

**AMANDA FELIPPE PADOVEZE**

**Cinética plasmática e biodistribuição de colesterol livre e  
colesterol esterificado de uma nanoemulsão (LDE) que se liga aos  
receptores de LDL em animais controle e com indução de  
aterosclerose**

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

**São Paulo  
2007**

**AMANDA FELIPPE PADOVEZE**

**Cinética plasmática e biodistribuição de colesterol livre e colesterol esterificado de uma nanoemulsão (LDE) que se liga aos receptores de LDL em animais controle e com indução de aterosclerose**

**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  
2007**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Padoveze, Amanda Felipe

Cinética plasmática e biodistribuição de colesterol livre e colesterol esterificado de uma nanoemulsão (LDE) que se liga aos receptores de LDL em animais controle e com indução de aterosclerose / Amanda Felipe Padoveze. -- São Paulo, 2007.

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

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: Raul Cavalcante Maranhão.

Descritores: 1.Colesterol 2.Emulsões 3.Lipoproteínas LDL  
4.Aterosclerose 5.Modelos animais 6.Cinética

USP/FM/SBD-166/07

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Amanda Felipe Padoveze

Cinética plasmática e biodistribuição de colesterol livre e colesterol esterificado de uma nanoemulsão (LDE) que se liga aos receptores de LDL em animais controle e com indução de aterosclerose.

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

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Aos meus pais, Clóvis e Cida, exemplos de persistência e dedicação, pelo amor, apoio e pela compreensão em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos, Amílcar e Ariane, pelo  
carinho e pelas alegrias proporcionados  
durante esta caminhada.

Aos meus avós e à minha tia Edna, pelo  
afeto, amor, atenção e belas recordações.

Aos melhores amigos, Fernanda Maniero e  
Ricardo Manzato Aranha, pela motivação,  
pelo acolhimento e sorrisos nos momentos  
de desânimo, pelo auxílio, carinho e pela  
amizade nos momentos de alegrias.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão, pela orientação, atenção, incentivo e pelos ensinamentos repassados ao longo deste trabalho.

A todos os funcionários da Divisão de Experimentação do InCor-HC-FMUSP, pela colaboração e pelo espaço concedido imprescindíveis para realização deste trabalho e, especialmente, ao Pedro, Anderson, Henrique, Vicente, Nelson, Richard, Nelsinho e Leandro, pelo auxílio e momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo e à Prof. Dra. Liliete Canes Souza, pela colaboração e disponibilidade.

Aos amigos Renato Barboza, Débora Deus e Camila Góes Puk, pelo apoio, pela motivação, paciência e longas discussões e, mais importante, pela amizade e pelos momentos de introspecção.

Aos colegas Ricardo David Couto, Emerson Silva Lima, Maria Rita Rodrigues, Elisabeth Maróstica, Carmen Guilherme Christiano de Matos Vinagre, pelo acolhimento, ensinamentos, incentivo e auxílio durante a elaboração desta tese.

Às pós-graduandas Tatiane Vanessa de Oliveira, Tatiana Solano Vitorio, Maria Elisabeth Fernandes Oliveira, pelo empenho e auxílio e, principalmente, pela amizade e momentos de risos e desabafos.

Às amigas Vanessa, Ana Cristina, Talita, Sheila, Carol, Lisa, Aleksandra, Juliana Vinagre, Cristina, Fabíola e Ana Carolina, pelas inúmeras ajudas, pelo incentivo, pela companhia e, sobretudo, pela amizade.

À Profa. Dra. Maria Rita Marques de Oliveira e ao Prof. Dr. Wolney Lisboa Conde, pela oportunidade e confiança, pelo respeito e valiosos ensinamentos.

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

Aos parentes e amigos, pelo incentivo, carinho e pela credibilidade durante todo o meu percurso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos, fundamental para o bom andamento e conclusão deste trabalho.

# SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Colesterol e suas formas.....	1
1.2. Metabolismo e transporte lipídico.....	4
1.3. Captação, transporte e efluxo intracelular de colesterol.....	7
1.4. Estabilização do colesterol e inibição da esterificação pelo tratamento com diazepam.....	10
1.5. Aterosclerose.....	14
1.6. Lipoproteínas artificiais.....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	20
3. OBJETIVO.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Materiais utilizados.....	26
4.2. Preparo da nanoemulsão artificial LDE.....	26
4.3. Modelos experimentais.....	27

4.4. Cinética plasmática e captação tecidual do $^3\text{H}$ - colesterol livre e do $^{14}\text{C}$ – colesterol esterificado da LDE em coelhos submetidos à indução de aterosclerose por dieta rica em colesterol.....	28
4.4.1. Animais.....	28
4.4.2. Preparo da dieta rica em colesterol.....	29
4.4.3. Avaliação do peso corporal dos animais e consumo de ração.....	29
4.4.4. Determinação do perfil lipídico.....	30
4.4.5. Determinação da cinética plasmática da LDE.....	30
4.4.6. Análise compartimental da curva de decaimento plasmático dos lípides radioativos.....	31
4.4.7. Determinação da captação tecidual do $^3\text{H}$ - colesterol livre e do $^{14}\text{C}$ – colesterol esterificado da LDE.....	32
4.4.8. Determinação da percentagem de lesão aterosclerótica nos segmentos arteriais.....	33
4.5. Estudo <i>in vitro</i> da captação do $^3\text{H}$ - colesterol livre e $^{14}\text{C}$ – colesterol esterificado da LDE por células endoteliais aórticas de coelhos.....	34
4.6. Captação tecidual do $^3\text{H}$ - colesterol livre e $^{14}\text{C}$ – colesterol esterificado da LDE em ratos após tratamento com diazepam.....	35
4.6.1. Animais.....	35
4.6.2. Determinação da captação tecidual do $^3\text{H}$ - colesterol livre e $^{14}\text{C}$ – colesterol esterificado da LDE.....	36
4.7. Análise estatística.....	36
5. RESULTADOS.....	38
5.1. Cinética plasmática e captação da LDE em coelhos submetidos à indução de aterosclerose por dieta rica em colesterol.....	39

5.1.1. Peso corporal e consumo de ração.....	39
5.1.2. Perfil lipídico.....	40
5.1.3. Estudos cinéticos da LDE.....	41
5.1.4. Captação da LDE.....	43
5.1.5. Lesão aterosclerótica.....	49
5.2. Captação da LDE <i>in vitro</i> por RAEC.....	51
5.3. Captação da LDE em ratos após tratamento com diazepam.....	52
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA-1	“ATP-binding cassette transporters A1”
ACAT	acil-colesterol-acil transferase
Apo	apolipoproteína, como apo A1, apo B100, apo E
CE	colesterol esterificado
CETP	proteína de transferência do éster de colesterol
CL	colesterol livre
CT	colesterol total
DAC	doença arterial coronária
FL	fosfolípidos
HDL	lipoproteína de densidade alta
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzimaA
IAM-1	“intercellular adhesion molecule-1”
IDL	lipoproteína de densidade intermediária
K	taxas fracionais de transferência
LCAT	lecitina-colesterol-acil transferase
LDE	nanoemulsão artificial rica em colesterol
LDL	lipoproteína de densidade baixa
LDL-r	receptor de LDL
LH	lipase hepática
LLP	lipase lipoprotéica
LOX-1	“Lectinlike Ox-LDL receptor-1”
LRP	“LDL receptor related protein”
NCEH	“neutral cholesterol ester hydrolase”
NCP1	“Niemann-Pick Type C protein”
PLTP	proteína transferidora de fosfolípidos
Qm	quilomícron
SR-B1	“scavenger receptor B1”
StAR	“steroidogenic acute regulatory protein”
TFR	taxa fracional de remoção

TG	triglicérides
VCAM-1	“vascular cell adhesion molecule-1”
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Perfil lipídico (mg/dL) de coelhos submetidos à indução de aterosclerose, antes e após o consumo da dieta rica em colesterol a 1% (n=13).....	41
Tabela 2-	Correlação entre a taxa fracional de remoção do $^3\text{H}$ – colesterol livre e do $^{14}\text{C}$ – colesterol esterificado e perfil lipídico.....	43
Tabela 3-	Captação tecidual de $^3\text{H}$ – colesterol livre e $^{14}\text{C}$ – colesterol esterificado em órgãos e segmentos arteriais de coelhos normais e de coelhos submetidos à indução de aterosclerose 24h após a injeção de LDE marcada.....	45
Tabela 4-	Correlação entre porcentagem de captação tecidual e taxa fracional de remoção do $^3\text{H}$ – colesterol livre e do $^{14}\text{C}$ – colesterol esterificado.....	46
Tabela 5-	Teste de comparação múltipla de Dunns, após teste de Kruskal-Wallis, entre as médias de captação de $^3\text{H}$ - colesterol livre e $^{14}\text{C}$ – colesterol esterificado nos órgãos e segmentos arteriais do grupo controle e do grupo submetido à indução de aterosclerose.....	48
Tabela 6-	Morfometria microscópica dos segmentos arteriais de coelhos submetidos à indução de aterosclerose após 8 semanas de consumo da dieta rica em colesterol a 1%.....	51
Tabela 7-	Influência da massa de LDE na captação do $^3\text{H}$ - colesterol livre e do $^{14}\text{C}$ – colesterol esterificado por células endoteliais aórticas de coelhos.....	52



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Peso corporal (kg) de coelhos submetidos à indução de aterosclerose durante 8 semanas de consumo da dieta rica em colesterol a 1% (n =13), (média ± DP).....39
- Figura 2- Consumo de ração (g/dia) por coelhos submetidos à indução de aterosclerose durante 8 semanas (n =13), (média ± DP).....40
- Figura 3- Curvas de decaimento plasmático do <sup>3</sup>H – colesterol livre (CL) e <sup>14</sup>C – colesterol esterificado (CE) da LDE em coelhos no período de 24h. A: grupo controle (n=8), B: grupo submetido à indução de aterosclerose por dieta rica em colesterol a 1% durante 8 semanas (n=6). Resultados expressos em média ± DP.....42
- Figura 4- Fotomicrografia dos segmentos arteriais obtidos de coelhos normais (A) e de coelhos submetidos à indução de aterosclerose por dieta rica em colesterol a 1% durante 8 semanas (B): 1 – arco aórtico, 2 – aorta torácica e 3 – aorta abdominal (50X).....50
- Figura 5- Percentagem de <sup>3</sup>H-colesterol livre e de <sup>14</sup>C - colesterol esterificado em relação a radioatividade total captada pelo baço, fígado e aorta de ratos 24 h após a injeção da LDE. A: grupo controle, tratado com salina (0,5mL/kg/dia) (n=9); B: grupo tratado com diazepam (0,5mg/kg/dia) (n=9). Resultados expressos em média ± DP. \* p<0,01; comparado ao <sup>14</sup>C – colesterol esterificado, teste de Mann-Whitney.....53

**RESUMO**

## RESUMO

PADOVEZE, A.F. **Cinética plasmática e biodistribuição de colesterol livre e colesterol esterificado de uma nanoemulsão (LDE) que se liga aos receptores de LDL em animais controle e com indução de aterosclerose.** São Paulo, 2007. 76p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo.

