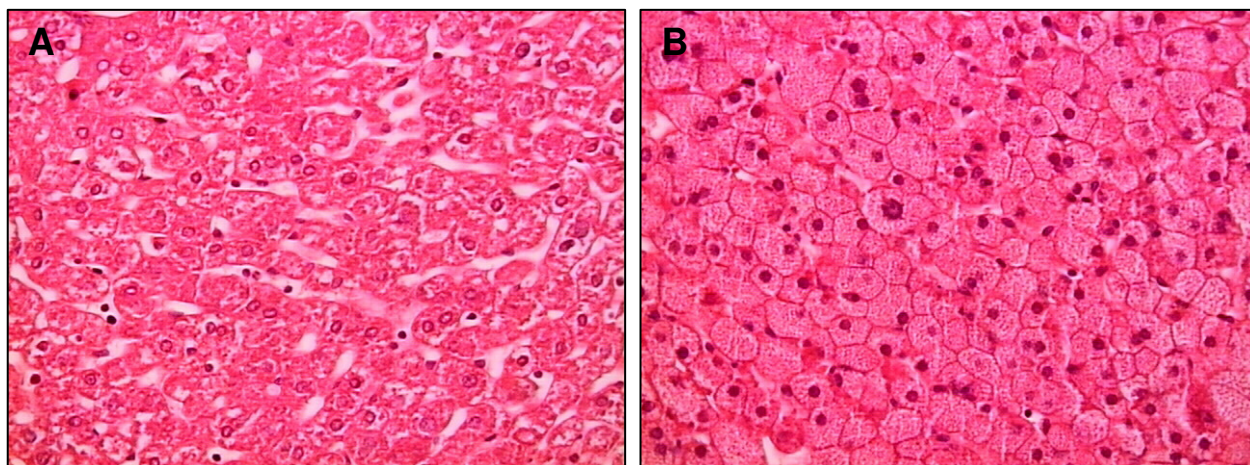


Figura 2. Histologia do fígado de hamsters controle e de hamsters que receberam uma dieta hiperlipídica por 15 semanas, ilustrando a alteração no tamanho dos hepatócitos, (hematoxilina/eosina, aumento de 40x). **(A)** Controle: Ração comercial; **(B)** Dieta hiperlipídica: 0,5% de colesterol + 10% de óleo de coco.

A figura 3 mostra o diâmetro médio dos hepatócitos do fígado de hamsters controles e que foram submetidos à dieta hiperlipídica durante 15 semanas, determinado através da análise histológica seguida de planimetria. Observou-se um aumento de aproximadamente 28% no diâmetro médio dos hepatócitos de hamsters que receberam uma dieta hiperlipídica em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$).

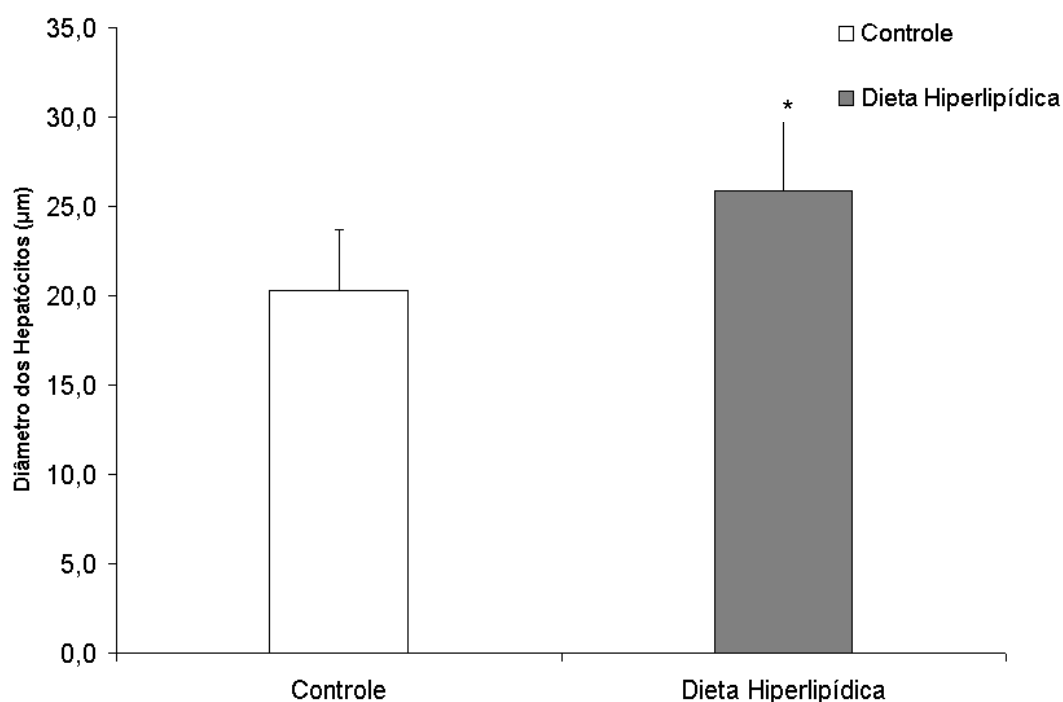


Figura 3. Diâmetro médio dos hepatócitos (μm) de hamsters controle e de hamsters submetidos à dieta hiperlipídica. Controle: Ração comercial ($n=15$); Dieta hiperlipídica: 0,5% de colesterol + 10% de óleo de coco ($n=15$), $*p<0,05$ vs Controle, *test- t* – Mann Whitney test.

4.8. Composição em lípides do fígado de hamsters *Golden Syrian*

A tabela 9 mostra a composição em lípides do fígado de hamsters controle e submetidos à dieta hiperlipídica durante 15 semanas. No grupo dieta hiperlipídica, a composição de EC, CL, TG e FL do fígado foi maior em comparação ao grupo controle. O conteúdo de CL e EC do fígado no grupo dieta hiperlipídica foi particularmente maior, 8 e 20 vezes, respectivamente.

Tabela 9. Composição em lipídeos (mg/g de tecido) do fígado de hamsters controle e de hamsters submetidos à dieta hiperlipídica por 15 semanas.

Parâmetros	Controle (n=10)	Dieta Hiperlipídica (n=10)
Colesterol (mg/g tecido)		
Total	1,7 ± 0,3	21,9 ± 7,1*
Livre	1,1 ± 0,1	9,3 ± 1,6*
Esterificado	0,6 ± 0,4	12,6 ± 5,8*
Triglicérides (mg/g tecido)	2,1 ± 1,1	5,5 ± 1,4**
Fosfolípidos (mg/g tecido)	10,1 ± 1,1	16,9 ± 2,0*

*p<0,0001 vs Controle, **p<0,001 vs Controle. Resultados expressos em média ± DP, *test- t* – Mann Whitney test.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Para elucidar os processos envolvidos na aterogênese, e principalmente no metabolismo lipídico, muitos estudos utilizam hamsters *Golden-Syrian*, os quais têm um perfil de lipoproteínas que se assemelha mais com o do homem do que com o de ratos e camundongos (BRAVO et al., 1994). Somado a isto, o hamster apresenta atividade da CETP similar ao homem (STEIN et al., 1990). Outras similaridades dos hamsters ao homem incluem: síntese do colesterol hepático, transporte do colesterol plasmático, regulação da concentração de LDL plasmática em resposta aos lípidos dietéticos, receptor de LDL, composição e secreção de bile e desenvolvimento de lesões arteriais em associação com marcadores de hiperlipidemia quando são suplementados com colesterol e gordura saturada (FUNGWE et al., 1994).

No presente estudo, oferecemos aos hamsters uma dieta controle ou uma dieta rica em colesterol e gordura saturada durante 15 semanas. Esta manobra dietética apresentou pequena variação em calorias oferecidas. Embora não tenha sido avaliado o consumo da ração, não houve diferença do peso corporal entre os grupos, sugerindo um consumo de dieta similar. O aumento no peso corporal final em relação ao inicial, nos dois grupos de animais, sugere que a intervenção dietética não foi tóxica aos animais durante o período experimental. No entanto, a dieta rica em colesterol e gordura saturada oferecida aos hamsters neste estudo foi suficiente para

produzir uma hiperlipímia, uma alteração na composição em lípides da fração HDL, uma maior concentração de CL na aorta e um acúmulo de lípides no fígado destes animais.