Estudos anteriores em nosso laboratório demonstraram que pacientes portadores de DAC apresentam diferenças no metabolismo do CL e CE de uma nanoemulsão artificial rica em colesterol (LDE), nos quais o CL apresentou maior remoção plasmática e depósito arterial. Dando continuidade a esta linha de pesquisa, neste trabalho foram avaliadas a cinética plasmática, representada pela taxa fracional de remoção (TFR), e a captação do  $^3\text{H}$ -colesterol livre ( $^3\text{H}$  - CL) e  $^{14}\text{C}$  - colesterol esterificado ( $^{14}\text{C}$  - CE) da LDE por segmentos arteriais e por órgãos de coelhos normais (n=17) e coelhos submetidos à indução de aterosclerose por dieta rica em colesterol (1%) (n=13). Além disso, avaliou-se a captação "in vitro" do  $^3\text{H}$  - CL e do  $^{14}\text{C}$  - CE da LDE por células endoteliais aórticas de coelhos. Por último, foi avaliada a influência da inibição da enzima lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), e indiretamente, a esterificação do CL em ratos normais (n=9) e tratados com diazepam (n=9). Em coelhos que receberam dieta normal, não houve diferença entre a remoção plasmática do  $^3\text{H}$  - CL e do  $^{14}\text{C}$  - CE. Em coelhos que desenvolveram hiperlipidemia e aterosclerose através de dieta rica em colesterol, o  $^3\text{H}$  - CL foi removido mais rapidamente da circulação do que o  $^{14}\text{C}$  - CE (p<0,05), entretanto houve maior captação de  $^{14}\text{C}$  - CE do que de  $^3\text{H}$  - CL no arco aórtico (p<0,05). Em ambos os grupos, os principais órgãos captadores de colesterol da LDE foram fígado, pulmão, adrenais e baço (p<0,05). Tanto a TRF quanto a captação hepática de  $^3\text{H}$  - CL e  $^{14}\text{C}$  - CE foram menores no grupo que recebeu a dieta rica em colesterol. Em células endoteliais aórticas de coelhos, a captação de  $^3\text{H}$  - CL foi maior que a de  $^{14}\text{C}$  - CE independente da massa de LDE incubada (p<0,01). Em ratos, não houve diferença entre a captação das duas formas de colesterol da LDE pela aorta no grupo controle, entretanto, quando a atividade da LCAT foi diminuída pelo tratamento com diazepam, a captação arterial de  $^3\text{H}$  - CL foi maior do que a de  $^{14}\text{C}$  - CE (p< 0,01). A hiperlipidemia e distúrbios no processo de estabilização do colesterol, favorecem a dissociação entre o CL e o CE das lipoproteínas, e podem elevar o risco de desenvolvimento da aterosclerose, assim como agravar o processo de aterogênese.

Palavras-chave: Colesterol, Emulsões, Lipoproteínas LDL, Aterosclerose, Modelos animais, Cinética.

**SUMMARY**

## SUMMARY

PADOVEZE, A.F. **Plasma kinetics and biodistribution of free cholesterol and cholesterol ester of a nanoemulsion that binds to LDL receptors in animals without and with atherosclerosis.** São Paulo, 2007. 76p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo.

In previously studies, it was shown that free cholesterol (FC) and cholesterol ester (CE) of a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) behaves differently in patients with coronary artery disease (CAD). The FC plasma clearance and arterial deposition is greater than CE. In the present study we evaluate the plasma kinetics, estimated by the fractional clearance rate (FCR), and the tissue uptake of  $^3\text{H}$ -free cholesterol ( $^3\text{H}$  - FC) and of  $^{14}\text{C}$  - cholesterol ester ( $^{14}\text{C}$  - CE) of LDE by arterial segments and organs of rabbits with (n=13) and without atherosclerosis (n=17). Furthermore, it was evaluated the "in vitro" uptake of  $^3\text{H}$  - FC and  $^{14}\text{C}$  - CE by rabbit aortic endothelial cells. Finally, it was evaluated the inhibition of the enzyme lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT), and indirectly, the FC esterification in rats non-treated (n=9) and treated with diazepam (n=9). In rabbits without atherosclerosis that received an standard diet there was no difference between the plasma clearance of  $^3\text{H}$  - FC and  $^{14}\text{C}$  - CE. In rabbits with hyperlipidemia and atherosclerosis induced by the cholesterol-rich diet the  $^3\text{H}$  - FC was removed faster than  $^{14}\text{C}$  - CE (p<0.05), however the arch aortic uptake of  $^{14}\text{C}$  - CE was greater than of  $^3\text{H}$  - FC (0p<0.05). In both groups, liver, lungs, adrenals and spleen were the principal sites of LDE cholesterol uptake. The FCR and tissue uptake were smaller in rabbits with than those without atherosclerosis. In rabbit aortic endothelial cells the  $^3\text{H}$  - FC uptake was greater than  $^{14}\text{C}$  - CE independently of incubated LDE mass (p<0.01). In control rats there was no difference on the arterial uptake of both cholesterol forms of LDE, but when the LCAT activity was diminished by the diazepam treatment, the arterial uptake of  $^3\text{H}$  - FC were greater than  $^{14}\text{C}$  - CE (p< 0.01). The hyperlipidemia and cholesterol stability alterations may lead to dissociation between lipoproteins FC and CE. This dissociation may increase the risk for atherosclerosis and likewise enhance the severity of atherosclerosis.

Keywords: Cholesterol, Emulsions, LDL lipoproteins, Atherosclerosis, Animal models, Kinetics.

## **1. INTRODUÇÃO**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Colesterol e suas formas

O colesterol é uma molécula anfipática constituída por uma porção polar, formada por um grupo hidroxila, e uma porção apolar, formada por uma cadeia de hidrocarbonetos e quatro anéis cíclicos derivados do ciclopentanoperidrofenantreno (DEVLIN, 2002; MURRAY et al., 2002).

Por ser um dos principais componentes estruturais das membranas biológicas, o colesterol é o esteróide mais abundante encontrado nos animais. É o precursor na biossíntese de ácidos biliares, vitamina D e esteróides biologicamente ativos secretados pelas gônadas, córtex adrenal e placenta (VOET; VOET, 1995).

A biossíntese do colesterol decorre em quatro fases: 1) condensação de três unidades de acetato, formando-se um intermediário com seis carbonos, o mevalonato; 2) conversão do mevalonato a unidades de isopreno ativadas; 3) polimerização de seis unidades isoprênicas com cinco carbonos, formando-se esqualeno, uma molécula linear com trinta carbonos; 4) ciclização do esqualeno, formando os quatro anéis do núcleo esteróide, com uma série de alterações adicionais (oxidação, remoção ou migração de grupos metil) e, conseqüente produção de colesterol. A conversão de 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzimaA (HMG-CoA) a mevalonato, reação catalisada pela enzima HMG-CoA redutase, é o passo que exerce maior controle na síntese e via metabólica do colesterol (MURRAY et al., 2002).

Todas as células do organismo são capazes de sintetizar o colesterol. Entretanto, o catabolismo do colesterol é limitado e ocorre principalmente no fígado e nos órgãos esteroideogênicos. Portanto, para ser metabolizado, o colesterol precisa ser removido dos demais tecidos e transportado para os tecidos especializados (YOKOYAMA, 2000).

O transporte de colesterol na circulação ocorre pelas lipoproteínas que são as unidades funcionais de transporte de lipídios na corrente sanguínea. As lipoproteínas são formadas por uma porção externa hidrofílica, constituída por fosfolípidos (FL), colesterol livre (CL) e proteínas, envolvendo um núcleo hidrofóbico contendo triglicérides (TG) e colesterol esterificado (CE) (BIGGERSTAFF; WOOTEN, 2004). As apolipoproteínas (Apos), componentes protéicos das lipoproteínas, promovem sua estabilização estrutural e solubilização de seus lípidos, mediam a captação celular das lipoproteínas por receptores específicos e atuam como ativadores ou inibidores enzimáticos no metabolismo lipídico (MORENO et al., 2006).

A forma livre do colesterol é mais instável na estrutura da lipoproteína do que a forma esterificada, e, portanto, pode se dissociar facilmente das lipoproteínas e se difundir no meio aquoso plasmático, onde a sua baixa solubilidade resulta em precipitação e depósito na parede arterial. Já o CE depende das chamadas proteínas de transferência, como a proteína de transferência do éster de colesterol (CETP), para deslocar-se de uma lipoproteína para outra (GARRET; GRISHAM, 1995). Dessa forma, seja na partícula da lipoproteína ou dentro da célula, o colesterol é preferencialmente mantido na forma mais estável, a esterificada.

Na circulação sanguínea, a esterificação do CL ocorre pela ação da enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), que ativada pela apo-AI transfere um ácido



graxo da lecitina para a posição 3- $\beta$ -hidroxi do colesterol, formando o CE. Essa reação ocorre principalmente nas lipoproteínas de alta densidade (HDL), importante sítio de esterificação do colesterol, responsável pela estabilização do colesterol no plasma (DOBIÁSOVÁ; FROHLICH, 1998). Quando no interior das células, o CL é esterificado pela ação da enzima acil-CoA colesterol aciltransferase (ACAT), que o estabiliza e permite seu armazenamento intracelular, eliminando possíveis efeitos tóxicos do acúmulo de colesterol em sua forma livre (WARNER et al., 1995; KELLNER-WEIVBEL et al., 1998; CHANG et al., 2006).

## **1.2. Metabolismo e transporte lipídico**

O transporte de lípidos na circulação sanguínea pode ser conceitualmente subdividido em dois sistemas: o transporte exógeno de lípidos provenientes da alimentação e o transporte endógeno de lípidos sintetizados no fígado.

A maior parte dos lípidos advindos da dieta é representada pelos TG e colesterol. No duodeno, os lípidos da dieta são emulsificados pela ação dos ácidos biliares da bile, formando as micelas de sais biliares que aumentam a superfície de contato das moléculas lipídicas à ação das lipases pancreáticas. As lipases convertem os TG em monoglicérides e diglicérides, ácidos graxos livres e glicerol, que se difundem para a mucosa intestinal. Os lípidos absorvidos no interior das células são reconvertidos em TG, e, junto com o colesterol da dieta, são acrescidos de proteínas sintetizadas nas células da parede, para então formar a lipoproteína quilomícron (Qm) (DVELIN, 2002). Parte do colesterol da dieta encontra-se em sua

forma esterificada e é hidrolisado pela ação da colesteryl esterase presente no suco pancreático, liberando ácido graxo e CL. Englobado nas micelas mistas, o colesterol livre difunde-se para as células epiteliais da mucosa, sendo reconvertido a CE e sendo incorporado às moléculas de Qm (HUSSAIN et al., 2000).

Os Qm, compostos de TG, FL, colesterol e proteínas (apoA-I, apoA-IV, apoB-48), são transportados na via linfática, e liberados na corrente sangüínea pelo ducto torácico. Na circulação, ao interagirem com as partículas de HDL, os Qm adquirem apoC-II, C-III, E e colesterol. A apoC-II ativa a enzima lipase lipoprotéica (LLP) localizada nas células endoteliais, que hidrolisa os TG dos Qm e libera ácidos graxos livres que serão armazenados no tecido adiposo ou utilizados como fonte energética pelo tecido muscular (GOLDMAN; BRAUNWALD, 2000; HUSSAIN et al., 2000; DEVLIN, 2002).

Após este processo de hidrólise, as partículas apresentam-se em menor tamanho, com quantidade relativamente maiores de CE e enriquecidas de apoE, chamadas de remanescentes de Qm (GOLDMAN & BRAUNWALD, 2000).

A remoção da circulação dos remanescentes de Qm ocorre pela interação entre a apoE e o receptor celular específico localizado principalmente nas células hepáticas, o "LDL-receptor related protein" (LRP) (GOLDMAN; BRAUNWALD, 2000; HUSSAIN et al., 2000).

O transporte endógeno de lípidos tem início com a formação das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) nos hepatócitos, as quais contêm principalmente TG e as apoB100, E e C. Nos capilares as VLDL sofrem ação da LLP originando partículas remanescentes, denominadas remanescentes de VLDL ou lipoproteínas de densidade intermediária (IDL). Grande parte das IDL é captada no fígado pelos receptores B/E ou receptores de LDL (LDLr). O restante das partículas de IDL sofre

ação da enzima lipase hepática (LH), que hidrolisa TG e FL, e resulta em partículas de menor densidade e maior conteúdo de colesterol, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Estas, assim como as IDL, são retiradas da circulação pelos receptores celulares B/E existentes em vários órgãos e tecidos corpóreos, principalmente no fígado. A LDL corresponde a 50% do total das lipoproteínas plasmáticas, sendo que a maior parte de seu colesterol encontra-se na forma esterificada, que perfaz 50% da partícula (BACHORICK et al., 1999).

A LDL ao se ligar aos receptores de LDL é internalizada e conduzida aos lisossomos para degradação. Os receptores retornam para a superfície celular para se ligarem a outras partículas de LDL. O colesterol liberado da LDL exerce ações regulatórias como aumento da atividade da ACAT para esterificação do colesterol; diminuição da atividade da HMGCoA redutase, responsável pela biossíntese de colesterol endógeno; e diminuição da síntese de receptores células para LDL, aumentando assim a sua concentração plasmática (BROWN; GOLDSTEIN, 1986).

As HDL são sintetizadas no fígado, no intestino e a partir de componentes das lipoproteínas ricas em TG. A ação da LLP sobre os TG dos Qm e VLDL acarreta em formação de partícula de menor diâmetro e em perda dos componentes de superfície em excesso (CL, FL e apoC), que são transferidos para as HDL (GOLDMAN; BRAUNWALD, 2000). A HDL também adquire quantidades extras de CL pela remoção do colesterol dos tecidos via dependente de receptor ou difusão passiva (BARTER et al., 2003). O CL agregado à superfície da HDL é imediatamente esterificado pela LCAT e transferido para lipoproteínas de menor densidade por um processo mediado pela CETP (GOLDMAN; BRAUNWALD, 2000).

### 1.3. Captação, transporte e efluxo intracelular de colesterol

A captação celular das duas formas de colesterol, o CL e o CE, pode ocorrer por diversas vias. A maior parte do colesterol exógeno é captado pelas células por receptores específicos presentes na superfície celular. As lipoproteínas, principalmente a LDL, ligam-se aos seus receptores destinados a endocitose, os receptores de LDL, em regiões especializadas da membrana denominadas cavidades revestidas. Sob a superfície destas cavidades, há um revestimento da proteína chamada clatrina, que facilita a formação de vesículas endocíticas, fundidas aos endossomos (FIELDING; FIELDING, 1997; SIMONS; IOKNEN, 2000; SCHOER et al., 2000).

Os receptores retornam para a superfície celular para se ligarem a outras partículas de LDL, enquanto o endossomo contendo as lipoproteínas liga-se ao lisossomo. As vesículas liberam a maioria do CL da LDL no citoplasma na forma de pequenas vesículas, enquanto o CE entra na via lisossomal, pela fusão entre os remanescentes das vesículas e o lisossomo, que hidrolisam o CE na matriz lisossomal, produzindo, colesterol e ácidos graxos (MAXFIELD; MENON, 2006). O colesterol pode ser então transferido para outras organelas, utilizado para síntese de membranas ou ser reesterificado no retículo endoplasmático pela ACAT (SIMONS; IOKNEN, 2000; SCHOER et al., 2000). O CE será então armazenado juntamente com TG no núcleo de gotículas lipídicas citosólicas (SOCCIO; BRESLOW, 2004). A enzima responsável pela hidrólise de CE nas gotículas lipídicas é denominada “neutral cholesterol ester hydrolase” (nCEH), e assim como a ACAT exerce papel importante na formação de células espumosas e aterosclerose.

O transporte de colesterol no interior da célula pode ser mediado através de vesículas ou por proteínas carreadoras que possuem cavidades hidrofóbicas que se ligam ao colesterol, a proteína StAR (“steroidogenic acute regulatory protein”), a caveolina e a proteína NCP1 (“Niemann-Pick type C protein”). A proteína StAR estimula a conversão mitocondrial de colesterol a esteróides, enquanto a proteína NCP1 remove o colesterol de compartimentos endossomais, o que facilita o transporte de esteróis para o complexo de Golgi ou outras carreadoras vesiculares (SIMONS; IOKNEN, 2000).

Outra forma de transporte não vesicular envolve a desorção espontânea de colesterol de uma membrana a outra membrana justaposta que podem estar ligadas por proteínas especializadas (SIMONS; IOKNEN, 2000; SOCCIO; BRESLOW, 2004). As membranas podem ter diferentes afinidades e capacidades de receber colesterol. Membranas ricas em esfingolípides e fosfolípides saturados possuem alta afinidade pelo colesterol.

A taxa de transferência de CL para fora do compartimento lisossomal não limita a captação de CE das lipoproteínas via LDL-r. O tempo de meia vida em que ocorre todo esse processo é de 42 a 60 minutos, sendo que a transferência do colesterol da matriz lisossomal até a sua apresentação na superfície celular ocorre em torno de 2 minutos em células intactas especializadas (SCHOER et. al., 2000; SOCCIO; BRESLOW, 2004). Sugere-se que a rapidez com que os esteróis são transferidos do lisossomo para o citoplasma seja decorrente da difusão passiva e espontânea (SCHROEDER et. al., 2000).

O colesterol no interior da célula é continuamente removido da membrana plasmática para a circulação por duas vias principais que envolvem o transporte reverso de colesterol: difusão aquosa ou ligação das partículas de HDL e suas

apolipoproteínas aos receptores de membrana nos tecidos periféricos (YOKOYAMA, 2000; SIMONS; IKONEN, 2002; YANCEY et al., 2003). A primeira via do efluxo de colesterol envolve a desorção espontânea de colesterol das membranas plasmáticas, estimulada pela superfície fosfolipídica das partículas de HDL, e sua difusão através da fase aquosa ao redor da célula (YOKOYAMA, 2000; YANCEY et al., 2003). Este modelo prevê um papel passivo da HDL e ocorre através de um gradiente de concentração de colesterol entre célula e membranas lipoprotéicas (ORAM; YOKOYAMA, 1996; MENDEZ, 1997; YANCEY et al., 2003). Já a segunda via de efluxo de colesterol propõe que a HDL e partículas contendo apoAI pobres em lípidos removam colesterol das células através da interação entre aceptores (apoAI, apoAII, ApoIV, apoE) e sítios de ligação da superfície celular, como os receptores “scavenger receptor B1” (SR-B1) e os transportadores “ATP-binding cassette transporters A1” (ABCA1) que requerem a presença, respectivamente, de FL e apoAI nos aceptores (ORAM; YOKOYAMA, 1996; YANCEY et al., 2003; RHAINDS; BRISSETTE 2004; CAVELIER et al., 2006).