No que se constitui um dos pontos principais da “hipótese lipídica” da aterogênese, a concentração plasmática da HDL correlaciona-se negativamente com a incidência da DAC, principalmente devido sua importância no transporte reverso do colesterol (HERSBERGER; VON ECKARDSTEIN, 2005; RADER, 2007). Diversos fatores afetam a função da HDL no transporte reverso do colesterol, entre eles: o conteúdo de colesterol e fosfolípidos, a atividade da LCAT, a atividade das proteínas de transferência de lípidos e as concentrações de ácidos graxos saturados. Marmillot et al. (2007), constataram que o transporte reverso do colesterol da HDL é afetado pela ingestão de gordura saturada.

A habilidade de receber lípidos é uma propriedade fundamental da HDL. Um aspecto da ação da HDL pouco explorado na literatura é o seu efeito na estabilização do “pool” plasmático de colesterol. O colesterol existe no organismo em duas formas, a forma livre e a forma esterificada. A forma livre do colesterol, situada na camada superficial da partícula da lipoproteína, é mais instável do que sua forma esterificada e pode dissociar-se das lipoproteínas e difundir-se no meio aquoso plasmático. A forma éster do colesterol, situado no centro da lipoproteína, é mais estável e depende da CETP para deslocar-se de uma lipoproteína para outra (GARRET; GRISHAM, 1995). Ao promover a esterificação do colesterol recebido das outras classes de lipoproteínas ou das membranas celulares, a HDL o

transforma em uma forma química mais apolar. Esse processo é catalisado pela LCAT que utiliza como co-fator a Apo A-I, principal proteína da fração HDL. As moléculas de colesterol passam da superfície para o centro das partículas de lipoproteínas. Desta maneira, o colesterol é seqüestrado para o “pool mais estável”, evitando sua difusão para o meio plasmático de onde pode, facilmente, devido à baixa solubilidade, precipitar-se na parede arterial. A HDL tem um papel crucial no transporte reverso do colesterol, pois recebe colesterol das células e de outras lipoproteínas, esterificando-o e transferindo-o para outras classes de lipoproteínas e para os hepatócitos, onde são excretados na bile (SVIRIDOV; NESTEL, 2002, WANG; BRIGGS, 2004, de GROOTH et al., 2004, LEWIS; RADER, 2005).

Estudo prévio realizado em hamsters alimentados com dietas ricas em colesterol e gordura saturada (óleo de coco) observou que conforme aumenta a percentagem de colesterol e gordura saturada na dieta há elevação na concentração sérica de colesterol, desencadeando um processo de aterosclerose (DIETSCHY et al., 1993).

No presente estudo, o grupo que recebeu dieta rica em colesterol e gordura saturada apresentou concentração sérica de CT, HDL-C e n-HDL-C, maior do que no grupo controle. Estes resultados conferem com outros estudos em hamsters nos quais uma dieta rica em colesterol e gordura saturada também aumentou o HDL-C e o n-HDL-C (JONES et al., 1990; AHN et al., 1994; TRAUTWEIN et al., 1997; TERPSTRA, et al., 2000). E são sustentados pelo fato dos ácidos graxos saturados tenderem a elevar as concentrações de LDL-C pela supressão do receptor de LDL e diminuição do

“clearance” plasmático destas partículas (SPADY, 1999). Além disso, em função de sua estrutura química retilínea, os ácidos graxos saturados facilitam a entrada de colesterol na superfície das partículas de LDL, contribuindo para o aumento das concentrações de LDL-C.

Nenseter et al. (1988) estudaram a captação das partículas de LDL pelos hepatócitos e verificaram que o consumo da dieta rica em colesterol reduz a captação hepática da LDL dependente de receptores B/E e por conseguinte, menor captação do colesterol dessa lipoproteína pelo fígado (CHANG; BORENSZTAJN, 1993). Padoveze et al. (2009) verificaram que a captação hepática de uma nanoemulsão lipídica artificial semelhante à LDL – que é a nanoemulsão desenvolvida em nosso laboratório - diminui em coelhos após o consumo da dieta rica em colesterol, desencadeando o aumento na concentração de LDL-C, o que pode explicar o aumento da fração n-HDL observado em nosso estudo. Em adição, como a concentração de triglicérides no plasma e conseqüentemente da VLDL não diferiu entre os grupos estudados, provavelmente o aumento da fração n-HDL no presente estudo é reflexo do aumento da concentração de LDL-C.

A concentração plasmática da HDL é determinada pelo balanço entre a produção dos seus precursores e sua remoção do plasma, seja pela captação da HDL pelo receptor B/E ou pela captação seletiva dos seus constituintes pelo receptor SR-B1 (MOVVA; RADER, 2008). O SR-B1 é um receptor de superfície celular de alta afinidade pela HDL que medeia à captação seletiva de EC da HDL, assim modulando concentrações de colesterol da HDL bem como a entrega de EC ao fígado, adrenais, ovários,

etc. O aumento da ingestão de colesterol é o principal responsável pelo aumento da concentração de HDL-C, não só por contribuir para sua maior concentração no plasma, mas também por uma possível alteração dos receptores, comprometendo o metabolismo da HDL.

Azrolan et al. (1995), demonstraram que dietas enriquecidas em colesterol e gordura saturada podem aumentar a concentração da HDL pelo aumento da síntese e secreção de Apo A-I em camundongos. Similarmente, em humanos, o aumento da concentração de HDL sob o efeito da mesma dieta ocorre em parte por estimular o transporte de Apo A-I no plasma (BRITTON et al., 1994). Além disso, outros estudos constataram que os ácidos graxos saturados aumentam a concentração de apo A-I, e conseqüentemente a concentração de HDL-C (LICHTENSTEIN et al., 1999; HATAHET et al., 2003).

O aumento da expressão de SR-B1 é associado a concentrações diminuídas de HDL-C e ao desenvolvimento da lesão aterosclerótica em modelos animais experimentais (SRIVASTARA, 2001). No presente estudo, como a concentração de HDL-C está aumentada, possivelmente a expressão do receptor SR-B1 está diminuída, nos levando a destacar que o efeito dos ácidos graxos saturados e do colesterol dietético no receptor SR-B1 pode ser importante na regulação do pool de colesterol circulante. Van Eck et al. (2003), demonstraram que camundongos SR-B1 $-/-$ apresentam um aumento na concentração de HDL-C no plasma e são altamente susceptíveis ao desenvolvimento de aterosclerose, sendo assim o aumento da concentração de HDL pode não ser associada com uma proteção

cardiovascular. Com isso, a diminuição da expressão hepática dos receptores e/ou saturação destes, bem como o possível aumento da secreção e síntese de Apo A-I podem explicar a maior concentração de HDL-C encontrada nos animais que receberam uma dieta rica em colesterol e gordura saturada.

Em estudos prévios não documentaram o efeito de dietas enriquecidas em gordura saturada e colesterol, em hamsters, sobre a concentração de CL e EC no plasma total. Observou-se no presente estudo o aumento da concentração de CL do plasma total de forma mais acentuada do que o aumento da concentração de EC após a ingestão da dieta hiperlipídica. Isto sugere que o mecanismo de esterificação, como a LCAT no plasma e a ACAT no fígado e em outros tecidos, pode estar saturado pelo excesso de colesterol.

No presente estudo, ao analisar a composição da fração HDL observou-se uma maior concentração de CL e EC no grupo dieta hiperlipídica sem um aumento na concentração de FL e TG. Tchoua et al. (2009) verificaram, em estudo *in vitro*, o efeito de uma HDL enriquecida em fosfolípidos e colesterol livre sobre atividade da LCAT e constataram um aumento desta atividade, enquanto o enriquecimento da HDL em colesterol livre sem o enriquecimento em fosfolípidos inibiu a atividade da LCAT. Sendo assim, a maior concentração de CL e EC da fração HDL sem um aumento concomitante de FL, encontrado em nosso estudo, possivelmente compromete a atividade da LCAT, ou seja, a esterificação do colesterol livre. Com isso, o possível comprometimento do mecanismo de esterificação e/ou

a sua saturação pode acarretar na desestabilização da HDL prejudicando assim a sua ação antiaterogênica.