A apoAI e a solubilização da membrana mediada pela ABCA1 estimulam a mobilização dos estoques de colesterol, que são esterificados pela ACAT no retículo endoplasmático, e evitam o acúmulo intracelular de colesterol, mesmo em macrófagos, células espumosas e placas ateroscleróticas (TAILLEUX et al., 2002).

Na circulação sanguínea, o CL removido pelas partículas da HDL dos tecidos periféricos e agregado à superfície da partícula, é imediatamente esterificado pela LCAT através da interação entre esta enzima e a apoAI presente na HDL, e dessa forma, incorporado ao núcleo da partícula. O CE pode então ser transferido para outras lipoproteínas de menor densidade, VLDL e LDL, por ação da CETP em troca de triglicérides. A proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP) também contribui

para o fluxo de CE da HDL para outras lipoproteínas (DURRINGTON, 2002). O colesterol, transportado para o fígado proveniente dos tecidos, pode ser reaproveitado, participando de outras vias metabólicas, ou excretado na bile, com reabsorção de cerca de dois terços do mesmo (GOLDMAN; BRAUNWALD, 2000).

#### **1.4. Estabilização do colesterol e inibição da esterificação pelo tratamento com diazepam**

A esterificação do CL mediada pela ACAT, assim como a hidrólise do CE pela nCEH, são processos fundamentais que promovem a homeostase do colesterol intracelular. O acúmulo da forma livre do colesterol pode ser citotóxico e, conseqüentemente, o colesterol é armazenado preferencialmente em sua forma mais estável, o CE, como gotículas lipídicas no interior das células (WARNER et al., 1995; KELLNER-WEIBEL et al., 1998).

Nos estágios iniciais da aterosclerose, a disfunção endotelial aumenta a permeabilidade do endotélio e permite o acúmulo subendotelial de lipoproteínas aterogênicas como a LDL oxidada. Estas lipoproteínas modificadas estimulam os monócitos circulantes a migrarem aos sítios de lesão e a penetrarem na íntima arterial. No espaço subendotelial, os monócitos se diferenciam em macrófagos e agem como células de varredura, removendo substâncias tóxicas por meio dos receptores "scavenger". A fagocitose crônica de lipoproteínas aterogênicas pelos macrófagos promove, continuamente, a esterificação do colesterol pela ação da ACAT. Este mecanismo de fagocitose não possui retroalimentação negativa, assim

os macrófagos tornam-se repletos de CE e convertem-se em células espumosas, caracterizando a placa aterosclerótica inicial (CHANG et al., 2006).

A inibição da esterificação de CL pela ACAT ou a diminuição da captação intracelular de colesterol promovem a hidrólise do CE e a liberação do CL, que rapidamente é transportado à membrana plasmática tornando-se disponível para efluxo celular (CHANG et al., 2006). Os inibidores de ACAT têm sido apontados como compostos químicos capazes de produzir efeitos antiaterogênicos sem afetar as concentrações plasmáticas de colesterol (BOCAN et al., 1991; KUSONOKI et al., 2001). Entretanto, estudos em camundongos “knockout” para o gene ACAT1 e apoE, ou ACAT1 e LDL-r, demonstraram que a deficiência total da ACAT leva a extensa deposição de CL na pele, no cérebro e na parede arterial desses animais, sugerindo que sua inibição pode promover o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (ACCAD et al., 2000; YAGYU et al., 2000; FAZIO et al., 2001).

No plasma, o processo de esterificação mediado pela enzima LCAT ativada pela apoA1 presente principalmente nas partículas HDL é a maior fonte de formação de CE e desempenha papel importante no remodelamento das lipoproteínas plasmáticas, no transporte reverso de colesterol e na estabilização do “pool” plasmático de colesterol (DOBIÁSOVÁ; FROHLICH, 1998). Ao promover a esterificação do colesterol recebido das outras classes de lipoproteínas ou das membranas celulares, a HDL transforma o CL em uma forma química mais apolar. As moléculas de colesterol passam da superfície para o centro das partículas de lipoproteínas (WANG; BRIGGS, 2004). Desta maneira, o colesterol é seqüestrado para o “pool” mais estável, evitando sua difusão e seu depósito na parede arterial.

A inibição da LCAT pode bloquear a transferência de CL da LDL para HDL, entretanto, o aumento da sua atividade não resulta necessariamente na



transferência celular de CL, assim como a deficiência total de LCAT não evita o efluxo celular de CL (DOBIÁSOVÁ; FROHLICH, 1998).

Doenças, como a deficiência de LCAT, resultam em aumento acentuado na incidência de doença arterial coronária precoce (GJONE, 1983; FROHLICH; MCLEOD, 1986). Solajic´-Bozicevic´ et al. (1991) observaram que a atividade da LCAT estava diminuída em pacientes portadores de doença arterial coronária (DAC), com aumento significativo da razão de CL/CE plasmático, comparados a indivíduos-controle sadios. Pode-se supor, portanto, que mesmo fora dessas doenças hereditárias muito raras, haja situações onde mecanismos de menor eficiência na esterificação de colesterol resultem em maior predisposição para DAC (SANTOS et al., 2003).

Estudos demonstraram que o diazepam tem ação sobre a inibição “in vitro” da síntese e esterificação do colesterol, assim como, possível mecanismo hipocolesterolêmico e de prevenção na formação da lesão aterosclerótica em diferentes espécies animais (WONG et al., 1980; PATEL et al., 1982; BELL, 1985; WONG et al., 1992).

O diazepam, classificado quimicamente como benzodiazepínico, é uma substância cristalina, heterocíclica e altamente lipossolúvel, usualmente utilizada como ansiolítico-tranquilizante, anticonvulsivante e relaxante muscular. Os efeitos farmacodinâmicos do diazepam são mediados por sua interação com sítios localizados próximos aos receptores do ácido  $\gamma$ -aminobutírico no sistema nervoso central. A interação do diazepam com estes sítios potencializa a ação do ácido  $\gamma$ -aminobutírico e promove a inibição do sistema nervoso central (RANG et al., 2001). O diazepam também pode interagir com os receptores periféricos de benzodiazepínicos localizados em tecidos periféricos, tais como fígado, pulmões,

rins e testículos. A ativação dos receptores periféricos de benzodiazepínicos desencadeia o transporte do colesterol intracelular à membrana mitocondrial. Em tecidos não-esteroidogênicos o papel desse receptor ainda é desconhecido e é possível que esse transporte constitua um processo essencial na construção da membrana interna das organelas (GORENSTEIN; POMPÉIA, 1999).

A partir do estudo norte-americano Lipid Reserach Clinics Prevalence (LRC Program Prevalence Study), Hunninghake et al. (1981) verificaram que homens e mulheres caucasianos, entre 20-69 anos, que faziam uso de benzodiazepínicos, apresentavam concentrações plasmáticas diminuídas de HDL-c e concentrações elevadas de TG e VLDL-c quando comparados a indivíduos-controle sadios que não faziam uso desses fármacos. Além disso, Cuparencu et al. (1978) observaram aumento nas concentrações de TG e diminuição nas concentrações de CT em ratos normolipidêmicos tratados com 5mg/kg de peso de diazepam.

Alguns estudos demonstraram que o diazepam poderia reduzir a incidência e gravidade da aterosclerose induzida experimentalmente em animais como coelhos e galos (WONG et al., 1980; PATEL et al., 1982; MÄNTTÄRI et al., 1982). Tais estudos levaram a hipótese de que, sob o efeito do diazepam, ocorram alterações nas atividades plasmática da LCAT e arterial da ACAT que teriam papel importante na deposição arterial de colesterol e, dessa forma, no processo aterosclerótico. Bell (1984) observou que o diazepam era um potente inibidor “in vitro” da esterificação do colesterol pela ACAT em aorta de ratos normais e em coelhos com aterosclerose induzida por dieta rica em colesterol. Além disso, em diferentes espécies animais, principalmente em coelhos, o diazepam promoveu inibição da atividade da LCAT, “in vitro”, dependente da concentração (WONG et al., 1992). Entretanto, ainda não foram realizados estudos que demonstram as conseqüências da inibição da

esterificação do colesterol, pelo tratamento com diazepam, na captação das duas formas de colesterol e sua relação com o processo da aterogênese.

### **1.5. Aterosclerose**

A arteriosclerose significa literalmente endurecimento das artérias, mais corretamente, entretanto, trata-se de um termo genérico para designar três padrões de doenças vasculares, a aterosclerose, a esclerose calcificada de Mönckeberg e a arteriolo-sclerose, que possuem em comum o espessamento e a perda da elasticidade das paredes das artérias (KUMAR et al., 2005).

A aterosclerose é o padrão dominante da arteriosclerose, que se caracteriza por uma reposta inflamatória crônica às lesões no endotélio, decorrentes da entrada e oxidação de lípidos na camada íntima, aumento da síntese da matriz extracelular, infiltrado celular, e conseqüente formação do ateroma nas artérias (YLÄ-HERTTUALA et al, 1996).

Embora a aterosclerose geralmente se torne clinicamente evidente a partir da meia idade ou mais tarde, trata-se de uma doença lentamente progressiva que começa na infância e evolui no decorrer de várias décadas (COTRAN et al., 2000).

Os processos básicos da aterosclerose consistem no espessamento e acúmulo de lípidos na camada íntima das artérias, principalmente as de calibre médio e grande, produzindo placas ateromatosas (YLÄ-HERTTUALA et al, 1996). Estas, também denominadas fibrogordurosas, são formadas de uma placa focal elevada no interior da íntima, com centro lipídico, principalmente colesterol e ésteres

de colesterol, e uma placa, que se projetam na luz das artérias (COTRAN et al., 2000; ZIPES et al., 2005).

Diversos fatores, como hipertensão arterial, diabetes melito, tabagismo e hipercolesterolemia, podem desencadear lesões no endotélio vascular iniciando o processo aterogênico (EATON, 2005). 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 (HOMMA, 2004). 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-dependente 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., 1990; CHOY et al., 2004; LIBBY; THEROUX, 2005). Os monócitos penetram na íntima e no espaço subendotelial, se transformam em macrófagos ativados que fagocitam a LDL oxidada, formando assim as células espumosas (YLÄ-HERTTUALA et al., 1989; WU et al., 1992; GLASS; WITZTUM, 2001; STOCKER; KEANEY, 2004).

Em adição, a lesão endotelial pode aumentar o recrutamento de macrófagos pela secreção de “monocyte chemoattractant protein-1” (MCP-1) e expressão de receptores celulares de superfície como E-selectina, P-selectina, “vascular cell adhesion molecule-1” (VCAM-1) e “intercellular adhesion molecule-1” (IAM-1) (ROSS, 1993; NOLL, 1998; LIBBY; THEROUX, 2005). Os macrófagos expressam em sua superfície receptores específicos que captam a LDL oxidada, os receptores

“scavenger”, que permitem o acúmulo excessivo de CE no interior dessas células e são os principais responsáveis pelo conteúdo de colesterol da placa de ateroma (WU et al., 1992; HILTUNEN et al., 1998<sub>A</sub>).

As células musculares lisas migram e se acumulam na íntima, onde proliferam. A proliferação dessas células é devida provavelmente à presença de LDL-r nestas células (IKEDA et al., 1994) e receptores para LDL oxidada (“lectinlike Ox-LDL receptor 1”, LOX-1) nas células endoteliais da camada íntima (KATAOKA et al., 1999; RICCIARELLI et al., 2000). Algumas células da musculatura lisa também são capazes de acumular lípidos, principalmente colesterol na forma esterificada, ocorrendo, assim, a formação de mais células espumosas (COTRAN et al., 2000).

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 (GLASS; WITZTUM, 2001; STOCKER; KEANEY, 2004).

A proliferação de células musculares lisas e a deposição de matriz extracelular são processos que se crônicos, transformarão a estria gordurosa em ateroma fibrogorduroso, pela deposição adicional de colágeno e proteoglicanos, além da formação da cápsula fibrosa pelo tecido conjuntivo proeminente na face da íntima. A proliferação celular adicional sobre os ateromas produzirá assim as placas fibrosas (COTRAN et al., 2000; PLUTZKY, 2003).

As placas fibrosas são denominadas lesões avançadas de aterosclerose, e quando se tornam comprometidas por trombose, hemorragia, e/ou calcificação, freqüentemente, são chamadas de lesões complicadas (ABRAMS et al., 1996;

COTRAN et al., 2000), e desencadeiam eventos clínicos agudos decorrentes da oclusão arterial, como isquemia cardíaca e enfarto do miocárdio.

### **1.6. Lipoproteínas artificiais**

A partir dos estudos das características físico-químicas das lipoproteínas plasmáticas, foram desenvolvidos modelos de nanoemulsões, 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 com a utilização de uma nanoemulsão artificial rica em colesterol (LDE), mas sem a parte protéica da lipoproteína (MARANHÃO et al., 1993). O objetivo principal desses estudos é o uso da LDE na investigação das dislipidemias.

A LDE não tem proteína, mas ao ser injetada na circulação plasmática, em contato com as lipoproteínas naturais, adquire apo E, que permite que ela seja reconhecida pelo receptor da LDL. A apo E serve então de ponte para a LDE 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 LDE 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

partícula artificial LDE tem mais afinidade pelos receptores de LDL do que a própria LDL natural (HIRATA et al., 1999). Isto acontece porque o meio ligante ao receptor utilizado pela LDE é a apo E, que tem mais afinidade pelo receptor do que a apo B-100 da LDL natural.

Em outras experiências, a LDE 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 LDE foi removida muito lentamente da circulação, confirmando o comportamento esperado. Por outro lado, em pacientes com leucemia mielocítica aguda, onde a expressão dos receptores de LDL está muito aumentada (HO et al., 1978), a remoção da LDE também está aumentada (MARANHÃO et al., 1994). Além disso, foi observado que a remoção da LDE é inversamente proporcional à idade dos indivíduos (PINTO et al., 2001). Isto explica perfeitamente o mecanismo do aumento da concentração do colesterol que acompanha o processo de envelhecimento: com a progressão da idade, a capacidade de remover a LDL da circulação diminui, em função da redução da expressão dos receptores de LDL (ERICKSSON et al., 1991).

Santos et al. (2003) demonstraram que pacientes normolipidêmicos portadores de DAC não apresentavam diferenças na remoção plasmática dos ésteres de colesterol da LDE quando comparados a indivíduos-controle sadios. No entanto, a forma livre do colesterol era removida do plasma mais rapidamente nos pacientes com DAC do que nos controles. Na seqüência desses experimentos (COUTO et al., 2007) injetou-se a LDE marcada com CL e CE radioativos em pacientes com DAC sendo submetidos à cirurgia de revascularização. Observou-se

que o CL da LDE era removido mais rapidamente da circulação que o CE, assim como uma maior deposição do CL em fragmentos de vasos descartados durante a cirurgia comparando-se à do CE.

Desta maneira o comportamento da LDE mostrou servir de ferramenta para avaliarmos o metabolismo da LDL. Quando comparada a LDL natural, a LDE oferece facilidades operacionais que tornam muito mais fácil a avaliação deste circuito metabólico. A LDE permite a avaliação de um número grande de indivíduos com a mesma preparação. No caso da LDL natural, a lipoproteína deve ser isolada de um indivíduo, marcada e reinjetada no mesmo indivíduo, devido ao risco de doenças infecto-contagiosas como a hepatite, síndrome da imunodeficiência adquirida e outras. Outra característica importante das nanoemulsões é que se pode variar a sua composição (MARANHÃO et al., 1986) e, desta forma, estudar outros aspectos do metabolismo lipídico como a esterificação do CL, a atividade de proteínas de transferência, o efeito de drogas hipolipemiantes e os mecanismos de captação vascular.



## **2. JUSTIFICATIVA**

## 2. JUSTIFICATIVA

Resultados iniciais do nosso laboratório de experiências realizadas em coelhos (PADOVEZE *et al.*, dados não publicados) indicam que a captação da LDE – e por extensão da LDL – pelo tecido arterial seja grande, embora bastante inferior à do fígado, principal órgão de captação da lipoproteína natural e da LDE. Os animais que estudamos até aqui eram coelhos-controle, em dieta normal e sem indução de aterogênese, e neles não observamos a predominância de captação arterial do colesterol livre em relação ao colesterol esterificado, como aconteceu nos pacientes com DAC submetidos a revascularização (COUTO *et al.*, 2007).

O conjunto desses resultados nos dá indícios de que poderemos estar diante de fenômenos e mecanismos de geração de aterosclerose ainda inexplorados. Abre-se a possibilidade de eventuais problemas ligados à esterificação e estabilidade do colesterol livre no interior da partícula da LDL e na deposição do colesterol livre na parede arterial que possam resultar em processos aterogênicos. Com a precipitação do colesterol na parede arterial, o conteúdo de colesterol livre na bicamada da membrana plasmática seria enriquecido. Isto levaria a perturbação das funções da membrana plasmática, resultando em alteração da função endotelial que poderiam desencadear lesões iniciais da aterogênese. Em caminho paralelo, pode-se imaginar também que haja depósito de colesterol livre na matriz e que o depósito de colesterol livre deflagre processos de natureza inflamatória que, ao lado do depósito lipídico, constituem-se as vertentes principais dos processos de geração da aterosclerose (ROSS, 1999). Tanto o enriquecimento das membranas plasmáticas

quanto o depósito da forma livre de colesterol na matriz já foram observados, em experiências de indução de aterosclerose por dieta rica em colesterol.

Portanto, face ao exposto acima, consideramos fundamental, além de completar a observação do depósito arterial das duas formas de colesterol da LDE em coelhos normais, observar este processo de depósito de colesterol livre e esterificado em coelhos portadores de aterosclerose induzida por manipulação dietética. Essa estratégia visa verificar a existência de um possível desbalanço nas duas formas do colesterol e caso isso for confirmado, estabelecer as bases experimentais para a exploração desse processo em futuros estudos clínicos.

Outra medida que pode fornecer chaves para a interpretação dos resultados de captação arterial do colesterol é a determinação do efeito da atividade de esterificação mediada pela LCAT e ACAT. Estudos demonstraram ação do diazepam sobre a inibição da síntese e esterificação do colesterol *in vitro*, e o seu possível mecanismo hipocolesterolêmico e de prevenção na formação da lesão aterosclerótica em diferentes espécies animais (WONG et al., 1980; PATEL et al., 1982; BELL, 1985; WONG et al., 1992). Diante disso, o tratamento com diazepam em ratos pode ser utilizado como modelo experimental para inibição da esterificação e desestabilização do colesterol. Tais efeitos poderiam causar um desbalanço na captação arterial das duas formas de colesterol levando ao aumento do depósito arterial de colesterol livre.