Nicolosi (1997) reportou o desenvolvimento da lesão aterosclerótica em hamsters após 12 -18 semanas consumindo uma dieta rica em colesterol e ácidos graxos saturados. No presente estudo, não foram observadas alterações na análise histológica da aorta por microscopia óptica e no diâmetro interno e externo da aorta. No entanto, observou-se uma maior concentração de CL na aorta destes animais, o que pode ser considerado um indício de um processo de aterosclerose, pois uma das características da aterosclerose é a deposição de CL na artéria. Estudos em hamsters, com dieta rica em colesterol e gordura saturada, apresentaram resultados que convergem com os nossos, de maior concentração de CL na artéria após intervenção dietética (ALEXAKI et al. 2004; WILSON et al., 2005).

COUTO et al. (2007) verificaram que a captação de CL e EC em fragmentos arteriais e venosos de pacientes com DAC apresentou um comportamento diferenciado, pois observou-se uma maior captação de CL do que de EC. A forma livre de colesterol pode se dissociar da lipoproteína, precipitar-se e depositar-se na parede arterial. Supõe-se que haja situações na qual a menor eficiência na esterificação de colesterol resulte em uma predisposição para aterosclerose. Portanto, no presente estudo, o aumento mais acentuado da concentração de CL no plasma total e o aumento das duas formas de colesterol na fração HDL podem desencadear uma desestabilização e saturação do sistema, podendo explicar o depósito de CL

encontrado na aorta dos animais que receberam a dieta rica em colesterol e gordura saturada.

Neste estudo verificou-se no grupo que recebeu dieta hiperlipídica, aumento do peso do fígado total e do peso do fígado em relação ao peso corporal final comparado ao grupo controle. Isto ocorreu devido uma deposição lipídica neste órgão, pois ao analisarmos o diâmetro médio dos hepatócitos e a composição em lípidos do fígado destes animais o conteúdo de EC, CL, TG e FL, e o diâmetro médio dos hepatócitos estavam aumentados.

Hennessy et al. (1992), verificaram que uma dieta rica em colesterol e gordura saturada aumentam o estoque de lípidos hepáticos em macacos, e este resultou no aumento de RNA mensageiro para Apo A-I, B e E, e na supressão de receptores de LDL no fígado destes animais. Além disso, o aumento do fluxo de colesterol para o fígado, assim como o aumento da ingestão de colesterol dietético e de ácidos graxos saturados (12:0, 14:0 ou 16:0), aumentam o “pool” de colesterol e resultam no acúmulo destes ácidos graxos no fígado, desencadeando a inibição da atividade do receptor hepático da LDL. Como consequência da inibição do receptor de LDL, a VLDL remanescente deixa de ser captada pelo receptor de LDL e desencadeia um aumento da produção de LDL e da concentração de LDL-C no plasma (Nicolosi, 1997).

No presente estudo, o aumento da concentração de CL e principalmente EC no fígado do grupo dieta hiperlipídica, foi mais acentuado que o aumento da concentração de FL e TG. Estes resultados convergem

com estudos prévios, em hamsters, que constataram um maior depósito de EC no fígado destes animais após o consumo de dieta rica em colesterol e gordura saturada (DELANEY et al., 2003; YANG et al., 2009). Oosterveer et al. (2009), verificaram que uma dieta rica em gordura saturada, em camundongos, promove a síntese de colesterol, aumentando a concentração de CL e principalmente de EC no fígado, e aumenta a concentração de TG hepático sem o conseqüente estímulo a secreção de VLDL. Estes achados reforçam que a hiperlipemia apresentada no presente estudo, ou seja, o aumento da concentração de HDL-C e da fração n-HDL-C, está relacionada com o acúmulo de lípidos hepático e possivelmente com a saturação e/ou supressão dos receptores.

A HDL desempenha diversas funções no metabolismo lipídico que lhe confere uma ação protetora para DAC, que incluem: efeito antioxidante, antiinflamatório, antitrombótico e antiaterogênico, além do transporte reverso do colesterol (SVIRIDOV; NESTEL, 2002; RADER, 2002; BARTER et al., 2003; MEYERS; KASHYAP, 2004; LESNIK; CHAPMAN, 2006; MINEO et al., 2006; NEGRE-SALVAYRE et al., 2006; RADER, 2007).

O efeito antioxidante da HDL foi avaliado neste estudo pela medida da atividade da enzima PON1. A PON1 é uma esterase associada à HDL que possui uma atividade antioxidante. Esta enzima hidrolisa fosfolípidos oxidados presentes na LDL, reduzindo a oxidação destas lipoproteínas e diminuindo seus efeitos pró-inflamatórios. Além de ser importante na prevenção da oxidação dos lípidos (DURRINGTON et al., 2001). Em nosso

estudo, a atividade da PON1 não diferiu entre os grupos, sugerindo que a função antioxidante da HDL não foi afetada pela dieta hiperlipídica.

No presente estudo, as proteínas de transferência e a capacidade da HDL em receber lípidos, um aspecto fundamental do metabolismo da HDL, estão alteradas em hamsters que receberam uma dieta hiperlipídica comparado ao grupo controle. Estes componentes podem ser causa ou consequência de perturbações na dinâmica do metabolismo da HDL, na estabilização do colesterol do plasma e no transporte reverso.

Em relação à atividade da CETP e da PLTP, estudos reportam uma atividade aumentada destas proteínas em resposta à dieta rica em gordura saturada e colesterol (SON; ZILVERSMIT, 1986, JIANG; BRUCE, 1995).

No presente estudo, a atividade da CETP foi maior no grupo que recebeu dieta hiperlipídica em comparação ao grupo controle. A atividade da CETP tem efeito direto na concentração de colesterol das partículas de HDL e partículas que contém apo B, por facilitar a transferência de EC da HDL para as lipoproteínas que contém apo B e, em troca, receber TG destas lipoproteínas (BRUCE et al., 1998). Kurushima et al. (1995) reportou maior atividade da CETP em hamsters submetidos à dieta rica em ácidos graxos saturados. Dietas ricas em colesterol também estão associadas com o aumento da CETP (STEIN et al., 1990; QUIG et al., 1991). Portanto, o aumento da atividade da CETP converge com a maior transferência de EC e TG observado no grupo que recebeu dieta hiperlipídica em relação ao grupo controle do presente estudo.

A atividade da PLTP foi maior no grupo que recebeu dieta hiperlipídica em comparação ao grupo controle. Meijer et al. (1993) demonstraram que coelhos com hipercolesterolemia moderada ou severa induzida por dieta rica em colesterol tendem a aumentar atividade da PLTP, favorecendo a transferência de colesterol entre as lipoproteínas. O CL pode se dissociar da LDL e se depositar nas células, ou ser transferido para outras lipoproteínas por colisão, difusão passiva e por estímulo da PLTP, sendo posteriormente captado pelos hepatócitos (O'BRIEN et al., 2003). Já o EC, por sua característica hidrofóbica, necessita obrigatoriamente de proteínas de transferência especializadas para se deslocar entre as lipoproteínas (GARRET; GRISHAM, 1995). Em humanos, tem sido reportado que ácidos graxos saturados dietéticos (palmítico e láurico) podem alterar a atividade da PLTP e que esta apresenta uma correlação positiva com a concentração de HDL (LAGROST, 1999).

O aumento da atividade da PLTP é considerado aterogênico por diminuir a reciclagem de Apo A-I e ocasionar mudanças na composição de fosfolípidos da superfície da partícula de HDL (JAUHAINEN et al, 1999; VAN TOL, 2002). Dorfman et al. (2005) constataram o mesmo resultado apresentado em nosso estudo, ou seja, quando comparou hamsters que receberam uma ração convencional com hamsters que receberam uma dieta contendo ácidos graxos saturados (óleo de coco) e colesterol observaram uma maior atividade da CETP e da PLTP neste grupo.