### **3. OBJETIVOS**

### 3. OBJETIVOS

- Avaliar a cinética plasmática e captação do colesterol livre e do colesterol esterificado da LDE por segmentos arteriais e por outros tecidos do organismo de coelhos normais e coelhos submetidos à indução de aterosclerose por dieta rica em colesterol.
- Determinar a captação *in vitro* da LDE por células endoteliais aórticas de coelhos (RAEC).
- Avaliar a influência da inibição da esterificação do colesterol na captação das formas de colesterol da LDE pelo fígado, baço e aorta de ratos tratados com diazepam.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Materiais utilizados

Os isótopos radioativos [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] oleato de colesterol e [ $7(n)\text{-}^3\text{H}$ ] colesterol foram obtidos da Amersham International (Little Chalfont, Inglaterra). Os lipídeos 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 utilizado para o preparo da dieta rica em colesterol foi obtido da Dolder AG (Basel, Suíça). Os kits para determinação enzimática de triglicérides, colesterol total e de HDL foram obtidos da Labtest Diagnostica S. A. (Minas gerais, Brasil). A ração comercial usual para coelhos e ratos foi adquirida da Purina Inc.

### 4.2 Preparo da nanoemulsão artificial LDE

A LDE foi preparada segundo a técnica descrita por Ginsburg *et al.* (1982). Em um frasco foram pipetados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de coesterol, 1 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol, diluídos em clorofórmio:metanol (2:1). Posteriormente, foram adicionados à mistura de lípides 1500 dpm dos isótopos  $^3\text{H}$  - colesterol livre ( $^3\text{H}$  -CL) e  $^{14}\text{C}$  - colesterol esterificado ( $^{14}\text{C}$  - CE). Os solventes residuais foram então evaporados da mistura sob fluxo de nitrogênio e dessecação a vácuo, por 16 horas, a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após a adição de 10 ml de tampão tris-HCl 0,01M, pH 8, a mistura de lípides 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 LDE 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 LDE 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 (0,22 $\mu$  de porosidade) sob fluxo laminar e armazenada a 4°C por até trinta dias.

### **4.3. Modelos experimentais**

- Coelhos “New Zealand” machos, pesando  $2,6 \pm 0,2$  kg (média  $\pm$  desvio padrão), mantidos em gaiolas climatizadas (20-22°C), com ciclo claro: escuro 12:12h, no Biotério da Divisão Experimental do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-HC-FMUSP). O consumo das dietas (ração comercial usual e dieta rica em colesterol) foi restrito a 150g/dia, enquanto a água foi mantida *ad libitum*.



- Ratos Wistar machos adultos, pesando  $280 \pm 26$  g (média  $\pm$  desvio padrão), provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico coletivas, 4-5 animais por gaiola, à temperatura controlada de 22-23°C, com ciclo claro: escuro 12:12h, no Biotério da Divisão Experimental do InCor-HC-FMUSP. A ração comercial usual (Purina Inc.) e água foram fornecidos *ad libitum*.

#### **4.4. Cinética plasmática e captação tecidual do $^3\text{H}$ - colesterol livre e do $^{14}\text{C}$ – colesterol esterificado da LDE em coelhos submetidos à indução de aterosclerose por dieta rica em colesterol**

##### **4.4.1. Animais**

Foram utilizados 30 coelhos New Zealand machos que inicialmente consumiram ração comercial usual (Purina Inc.) constituída de 16% de proteínas, 7% de lipídeos, 14% de fibra bruta, 7% de cinzas e 50% de extrato não-nitrogenado por uma semana para adaptação às condições ambientais do biotério.

Após, os coelhos foram divididos em 2 grupos:

- Grupo controle, constituído de 17 animais, foi mantido sob ração comercial usual durante 8 semanas.

- Grupo submetido à indução de aterosclerose por dieta rica em colesterol, constituído de 13 animais, consumiu a ração comercial usual com acréscimo de 1% de colesterol (peso/peso) durante o mesmo período.

#### **4.4.2. Preparo da dieta rica em colesterol**

A dieta rica em colesterol foi preparada pela vaporização de uma solução de colesterol, éter etílico e etanol a 70% sobre a ração comercial usual, na proporção de 1 g de colesterol para 100g de ração.

O colesterol foi dissolvido adicionando-se 50 ml de éter etílico e 100 ml de álcool a 70%/g de colesterol, a 40°C sob agitação. Após adicionado a solução, a ração permaneceu em repouso por 24 horas em capela para evaporação completa dos solventes. A dieta rica em colesterol foi pesada e separada em porções individuais de 150g em saco plástico lacrado e armazenada a -20°C.

#### **4.4.3. Avaliação do peso corporal dos animais e consumo de ração**

Os animais foram pesados a cada 8 dias para avaliação do peso corporal. O consumo de ração foi avaliado a cada 4 dias, pesando-se o resíduo de ração.

#### **4.4.4. Determinação do perfil lipídico**

O perfil lipídico sérico dos coelhos foi determinado antes e após o consumo da dieta. As amostras de sangue venoso foram coletadas após jejum de 12h e centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos a 4°C para separação do soro.

Os triglicérides e colesterol total 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 colesterol de HDL foi determinado pelo mesmo método utilizado para o colesterol total, após precipitação das VLDL e LDL segundo Burnstein et al. (1970).

Para determinação do colesterol total no grupo de animais submetidos à indução da aterosclerose, diluiu-se o soro com solução de NaCl 150 mmol/L na proporção de 1:9. Os dados obtidos foram ajustados para mg/dL.

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

#### **4.4.5. Determinação da cinética plasmática da LDE**

O estudo do comportamento cinético da LDE foi realizado nos animais após jejum de 12 horas. Foram injetados cerca de 100µL de LDE marcada com <sup>3</sup>H - CL e <sup>14</sup>C – CE na veia auricular dos coelhos. As amostras de sangue foram colhidas em intervalos pré-determinados, 5 minutos, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas, da veia auricular contralateral desses animais. Após a coleta, o plasma foi separado por centrifugação

e alíquotas de 200µL foram pipetadas em tubos de cintilação. Foram acrescentados a esses tubos, 5 ml de solução cintiladora (Ultima Gold XR, PerkinElmer). A radioatividade foi medida em contador Beta (Liquid Scintillation Analyzer, 1600<sup>TR</sup> Tri-Carb, PACKARD), sob utilização do software SpeedSTAR Plus Vers. 5.01 da Diamond Computers, para determinação das contagens de <sup>3</sup>H - CL e <sup>14</sup>C – CE das amostras.

#### **4.4.6. Análise compartimental da curva de decaimento plasmático dos lípides radioativos**

Determinada a radioatividade presente nas amostras de plasma nos tempos de coleta, foram traçadas as curvas de decaimento plasmático e realizado o cálculo dos parâmetros cinéticos dos componentes lipídicos radioativos da nanoemulsão, por meio de um programa computacional de análise de cinética de emulsões artificiais (MESQUITA, 1994).

A curva de decaimento plasmático da LDE apresenta um perfil biexponencial com um rápido decaimento inicial seguido de um decaimento mais lento. Esse perfil levou a adoção de um modelo com dois compartimentos a partir do qual foram calculados os parâmetros cinéticos (k).

Os compartimentos e os parâmetros cinéticos (k) desse modelo são definidos do seguinte modo:

- compartimento 1: representa a nanoemulsão, no caso a LDE, introduzida no espaço intravascular;

- compartimento 2: LDE sendo removida por receptores presentes no endotélio vascular e/ou espaços extravasculares;
- $k_{1,0}$ : representa a fração da nanoemulsão que é injetada no compartimento plasmático;
- $k_{1,2}$ : representa a fração da nanoemulsão removida do compartimento plasmático para espaço intravascular;
- $k_{2,0}$ : representa a fração de remanescente de LDE que é removida do compartimento plasmático para espaço extravascular.

Para representar a remoção das partículas de lípides marcados foram utilizados os parâmetros denominados taxas fracionais de remoção (TFR), em  $h^{-1}$ , estimados segundo Matthews (1957) utilizando-se as respectivas taxas fracionais de transferência (k) :

$$TFR = \{(k_{1,0} + k_{1,2}) \cdot k_{2,0}\} / (k_{1,2} + k_{2,0})$$

#### **4.4.7. Determinação da captação tecidual do $^3H$ - colesterol livre e do $^{14}C$ – colesterol esterificado da LDE**

Os coelhos foram sacrificados com injeção intravenosa de pentobarbital sódico a 5% 24 horas após a injeção da LDE marcada com lípides radioativos.

Os órgãos e tecidos (fígado, pulmão, coração, baço, rim, pâncreas, gônadas, adrenais, vesícula biliar, tecido adiposo, músculo e pele), e os fragmentos arteriais (arco aórtico, aorta abdominal e torácica) foram removidos, limpos e acondicionados em solução fisiológica gelada. Em seguida, os tecidos foram pesados (250mg) e

macerados deixando-os com aspecto pastoso. Após, as amostras foram colocadas em tubos de extração adicionando-se 21 ml clorofórmio: metanol (2:1) e deixadas em repouso “overnight” para extração do colesterol livre e esterificado segundo o método de Folch (1957).

Após as amostras serem filtradas em papel de filtro por gravidade, adicionou-se 5ml de água:metanol (1:1) aos tubos, mantendo-os em repouso, “overnight” a 4°C . Após o repouso, a fase sobrenadante foi aspirada a vácuo e então descartada.

Todo infranadante foi transferido para tubos de cintilização e secado à vácuo. As amostras foram ressuspendidas adicionando-se 5 ml solução cintiladora PPO/POPOP/ Triton X-100/ tolueno (5,0 g/ 0,5g/ 333 mL/667 mL). A radioatividade foi medida em contador Beta (Liquid Scintillation Analyzer, 1600<sup>TR</sup> Tri-Carb, PACKARD), sob utilização do software SpeedSTAR Plus Vers. 5.01 da Diamond Computers, para determinação das contagens de <sup>3</sup>H - CL e <sup>14</sup>C – CE das amostras.

#### **4.4.8. Determinação da % de lesão aterosclerótica nos segmentos arteriais**

Os segmentos arteriais – arco aórtico, aorta torácica e abdominal – foram dissecados, limpos, lavados com salina e fixados em formaldeído a 4%. Após a fixação, os segmentos foram embebidos em parafina e os cortes histológicos de cada segmento corados com solução de hematoxilina/eosina. A percentagem de lesão aterosclerótica (% área de lesão aterosclerótica/área da íntima-média) foi medida por planimetria pelo programa computacional Image Analysis System Quantiment500+ (Leica Cambridge Ltd., Cambridge, UK).

#### **4.5. Estudo *in vitro* da captação do $^3\text{H}$ - colesterol livre e $^{14}\text{C}$ – colesterol esterificado da LDE por células endoteliais aórticas de coelhos**

As células endoteliais aórticas de coelhos foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Francisco Laurindo, do laboratório de Biologia Vascular do Instituto do Coração da FMUSP. Esta é uma linhagem celular estabelecida e imortalizada por seleção pelo Prof. V. Buonassisi, da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

As células foram mantidas em placas de cultura contendo meio completo F-12 Coon's com penicilina/streptomomicina, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Gibco BRL-Life Technologies Grand Island, NY, USA) e foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Os experimentos foram realizados quando as células atingiram confluência de 90%.

A captação celular de LDE foi determinada pela incubação de  $5 \times 10^5$  células com quantidades crescentes de LDE marcada com  $^3\text{H}$  – CL e  $^{14}\text{C}$  – CE. As células foram plaqueadas em placas de Petri de 60mm. Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído por outro contendo 10% de SFB deslipidado (LPDS). Após 72 horas, foram adicionadas quantidades crescentes de LDE (2,5; 5; 10; 20; 40 e 80µL, que corresponde a 0,075 a 2,4mg de LDE) às placas e incubadas por 4 horas a 37°C. As células foram lavadas três vezes com PBS, raspadas e centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos. Foram adicionados 500µL de NaOH 0.5M, sob agitação, ao pelet para disruptura celular. Foram pipetadas 450µL das amostras em tubos de cintilação com solução cintiladora e a radioatividade medida em contador Beta. Nos 50µL

restantes foi determinada a concentração de proteínas das amostras pelo método de Bradford (1976).

#### **4.6. Captação tecidual do $^3\text{H}$ - colesterol livre e $^{14}\text{C}$ – colesterol esterificado da LDE em ratos após tratamento com diazepam**

##### **4.6.1. Animais**

Foram utilizados 18 ratos Wistar machos adultos, pesando  $280 \pm 26$  g (média  $\pm$  desvio padrão).

Os animais foram divididos em 2 grupos:

- Grupo controle: injeção via intraperitoneal de 0,5mL/ kg de peso/dia de soro fisiológico durante 4 dias;
- Grupo tratado com diazepam: injeção via intraperitoneal de 0,5 mg/ kg de peso/dia de diazepam durante 4 dias.



#### **4.6.2. Determinação da captação tecidual do $^3\text{H}$ - colesterol livre e $^{14}\text{C}$ – colesterol esterificado da LDE**

A LDE marcada com  $^3\text{H}$  - CL e  $^{14}\text{C}$  – CE foi injetada intraperitonealmente nos animais. Após 24 horas, os animais foram sacrificados em uma câmara fechada com éter etílico.

O fígado, o baço e a aorta foram removidos, limpos e acondicionados em solução fisiológica gelada. Em seguida, foram pesados 250mg de tecido de fígado e baço, e 100mg de tecido da aorta, e macerados deixando-os com aspecto pastoso. As amostras foram processadas conforme descrito no item 4.4.7.

#### **4.7. Análise estatística**

Os dados foram tabelados como média  $\pm$  desvio padrão ( $M \pm DP$ ). As diferenças entre os dados de captação entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney bicaudal. As diferenças entre as concentrações de TG, CT e HDL-c antes e após o consumo da ração rica em colesterol foram avaliados pelo teste de Wilcoxon bicaudal (teste não-paramétrico pareado). A análise de variância pelo teste de Kruskal-Wallis seguida do teste de comparações múltiplas de Dunns foi utilizada para comparar a diferença entre as médias e desvios da captação de  $^3\text{H}$  - CL e  $^{14}\text{C}$  - CE dos grupos estudados, e da variação do peso corporal e consumo de ração durante o período de experimentação.

O coeficiente de correlação linear de Spearman foi aplicado para avaliar a correlação entre % de lesão aterosclerótica e captação da LDE nos segmentos arteriais; % de lesão aterosclerótica e consumo de ração (g/dia); TFR  $^3\text{H}$  - CL e  $^{14}\text{C}$  - CE e perfil lipídico; TFR  $^3\text{H}$  - CL e  $^{14}\text{C}$  - CE e consumo de ração (g/dia), e quantidade de LDE incubada e captação da LDE no estudo in vitro com células endoteliais.

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

## **5. RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Cinética plasmática e captação da LDE em coelhos submetidos à indução de aterosclerose por dieta rica em colesterol

#### 5.1.1. Peso corporal e consumo de ração

A figura 1 mostra a variação do peso corporal dos coelhos submetidos à indução de aterosclerose durante 8 semanas. Nota-se que houve aumento de  $15\pm 1\%$  no peso corporal dos animais a partir do 34<sup>o</sup> dia após o início do consumo da dieta rica em colesterol a 1% ( $p < 0,01$ ).

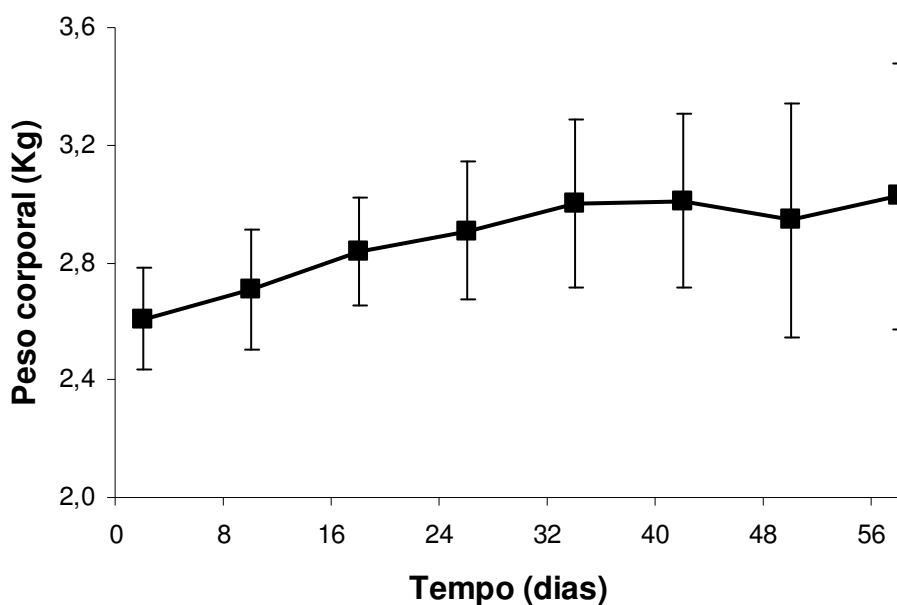


Figura 1 – Peso corporal (kg) de coelhos submetidos à indução de aterosclerose durante 8 semanas de consumo da dieta rica em colesterol a 1% ( $n = 13$ ), (média  $\pm$  DP).

A figura 2 mostra o consumo de ração dos coelhos submetidos à indução de aterosclerose. O consumo médio diário de ração foi de  $107 \pm 40$ g. Não houve alterações no consumo da dieta rica em colesterol a 1% durante este período ( $p=0,14$ ).

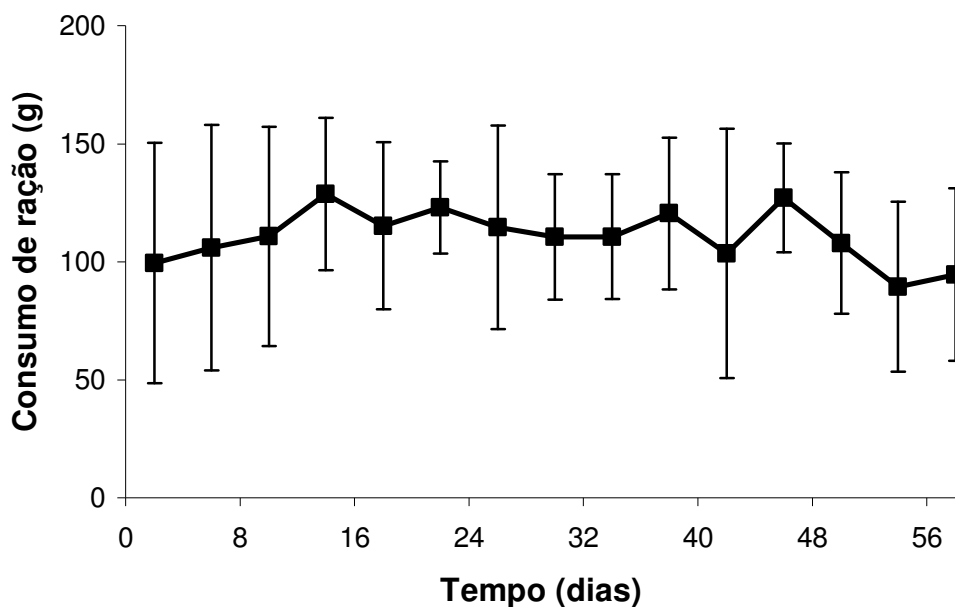


Figura 2 – Consumo de ração (g/dia) por coelhos submetidos à indução de aterosclerose durante 8 semanas ( $n=13$ ), (média  $\pm$  DP).