A transferência de lípidos sofre influência das proteínas de transferência, da concentração, da composição e da estrutura dos lípidos

nas lipoproteínas doadora e receptora (GLOMSET, 1970; MARCEL et al., 1980; EISENBERG et al., 1984). Embora tenhamos mensurado apenas a transferência para a HDL, recuperada no sobrenadante, parte dos lípidos radioativos da nanoemulsão devem ter sido transferidos para as outras classes de lipoproteínas que contém apo B. Estas, por sua vez, sofrem precipitação química juntamente com a nanoemulsão lipídica artificial. Lo Prete et al.(2009) constataram que quanto maior a concentração de HDL, maior é a porcentagem de transferência, ou seja, o aumento da concentração da HDL pode estar diretamente relacionado ao aumento da transferência de CL, FL, EC e TG para HDL. No entanto, como ocorreu aumento na concentração de lipoproteínas contendo apo B (fração n-HDL) e da HDL-C, provavelmente a concentração de lipoproteínas não foi um fator determinante para a transferência de lípidos. Além disso, o aumento da fração n-HDL foi proporcionalmente maior do que o aumento da concentração de HDL-C, o que pode reforçar a hipótese de que a transferência não está sendo influenciada de forma relevante pela concentração de lipoproteínas. Esses achados sugerem que a composição e estrutura da HDL, e principalmente, o aumento da atividade das proteínas de transferência estão influenciando de forma mais proeminente a capacidade da HDL em receber lípidos.

A HDL pode sofrer modificações em sua estrutura e composição, o que acarreta em alterações qualitativas da partícula (SPARKS et al. 1995; LAMARCHE et al., 1999; KONTUSH; CHAPMAN, 2006; NORATA et al., 2006). Sugere-se que o enriquecimento da HDL em EC, CL, FL e TG possa

alterar a funcionalidade da partícula. No presente estudo, a transferência de EC e TG para a HDL foi maior nos hamsters que receberam dieta hiperlipídica. Este fato pode ser explicado pelo aumento na atividade da CETP, o que proporciona maior recebimento de EC e TG pela HDL.

A habilidade da HDL em receber os lípidos presentes na camada superficial das lipoproteínas, FL e CL, foi maior nos hamsters que receberam dieta hiperlipídica, em comparação aos do grupo controle. Esta alteração pode determinar importantes modificações nas diversas funções da lipoproteína. A PLTP medeia a transferência de FL e de CL entre as lipoproteínas (HUUSKONEN et al., 2001; SETALA et al., 2007) e tem um importante papel no remodelamento da HDL, por facilitar a interconversão das sub-populações de HDL (JAUHAINEN et al., 1993; BRITES et al., 2000). Desse modo, no presente estudo é sugerido que a maior transferência de FL para a HDL no grupo que recebeu dieta hiperlipídica esteja envolvida com a alteração estrutural da lipoproteína, pois pode acarretar em alterações eletrostáticas na superfície da lipoproteína. Estas modificações alterariam a afinidade das moléculas de proteína ligadas à HDL, determinando um novo arranjo protéico. Como conseqüências, seriam esperadas modificações nas diversas funções atribuídas à HDL, decorrentes dessas alterações na composição da camada superficial da lipoproteína.

Estudo comparando uma dieta rica em gordura saturada (óleo de coco) com uma dieta rica em colesterol constatou que hamsters que apresentavam maiores concentrações plasmáticas de colesterol total tinham um maior acúmulo de colesterol na artéria. No entanto, estes hamsters

também apresentavam uma maior concentração de HDL-C, que é considerada protetora no processo de aterosclerose (ALEXAKI et al., 2004). Estes achados reforçam que outros mecanismos devem estar envolvidos com o processo de aterosclerose e dentre eles a instabilidade da partícula da HDL deve ser um fator determinante.

No presente estudo observou-se um aumento acentuado da capacidade da HDL em receber CL e EC em comparação ao aumento da capacidade em receber TG e FL. Além disso, constatou-se que a fração HDL dos hamsters que receberam dieta hiperlipídica apresentaram uma maior concentração de CL e EC. Este aumento de CL e EC na fração HDL, juntamente com o aumento da sua capacidade em receber CL e EC podem sinalizar uma sobrecarga do sistema, e conseqüentemente desencadear uma instabilidade da partícula devido um desequilíbrio nos constituintes desta lipoproteína. Esta hipótese é reforçada pelo fato da dieta hiperlipídica ter proporcionado a formação de uma HDL repleta de colesterol, um acúmulo de lípidos no fígado, e conseqüentemente o comprometimento da retirada de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, o que resultou na deposição de colesterol livre na artéria destes animais, revelando o início de um processo de aterosclerose.

Sendo assim, a HDL dos animais que receberam uma dieta hiperlipídica provavelmente está instável. Esta hipótese sugere que o aumento da concentração da HDL não significa necessariamente uma maior proteção ao desenvolvimento da aterosclerose.

Contudo, no presente estudo, verificaram-se alterações em todos os circuitos metabólicos estudados. E como a partícula da HDL tem importante papel antiaterogênico, estes resultados podem ser relevantes para estabelecer novos mecanismos relacionados à ação protetora desta lipoproteína.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A dieta hiperlipídica, em hamsters, aumenta a concentração da forma livre e esterificada do colesterol na fração HDL e a sua capacidade em receber éster de colesterol, colesterol livre, fosfolípidos e triglicérides de uma nanoemulsão lipídica artificial, bem como a atividade das proteínas de transferência de éster de colesterol e fosfolípidos em comparação ao grupo controle.

Outro aspecto, como a atividade antioxidante da HDL não foi influenciada pela intervenção dietética. No entanto, a alteração na composição e na capacidade da HDL em receber lípidos devido à ingestão da dieta rica em colesterol e gordura saturada está influenciando o metabolismo da HDL, e possivelmente a sua ação protetora, já que a dieta hiperlipídica desencadeou um depósito de colesterol livre na aorta e o acúmulo de lípidos no fígado. Estes aspectos nos fornecem subsídios para elucidar os possíveis mecanismos relacionados ao metabolismo da HDL e a sua ação antiaterogênica em hamsters.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGACHAN, B.; YILMAZ, H.; KARAALI, Z.; ISBIR, T. Paraoxonase 55 and 192 polymorphism and its relationship to serum paraoxonase activity and serum lipids in Turkish patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. **Cell. Biochem. Funct.**, v. 22(3), p. 163- 8, 2004.

AHN, Y.S.; SMITH, D.; OSADA, J.; LI, Z.; SCHAEFER, E.J.; ORDOVAS, J.M. Dietary fat saturation affects apolipoprotein gene expression and high density lipoprotein size distribution in Golden Syrian hamster. **Journal of Nutrition**, v.124, p.2147-2155, 1994.

ALEXAKI, A.; WILSON, T.A.; ATALLAH, M.T.; HANDELMAN, G.; NICOLOSI, R.J. Hamsters fed diets high in saturated fat have increased cholesterol accumulation and cytokine production in the aortic arch compared with cholesterol-fes hamsters with moderately elevated plasma non-HDL cholesterol concentrations. **J. Nutr.** v.134, p.410-415, 2004.

ASZTALOS, B. F.; SCHAEFER E.J. High-Density Lipoprotein Subpopulations in Pathologic Conditions. **The American Journal of Cardiology**, v.91, p.12E-17E, 2003.

ASZTALOS, B.F.; ROHEIM, P.S.; MILANI, R.L.; LEFEVRE, M.; McNAMARA, J.R.; HORVATH, K.V.; SCHAEFER, E.J. – Distribution of apo A-I-containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.20, p. 2670-76, 2000.

ATTIE, A.D.; KASTELEIN, J.P.; HAYDEN, M.R. Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. **J Lipid Res**, 42(11):1717-26, 2001.

AZEVEDO, C. H. M. **Transferência para HDL de colesterol livre e outros lípidos em diferentes faixas etárias: um estudo in vitro utilizando uma lipoproteína artificial.** 2007. Tese (Doutorado em Farmácia (Análises

Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

AZROLAN N.; ODAKA H.; BRESLOW L. J., FISHER A. E.- Dietary fat elevates hepatic apoA-I production by increasing the fraction of apolipoprotein A-I mRNA in the translating pool. **J Biol Chem**, v.270, p.19833-19838, 1995.

BACHORIK, P.S.; RIFKIND, B.M.; KWITEROVICH, P.O.- Lipídeos e dislipoproteinemias. In: HENRY J.B., **Diagnósticos clínicos e tratamentos por métodos laboratoriais**. 2ed. São Paulo, Manole, 1999.

BALLANTYNE, C.M.; OLSSON, A.G.; COOK, T.J.; MERCURI, M.F.; PEDERSEN, T.R.; KJEKSHUS, J.- Influence of low high-density lipoprotein cholesterol and elevated triglyceride on coronary heart disease events and response to simvastatin therapy in 4S. **Circulation**, v.104, p.3046-3051, 2001.

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

BARTER, P.J.; RYE, K.A.- Relationship between the concentration and antiatherogenic activity of high-density lipoproteins. **Curr Opin Lipidol**, v. 17(4), p. 399-403, 2006.

BERLINER, CJ ; NAVAB, M ; FOGELMAN, AM ; FRANK, JS ; DEMER, LL. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. **Circulation**. v.91, n.9, p.2488-96, 1995.

BERRY-LORTSCH, E.; SABLE-AMPLIS, R. Reduced bile salt secretion in hamster with spontaneous high liver cholesterol. **Comp Biochem Physiol**, v.69, p.243-247, 1981.

BINDER, CJ ; CHANG, MK ; SHAW, PX ; et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. **Nat Med**, v. 8, p.1218–26, 2002.

BRAVO, E.; CANTAFORA, A.; CALCCABRINI, A.; ORTU, G. Why prefer the Golden Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) to the Wistar rat in experimental studies on plasma lipoprotein metabolism? **Comparative Biochemistry and Physiology** v.107B, p.347-355, 1994.

BRITES, F. D.; BONAVITA, C. D.; DE GEITERE, C.; CLOES, M.; DELFLY, B.; YAEL, M. J.; FRUCHART, J.; WIKINSKI RW, G. R. C. Alterations in the main steps of reverse cholesterol transport in male patients with primary hypertriglyceridemia and low HDL-cholesterol levels. **Atherosclerosis**, v. 152, p. 181-192, 2000.

BRINTON, E. A.; EISENBERG, S.; BRESLOW, J. L.- Human HDL cholesterol levels are determined by apoA-I fractional catabolic rate, which correlates inversely with estimates of HDL particle size. **Arterioscler Thromb**, v.14, p.707-720, 1994.

BRUCE, C.; CHOUINARD, R.A.; TALL, A.R. – Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. **Annu Rev Nutr**, v. 18, p. 297-330, 1998.

BURSTEIN, M., SCOLNICK, H. R., MORFIN, R. Rapid methods for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. **J Lipid Res**, v.11, p.583-595, 1970.

CARR, T.P.; ANDRESEN, C.J.; RUDEL, L.L.- Enzymatic determination of triglyceride, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts. **Clin Biochem**, v.26(1), p.39-42, 1993.

CHANG, S.; BORENSZTAJN, J. Hepatic lipase function and the accumulation of beta-very-low-density lipoproteins in the plasma of cholesterol-fed rabbits. **Biochem J.**, v.293, p.745-750, 1993.

CHAPMAN, M.J.; GOULINET, S. Plasma lipoproteins in the golden Syrian hamster: heterogeneity of apo B and apo A1 containing particles. **J Lipid Res.**, v.34, p.943-959, 1993.

CHOY, P. C.; SIOW, Y. L.; MYMIN, D.; KARMIN, O. Lipids and atherosclerosis. **Biochem. Cell Biol.**, v.82, p. 212-224, 2004.

COSTA, L.G.; VITALONE, A.; COLE, T.B.; FURLONG, C.E. Modulation of paraoxonase (pon1) activity. **Biochemical Pharmacology**, v.69, p.541-50, 2005.

COUTO, R.D.; DALLAN, L.A.; LISBOA, L.A.; MESQUITA, C.H.; VINAGRE, C.G.; MARANHÃO, R.C.- Deposition of free cholesterol in the blood vessels of patients with coronary artery disease: a possible novel mechanism for atherogenesis. **Lipids**, v. 42(5), p.411-8, 2007.

CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCOPIO, J. Entendendo a gordura: os ácidos graxos. Editora: Manole, 2002.

CUTRI, B.A.; HIME, N.J.; NICHOLLS, S.J. High-density lipoproteins: an emerging target in the prevention of cardiovascular disease. **Cell Res**, v.16(10), p.799-808, 2006.

DAMINELLI, E.N.; SPADA, C.; TREITINGER, A.; OLIVEIRA, T.V.; LATRILHA, M.C.; MARANHÃO, R.C. Alterations in lipid transfer to High-Density Lipoprotein (HDL) and activity of paraoxonase-1 in HIV⁺ patients. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, 50(4):223-227, 2008.

DE GROOTH, G.J.; KLERKX, A.H.; STROES, E.S.; STALENHOEF, A.F.; KASTELEIN, J.J.; KUIVENHOVEN, J.A. A review of CETP and its relation to atherosclerosis. **J Lipid Res**, v.45(11), p.1967-74, 2004.

DELANEY, B.; NICOLOSI, R.J.; WILSON, T.A.; CARLSON, T.; FRAZER, S.; ZHENG, G.H.; HESS, R.; OSTERGREN, K.; HAWORTH, J.; KNUTSON, N. Beta-glucan fractions from barley and oats are similarly antiatherogenic in hypercholesterolemic Syrian golden hamsters. **J Nutr**, v.133(2), p.468-475, 2003.

DIETSCHY, J.M.; TURLEY, S.D.; SPADY, D.K. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. **Journal of Lipid Research**. v.34, p.1637-1659, 1993.

DORFMAN, S.E.; WANG, S.; VEGA-LÓPEZ, S.; JAUHAINEN, M.; AND LICHTENSTEIN, A.H. Dietary Fatty Acids and Cholesterol Differentially Modulate HDL Cholesterol Metabolism in Golden-Syrian Hamsters. **The J. Nutr.** v.135, p. 492–498, 2005.

DOUSSET, N.; CURATOLA, G. Structural modifications of HDL and functional consequences. **Atherosclerosis**, v. 184, p. 1-7, 2006.

DURRINGTON, P.N.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M.I. Paraonase and atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, p. 473- 80, 2001.

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

EISENBERG, S.- High density lipoprotein metabolism. **J. Lipid Res.**, v.25, p. 1017-58, 1984.

FARMER, J.A; TORRE-AMIONE, G. Atherosclerosis and inflammation. **Curr Atheroscler Rep.** 2000; n.4, p.92–98.

FEITOSA, A.C.; MARANHÃO, R.C.; FEITOSA FILHO, G.S.; WAJCHENBERG, B.L. Lipid transfer to HDL in women with type 1 diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metabol.** v.53(1), p.95-101, 2009.

FEITOSA-FILHO, G.S.; SEYDELL, T.DE M.; FEITOSA, A.C.; MARANHÃO, R.C.; RAMIRES, J.A.. Lipid transfer to HDL in type-2 diabetic patients: associations with microalbuminuria, statin, and insulin. **Arq Bras Cardiol.** v.92(2), p.94-106,2009.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, J. H. G. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissue. **J. Bio. Chem.**, 226: 498-509,1957.

FORRESTER, J.S.; MAKKAR, R.; SHAH, P.K.- Increasing high-density lipoprotein cholesterol in dyslipidemia by cholesteryl ester transfer protein inhibition: an update for clinicians. **Circulation**, v. 111(14), p.1847-54, 2005.

FUNGWE, T.V.; CAGEN, L.M.; WILCOX, H.G.; HEIMBERG, M. Effects of Dietary Cholesterol on hepatic metabolism of free fatty acid and secretion of VLDL in the hamsters. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 200, n 3, 1994.

GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. **Biochemistry**. Florida: Saunders College Publishing, p. 757-802, 1995.

GINSBURG, G.S.; SMALL, D.M.; ATKINSON, D.- Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of lowdensity lipoprotein. **J. Biol. Chem.**, v.257, p.8216-8227, 1982.

GIRIBELA, A.H.; MELO, N.R.; LATRILHA, M.C.; BARACAT, E.C.; MARANHÃO, R.C. HDL concentration, lipid transfer to HDL, and HDL size in normolipidemic nonobese menopausal women. **Int J Gynaecol Obstet**. v.104(2), p.117-20,2009.

GLOMSET, J.A.- Physiological role of lecithin-cholesterol acyltransferase. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.23, p.1129-36, 1970.

GORDON, D.J., PROBSTFIELD, J.L.; GARRISON, R.J., et al. High density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: Four prospective American studies. **Circulation**, 79:8-20, 1989.

GROOT, P.H.E.; PEARCE, N.J.; SUCKLING, K.E.; EISENBERG, S. Effects of cholestyramine on lipoprotein levels and metabolism in Syrian hamsters. **Biochim Biophys Acta**, v.1123, p. 76-84, 1992.

HATAHET, W.; COLE, L.; KUDCHODKAR, B. J.; FUNGWE, T. V. Dietary fats differentially modulate the expression of lecithin:cholesterol acyltransferase, apoprotein-A1 and scavenger receptor B1 in rats. **J. Nutr**. v.133, p.689–694, 2003.

HENNESSY, L.K.; OSADA, J.; ORDOVAS, J.M.; NICOLOSI, R.J.; STUCCHI, A.F.; BROUSSEAU, M.E.; SCHAEFER, E.J. Effects of dietary fats and cholesterol on liver lipid content and hepatic apolipoprotein A-I, B, and E and LDL receptor mRNA levels in cebus monkeys. **J Lipid Res**, v.33(3), p.351-360, 1992.

HERSBERGER M, VON ECKARDSTEIN A.- Modulation of high-density lipoprotein cholesterol metabolism and reverse cholesterol transport. **Handb Exp Pharmacol.**, v.170, p.537-61, 2005.

HILTUNEN, T. P; YLÄ-HERTUALA, S. Expression of lipoproteins receptors in atherosclerotic lesions. **Atherosclerosis**, v.137, S81-S88, 1998a.

HIRATA, R.D.; HIRATA, M.H.; MESQUITA, C.H.; CESAR, T.B.; MARANHÃO, R.C.- Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsion model in rats. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1439, p. 53-62, 1999.

HUUSKONEN, J.; OLKKONEN, V. M.; JAUHAINEN, M.; EHNHOLM, C. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. **Atherosclerosis**, v.55, p. 269-281, 2001.

IKEDA, U.; OGUCHI, A.; OKADA, K.; ISHIKAWA, S.; SAITO, T.; IKEDA, M.; KANO, S.; TAKAHASHI, M.; SHIOMI, M.; SHIMADA, K.; Involvement of LDL Receptor in Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells. **Atherosclerosis**, v.110, p. 87-94, 2001.

JAMES, R.W.; DEAKIN, S.P.- The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37(12), p.1986-94, 2004.

JAUHAINEN, M.; METSO, J.; PAHLMN, R.; BLOMQUIST, S.; VAN TOL, A.; EHNHOLM, C. Human plasma phospholipid transfer protein causes high density lipoprotein conversion. **J Biol Chem**. v.268, p.4032-4036, 1993.

JAUHAINEN, M.; HUUSKONEN, J.; BAUMANN, M.; METSO, J.; OKA, T.; EGASHIRA, T.; et al. Phospholipid transfer protein (PLTP) causes proteolytic cleavage of apolipoprotein A-I. **J. Lipid Res**. v.40, p. 654–664,1999.

JIANG, X. C.; BRUCE, C. Regulation of murine plasma phospholipid transfer protein activity and mRNA levels by lipopolysaccharide and high cholesterol diet. **J. Biol. Chem.** v.270, p.17133–17138, 1995.

JONES, P.J.H.; RIDGEN, J.E.; BENSON, A.P. Influence of dietary fatty acid composition on synthesis and esterification in hamsters. **Lipids**. v. 25, p.815-820, 1990.

KONTUSH, A.; CHAPMAN, M.J. Antiatherogenic small, dense HDL-guardian angel of the arterial wall? **Nat Clin Pract Cardiovasc Med.**3(3):144-53, 2006.

KOTAKE, H.; SEKIKAWA, A.; YOSHIHISA, T.; ISHIGAKI, Y.; OIKAWA, O. – Effect of HMG-CoA reductase inhibitor on plasma cholesteryl ester transfer protein activity in primary hypercholesterolemia: comparison among CETP/TaqIB genotype subgroups. **J of Atheros Thromb**, v. 9(5), p. 207-12, 2002.

KURUSHIMA, H.; HAYASHI, K.; SHINGU, T.; KUGA, Y.; OHTANI, H.; OKURA, Y. Opposite effects on cholesterol metabolism and their mechanisms induced by dietary oleic acid and palmitic acid in hamsters. **Biochim. Biophys. Acta** v.1258, p.251–256, 1995.

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

LAGROST L.; MENSINK, R.P.; GANGREMONT, V. G.; TEMME, E.H.M.; DESRUMAUX, C. et al. Variations in serum cholesteryl ester transfer and phospholipids transfer activities in health women and men consuming diets enriched in lauric, palmitic or oleic acids. **Atherosclerosis**, v.142, p.395-402, 1999.

LAMARCHE, B.; RASHID, S.; LEWIS, G.F. HDL metabolism in hypertriglyceridemic states: an overview. **Clinica Chimica Acta**, v. 286, p.145-61, 1999.

LEITER, L.A.. Low density lipoprotein cholesterol: is lower better? *Canadian Journal of Cardiology*, **16 (suppl A):20 A-22 A, 2000.**

LESNIK, P.; CHAPAN, M.J.- A new dimension in the vasculoprotective function of HDL. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, v.26, p.965-67, 2006.

LEWIS, G.F.; RADER, D.J. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res.*, v. 96(12), p. 1221-1232, 2005.

LIAO, J.K.; Endothelium and acute coronary syndromes. *Clin Chem*, v.44(8), p. 1799-1808, 1998.

LIBBY, P. Inflammatory and immune mechanisms in atherogenesis. In: Leaf A, Weber P, eds. **Atherosclerosis reviews**, New York: Raven Press, p.70-89, 1990.

LICHTENSTEIN, A. H.; AUSMAN, L. M.; JALBERT, S. M.; SCHAEFER, E. J. Effects of different forms of dietary hydrogenated fats on serum lipoprotein cholesterol levels. *N. Engl. J. Med.* v.340, p.1933–1940, 1999.

LIRA, M.G.; MOTTES, M.; PIGNATTI, PF.; MEDICA, I.; UZIEL, G.; CAPPA, M.; BERTINI, E.; RIZZUTO, N.; SALVIATI A. Detection of mutations in the ALD gene (ABCD1) in seven Italian families: description of four novel mutations. *Hum Mutat.*, v. 16, p.271, 2000.

LO PRETE, A.C.; DINA, C.H.; AZEVEDO, C.H.; PUK, C.G.; LOPES, N.H.; HUEB, W.A.; MARANHÃO, R.C. In Vitro Simultaneous Transfer of Lipids to HDL in Coronary Artery Disease and in Statin Treatment. *Lipids*, v.44, p.917-24, 2009.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265-275, 1951.

MACKNESS, M.I.; HARTY, D.; BHATNAGAR, D.; WINOCOUR, P.H.; ARROL, S.; ISHOLA, M.; DURRINGTON, P.N. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. **Atherosclerosis**; 86:193-9,1991.

MANIERO, F. **Efeito em hamsters da suplementação dietética com gorduras ricas em ácidos graxos saturados, monoinsaturados ou poliinsaturados sobre a transferência de lípidos para a lipoproteína de alta densidade (HDL)**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MARANHÃO, R. C.; TERCYAK, A. M.; REDGRAVE, T. G. Effects of cholesterol content on the metabolism of protein-free emulsion models of lipoproteins. **Biochim. Biophys Acta**, v.875, p.247-55, 1986.

MARANHÃO, R.C. ; ROLAND, I.A. ; TOFFOLETTO, O. ; RAMIRES, J.A. ; GON CALVES, R.P. ; PILEGGI, F.- Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to LDL receptors. **Lipids**, v. 32, p. 627-33, 1997.

MARANHÃO, R.C.; CESAR, T.B.; PEDROSO-MARIANI, S.R.; HIRATA, M.H.; MESQUITA, H.C.- Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling LDL. **Lipids**, v.28, p. 691-6, 1993.

MARCEL, Y.L.; VEZINA, C.; TENG, B.; SNIDERMAN, A.- Transfer of cholesterol esters between human high density lipoproteins and triglyceride-rich lipoproteins controlled by a plasma protein factor. **Atherosclerosis**, v. 35, p.127-33, 1980.

MARMILLOT P, PATEL S, LAKSHMAN MR. Reverse cholesterol transport is regulated by varying fatty acyl chain saturation and sphingomyelin. **Metabolism**.;56(2):251-9, 2007.

MEIJER, G.W.; DEMACKER, P.N.M.; VAN TOL, A.; GROENER, J.E.M.; VAN DER PALEN, J.G.P.; STALENHOF, A.F.H. Plasma activities of lecithin:cholesterol acyltransferase, lipid transfer protein and post-heparin lipases in inbred strain of rabbits hypo- and hyper responsive to dietary cholesterol. **Biochemical Journal**. v.293, p.729-734, 1993.

MEYERS, C.D.; KASHYAP, M.L.- Pharmacologic elevation of highdensity lipoproteins: recent insights on mechanism of action and atherosclerosis protection. **Curr Opin Cardiol.** ,v. 19(4): p. 366-73,2004.

MILLER, K. W.; SMALL, D. M. Surface to core and interparticle equilibrium distribution of triglyceride-rich lipoprotein lipids. **J Biol Chem**, v. 258,P. 13772-13784, 1983a.

MILLER, K. W.; SMALL, D. M. Triolein-cholesteryl oleate-cholesterol-lecithin emulsions, structural models of triglyceride-rich lipoproteins. **Biochemistry**, v. 22, p. 443-451, 1983b.

MINEO, C.; DEGUCHI, H.; GRIFFIN, J.H.; SHAUL, P.W. – Endothelial and antithrombotic actions of HDL. **Circ Res.**, v.98(11), p. 1352-64, 2006.

MOVVA, R.; RADER, D.J. Laboratory Assessment of HDL Heterogeneity and Function. **Clinical Chemistry**, v. 54, p. 5788–800, 2008.

NEGRE-SALVAYRE, A; DOUSSET, N; FERRETTI, G; BACCHETTI, T; CURATOLA, G; SALVAYRE, R; - Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. **Free Radic Biol Med.**, v. 41(7), p. 1031-40, 2006.

NENSETER, M. S.; BLOMHOFF, R.; DREVON, C. A.; KINDBERG, G. M.; NORUM, K. R.; BERG, T. Uptake of LDL in parenchymal and non-parenchymal rabbit liver cells in vivo LDL uptake is increased in endothelial cells in cholesterol-fed rabbits. **Biochem. J.**, v.254, p.443-448, 1988.

NICHOLLS, S.J.; TUZCU, E.M.; SIPAHI, I.; GRASSO, A.W.; SCHOENHAGEN, P.; HU, T.; WOLSKI, K.; CROWE, T.; DESAI, MY.; HAZEN, S.L.; KAPADIA, S.R.; NISSEN, S.E.- Statins, highdensity lipoprotein cholesterol, and regression of coronary atherosclerosis. **JAMA**, v. 297(5), p. 499-508, 2007.

NICOLOSI, R.J. Dietary fat saturation effects on low-density-lipoprotein concentrations and metabolism in various animal models. **Am J Clin Nutr.** v.65, p.1617–27, 1997.

NORATA, G. D.; PIRILLO, A.; CATAPANO, A. L. Modified HDL: biological and physiopathological consequences. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v. 16, p. 371-386, 2006.

O'BRIEN, K.D.; VULETIC, S.; MCDONALD, T.O.; WOLFBAUER, G.; LEWIS, K.; TU, A.Y.; MARCOVINA, S.; WIGHT, T.N.; CHAIT, A.; ALBERS, J.J. Cell-associated and extracellular phospholipid transfer protein in human coronary atherosclerosis. **Circulation**, v. 108(3), p. 270-4, 2003.

OOSTERVEER, M.H.; VAN DIJK, T.H.; TIETGE, U.J.; BOER, T.; HAVINGA, R.; STELLAARD, F.; GROEN, A.K.; KUIPERS, F.; REIJNGOUD, D.J. High fat feeding induces hepatic fatty acid elongation in mice. **PLoS One**, v.4(6), p.e6066, 2009.

PADOVEZE, A.F.; MANIERO, F.; OLIVEIRA, T.V.; VITÓRIO, T.S.; COUTO, R.D.; MARANHÃO, R.C. Effect of a cholesterol-rich diet on the metabolism of the free and esterified cholesterol components of a nanoemulsion that resembles LDL in rabbits. **Braz J Med Biol Res.** v.42(2), p.172-8, 2009.

PAOLETTI, R.; GOTTO, A . M.; HAJJAR, D. P. Inflammation in Atherosclerosis and Implications for Therapy, **Circulation**. 2004.

PILLARISETTI, S.; ALEXANDER, CW.; SAXENA, U. Atherosclerosis - new targets and therapeutics. **Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents.** v.2, n.4, p.327-34, 2004.

PUK, C.G.; BOCCHI, E.A.; LO PRETE, A.C.; FERREIRA, S.M.; STOLF, N.A.; MARANHÃO, R.C. Transfer of cholesterol and other lipids from a lipid nanoemulsion to high-density lipoprotein in heart transplant patients. **J Heart Lung Transplant**, v.28(10), p.1075-1080, 2009.

PUSSINEN, P.; JAUHAINEN, M.; METSO, J.; TYYNELÄ, J.; EHNHOLM, C. Pig plasma phospholipid transfer protein facilitates HDL interconversion. **J Lipid Res.** v.36, p.975-985, 1995.

QUIG, D.W.; ARBEENEY, C.M.; ZILVERSMIT, D.B. Effects of hiperlipidemias in hamsters on lipid transfer protein activity and unidirectional cholesteryl ester transfer in plasma. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1083, p.257-264, 1991.

RADER, D.J.- Mechanisms of Disease: HDL metabolism as a target for novel therapies. **Nature Clinical Practice**, v.4, p.102-8, 2007

RADER, D.J.; High-density lipoprotein and atherosclerosis. **Am. J. Cardiol.**, v. 90(8A), p. 62-70, 2002.

RIDKER, P.M.; GENEST, J.; LIBBY, P. Risk factors of atherosclerotic disease. **Heart Disease**. p.1010-1039, 2001.

ROCHA, M.P.; MARANHÃO, R.C.; SEYDELL, T.M.; BARCELLOS, C.R.; BARACAT, E.C.; HAYASHIDA, S.A.; BYDLOWSKI, S.P.; MARCONDES, J.A. Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins and lipid transfer to high-density lipoprotein in young obese and normal-weight patients with polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril**. 2009 (in press).

ROSS, R.- Atherosclerosis is an inflammatory disease. **New Engl. J. Med.**, v. 340, p.115-26, 1999.

SANTOS-GALLEGO, C.G.; IBANEZ, B.; BADIMON, J.J. HDL-cholesterol: Is it really good?:Differences between apoA-I and HDL. **Biochemical Pharmacology**, v.76, p.443-452, 2008.

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

SCHAEFER, E.J.; ZECH, L.A.; JENKINS, L.L.; BRONZERT, T.J.; RUBALCABA, E.A.; LINDGREN, F.T.; AMODT, R.L.; BREWER, J.R.- Human apolipoprotein A-I and A-II metabolism. **J. Lipid Res.**, v.23, p. 850-62, 1982.

SENTI, M.; TOMAS, M.; FIO, M.; WEINBRENNER, T.; COVAS, M.I.; SALA, J.; MASIA, R.; MARRUGAT, J.- Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 88(11), p. 5422-6, 2003.

SETALA, L. N.; HOLOPAINEN, J. M.; METSO, J.; WIEDMER, S.; YOHANNES, G.; KINNUNEN, P. K. J.; EHNHOLM, C.; JAUHAINEN, M. Interfacial and Lipid Transfer Properties of Human Phospholipid Transfer Protein: Implications for the Transfer Mechanism of Phospholipids. **Biochemistry**, v. 46, p. 1312-1319, 2007.

SEYDELL, T. M. **Transferência “in vitro” de uma nanoemulsão artificial para a fração HDL de pacientes com diabetes mellitus tipo 2.** 2007. 47f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SHAH, P.K.; KAUL, S.; NILSSON, J.; CERCEK, B. Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming. **Circulation**, v. 104, p. 2376-2383, 2001.

SILVA, E.L. **Metabolismo dos quilomicrons artificiais em ratos com tumor de Walker-256: influência da dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados (n-6) e saturados.** 1992. [tese para obtenção do grau de mestre – apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

SIMA, A., STANCU, C., CONSTANTINESCU, E., OLOGEANU, L., SIMIONESCU, M. The hyperlipemic hamster – a model for testing the anti-atherogenic effect of amLodipine, **J. Cell Mol. Med.**, n.5, p.153-162, 2001.

SINGHAD, A.K.; FINVER-SADOWSKY, J.; MCSHERRY, C.K.; MOSBACH E. H. Effect of cholesterol and bile acids on the regulation of cholesterol metabolism in hamster. **Biochim Biophys Acta**, v.752, p.214-222, 1983.

SON, Y. S.; ZILVERSMIT, D. B. Increased lipid transfer activities in hyperlipidemic rabbit plasma. **Arteriosclerosis**. v. 6, p.345–351, 1986.

SPADY, D.K.. Dietary fatty acids and atherosclerosis regression. *British Journal of Nutrition*, 82:337-8, 1999.

SPADY, D. K.; KEARNEY, D. M.; HOBBS, H. H. Polyunsaturated fatty acids up-regulate hepatic scavenger receptor B1 (SR-B1) expression and HDL cholesteryl ester uptake in the hamster. **J. Lipid Res.** v.40, p.1384–1394, 1999.

SPADY, D.K., BILHEIMER, D.W., DIETSCHY, J.M. Rates of receptor-dependent and independent low density lipoprotein uptake in the hamster. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.80, p.3499-503, 1983.

SPADY, D.K., MEDDINGS, J.B.; DIETSCHY, J.M. Kinetic constants for receptor-dependent and receptor independent low-density lipoprotein transport in the tissues of rat and hamster. **J Clin Invest.**, v.77, p.1474-1481, 1986.

SPARKS, D. L.; DAVIDSON, W. S.; LUND-KATZ, S.; PHILLIPS, M. C. Effects of the neutral lipid content of high density lipoprotein on apolipoprotein A-I structure and particle stability. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 26910–26917, 1995.

SRIVASTAVA, N.; CHOWDHURY, P. R.; AVERNA, M.; SRIVASTAVA, R. A. Estrogen increases hepatic lipase levels in inbred strains of mice: a possible mechanism for estrogen-dependent lowering of high density lipoprotein. **Mol. Cell Biochem.** v.220, p.87–93, 2001.

STEIN, Y.; DABACH, Y.; HOLLANDER, G.; STEIN, O. Cholesteryl ester transfer activity in hamsters plasma: increase by fat and cholesterol rich diets. **Biochimica et Viophysica Acta.** v.1042, p.38-141,1990.

STEINBERG, D.; WITZTUM J.L.- lipoproteins and atherogenesis. **JAMA**, v.264, p. 3047-52, 1990.

STRUNZ, C.C.; OLIVEIRA, T.V.; VINAGRE, J.C.M.; LIMA, A.; COZZOLINO, S.; MARANHÃO, R.C. Brazil nut ingestion increased plasma selenium but

had minimal effects on lipids, apolipoproteins, and high-density lipoprotein function in human subjects. **Nutrition Research**, v.28, p.151-155, 2008.

SVIRIDOV, D.; NESTEL, P. Dynamics of cholesterol transport: protection against atherosclerosis. **Atherosclerosis**. v.161(2), p.245-54, 2002.

TAILLEUX, A.; DURIEZ, P.; FRUCHART, J.; CLAVEY, V. Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, 164:1-13, 2001.

TCHOUA, U.; GILLARD, B.K.; POWNALL, H.J. HDL superphospholipidation enhances key steps in reverse cholesterol transport. **Atherosclerosis**. 2009 (in press).

TERPSTRA, A.H.M.; BERG, P.V.D.; JANSEN, H.; BEYNEN, A.C.; TOL, A.V. Decreasing dietary fat saturation lowers HDL-cholesterol and increases hepatic HDL binding in hamsters. **British J Nutrition**, v.83, p.151-159, 2000.

TOMÁS, M.; LATORRE, G.; SENTI, M.; MARRUGAT, J. Función antioxidante de las lipoproteínas de alta densidad: un nuevo paradigma en la arteriosclerosis. **Rev Esp Cardiol.**, v.57, p.557-69, 2004.

TRAUTWEIN, E.A.; KUNATH-RAU, A.; DIETRICH, J.; DRUSCH, S.; ERBERSDOBLER, H.F. Effect of dietary fats rich in lauric, myristic, palmitic, oleic or linoleic acid on plasma, hepatic and biliary lipids in cholesterol-fed hamsters. **British Journal of Nutrition**. v.77, p.605-620, 1997.

TSUTSUMI, K.; HAGI, A.; INOUE, Y. The relationship between plasma high density lipoprotein cholesterol levels and cholesteryl ester transfer protein activity in six species of healthy experimental animals. **Biol Pharma Bull.**, v.24, p.579-581, 2001.

UINT, L.; SPOSITO, A.; BRANDIZZI, L.I.; YOSHIDA, V.M.; MARANHÃO, R.C.; LUZ, P.L. Cellular cholesterol efflux mediated by HDL isolated from subjects with low HDL levels and coronary artery disease. **Arq Bras Cardiol.**, v. 81, p. 39-41, 2003.

VAN ECK, M.; TWISK, J.; HOEKSTRA, M.; VAN RIJ, B.T.; VAN DER LANS, C.A.; BOS, I.S.; KRUIJT, J.K.; KUIPERS, F.; VAN BERKEL, T.J. Differential effects of scavenger receptor BI deficiency on lipid metabolism in cells of the arterial wall and in the liver. **J Biol Chem**, v.278, n.26, p.23699-23705, 2003.

VAN TOL, A. Phospholipid transfer protein. **Curr. Opin. Lipidol.** v.13, p. 135–139, 2002.

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

WANG, C.S.; BRIGGS, M.R. HDL: the metabolism, function, and therapeutic importance. **Chem Rev.**, v.104, p.119-137, 2004.

WILSON, T.A.; NICOLOSI, R.J.; KOTYLA, T.; SUNDRAM, K.; KRITCHEVSKY, D. Different palm oil preparations reduce plasma cholesterol concentrations and aortic cholesterol accumulation compared to coconut oil in hypercholesterolemic hamsters. **J Nutr Biochem**, v.16(10), p.633-640, 2005.

YANG, S.F.; TSENG, J.K.; CHANG, Y.Y.; CHEN, Y.C. Flaxseed oil attenuates nonalcoholic fatty liver of hyperlipidemic hamsters. **J Agric Food Chem**, v. 57(11), p.5078-5083, 2009.

ZIPES, D. P.; LIBBY, P.; BONOW, R. O.; BRAUNWALD, E. **Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular disease**. 7 ed. Philadelphia: Saunders, 2005.