### 5.1.2. Perfil lipídico

A tabela 1 mostra os dados de concentração sérica de CT, HDL-c e TG (mg/dL) determinados nos coelhos submetidos à indução de aterosclerose, antes e após o consumo da dieta rica em colesterol a 1%. Não houve alteração nas concentrações séricas de HDL-c. Houve aumento de 2 e 44 vezes, respectivamente, nas concentrações séricas de TG e CT após o consumo da dieta.

Tabela 1. Perfil lipídico (mg/dL) de coelhos submetidos à indução de aterosclerose, antes e após o consumo da dieta rica em colesterol a 1% (n=13).

Perfil lipídico	Início	Final
Colesterol		
Total	51 ± 14	2267± 562*
HDL	19 ± 7	29 ± 16
Triglicérides	88 ± 36	214 ± 159*

Abreviaturas: HDL – lipoproteína de alta densidade. Resultados expressos em média ± DP.

\* p < 0,01, comparado ao início, teste de Wilcoxon.

### 5.1.3. Estudos cinéticos da LDE.

A figura 3 mostra as curvas de decaimento plasmático do  $^3\text{H}$  - CL e  $^{14}\text{C}$  - CE da LDE no grupo controle e no grupo submetido à indução de aterosclerose. No grupo controle não houve diferenças entre a TFR do  $^3\text{H}$  - CL e do  $^{14}\text{C}$  CE ( $0,170 \pm 0,038$  e  $0,234 \pm 0,056 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente,  $p=0,06$ ). No entanto, no grupo submetido à indução de aterosclerose foi observada uma maior TFR do  $^3\text{H}$  - CL em relação ao do  $^{14}\text{C}$  - CE ( $0,089 \pm 0,033$  e  $0,046 \pm 0,010 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente,  $p=0,03$ ). A remoção plasmática, tanto de  $^3\text{H}$  - CL quanto de  $^{14}\text{C}$  - CE, foi maior no grupo controle do que no grupo que recebeu a dieta (2 e 5 vezes maior respectivamente,  $p < 0,01$ ).

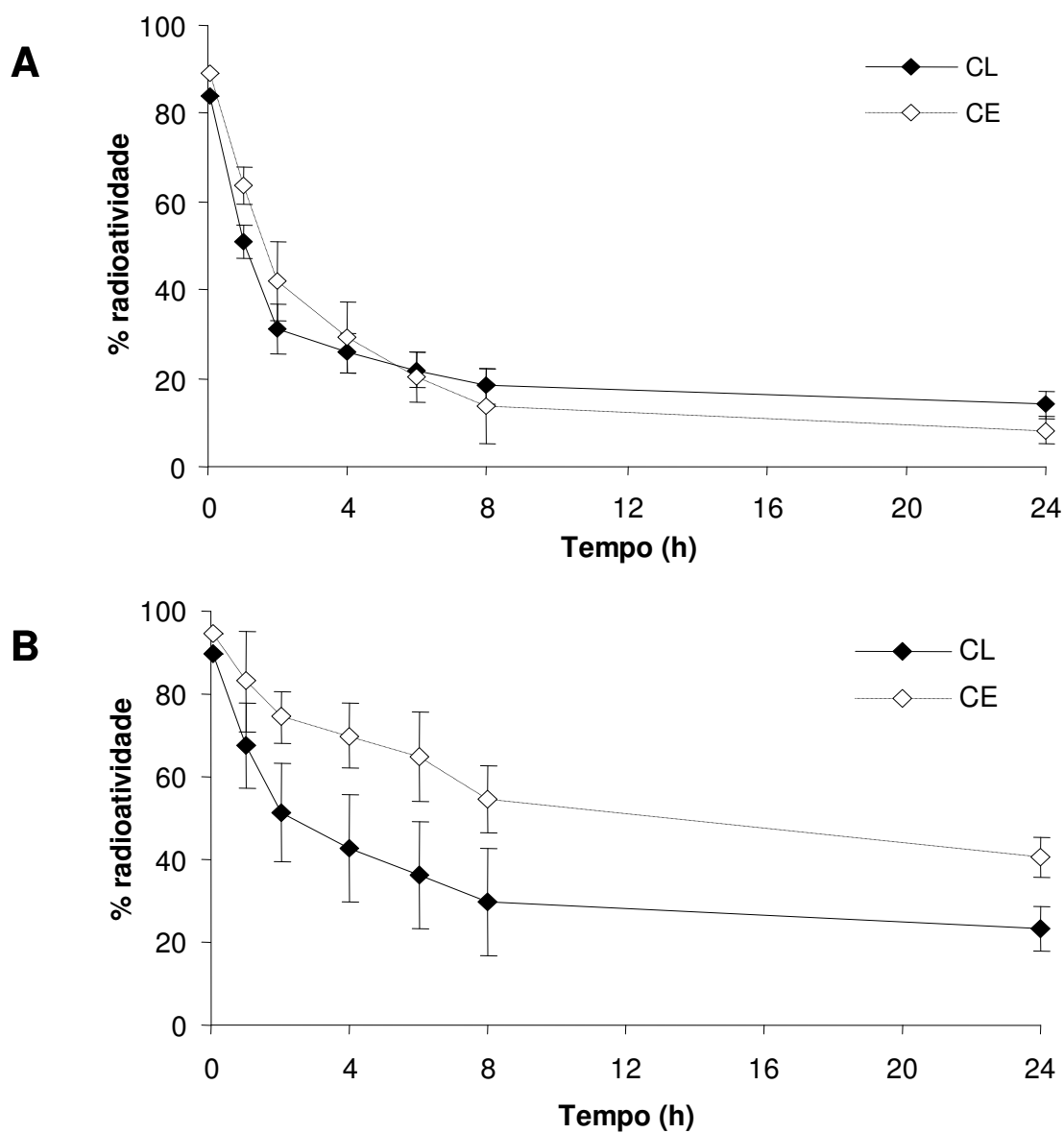


Figura 3 – Curvas de decaimento plasmático do  $^3\text{H}$  – colesterol livre (CL) e  $^{14}\text{C}$  – colesterol esterificado (CE) da LDE em coelhos no período de 24h. A: grupo controle (n=8), B: grupo submetido à indução de aterosclerose por dieta rica em colesterol a 1% durante 8 semanas (n=6). Resultados expressos em média  $\pm$  DP.

A tabela 2 mostra o estudo de correlação entre as TFR do  $^3\text{H}$  - CL e do  $^{14}\text{C}$  - CE e o perfil lipídico dos animais.

Embora a TFR e o consumo de ração (g/dia) dos animais que receberam uma dieta rica em colesterol a 1% não se correlacionarem (dados não mostrados), observou-se que as TFR, tanto de  $^3\text{H}$  - CL quanto de  $^{14}\text{C}$  - CE, e as concentrações séricas de CT e TG apresentaram correlação linear negativa. Em relação a concentração sérica de HDL-c, houve correlação linear negativa somente com a TFR do  $^{14}\text{C}$  - CE.

Tabela 2. Correlação entre a taxa fracional de remoção do  $^3\text{H}$  - colesterol livre e do  $^{14}\text{C}$  - colesterol esterificado e perfil lipídico\*.

TFR	CT		HDL-c		TG	
	r	p	r	p	r	p
$^3\text{H}$ - CL	-0,63	0,0323	-0,14	ns	-0,86	0,0006
$^{14}\text{C}$ - CE	0,-82	0,0019	-0,68	0,0251	-0,90	0,0002

Abreviaturas: CT – colesterol total; HDL – lipoproteína de alta densidade; HDL-c –colesterol de HDL; TG – triglicérides; ns – não significativo.\*Teste de correlação linear de Spearman.

#### 5.1.4. Captação da LDE

A tabela 3 mostra a captação tecidual do  $^3\text{H}$  - CL e  $^{14}\text{C}$  - CE em coelhos normais e coelhos submetidos à indução de aterosclerose por dieta avaliada 24 horas após a injeção de LDE. Os resultados estão expressos em % de radioatividade injetada por grama de tecido.

No grupo controle a captação média de  $^3\text{H}$  - CL foi maior do que a de  $^{14}\text{C}$  - CE pelo pulmão, coração e baço ( $p < 0,05$ ). No grupo submetido à indução de



aterosclerose a captação média de  $^3\text{H}$  - CL foi maior que a de  $^{14}\text{C}$  -CE pelo fígado e pelo rim ( $p<0,05$ ), ocorrendo o inverso no arco aórtico ( $p<0,01$ ).

O grupo submetido à indução de aterosclerose apresentou menor captação de  $^3\text{H}$  -CL e de  $^{14}\text{C}$ - CE pelo fígado, pulmão, baço, rim e aorta abdominal em comparação com o grupo controle ( $p<0,05$ ). Já o coração, as adrenais, o músculo e a aorta torácica, do grupo submetido à indução de aterosclerose, mostraram menor captação somente de  $^3\text{H}$ -CL ( $p<0,05$ ).

No grupo controle, comparando-se os 3 segmentos arteriais, não se observou diferenças na captação tanto de  $^3\text{H}$  - CL quanto de  $^{14}\text{C}$ - CE entre o arco aórtico, aorta torácica e abdominal ( $p=0,34$  e  $p=0,20$ , respectivamente). Entretanto, no grupo submetido à indução de aterosclerose, a captação de  $^3\text{H}$  -CL e de  $^{14}\text{C}$  – CE foi maior pelo arco aórtico do que pelas aortas torácica e abdominal ( $p<0,05$ ).

Tabela 3. Captação tecidual de  $^3\text{H}$  – colesterol livre e  $^{14}\text{C}$  –colesterol esterificado em órgãos e segmentos arteriais de coelhos normais e de coelhos submetidos à indução de aterosclerose 24h após a injeção de LDE marcada.

Órgãos/tecidos	Grupo controle (n=17)		Grupo submetido à indução de aterosclerose (n=13)	
	$^3\text{H}$ – CL	$^{14}\text{C}$ - CE	$^3\text{H}$ – CL	$^{14}\text{C}$ - CE
Fígado	0,102±0,066	0,096±0,071	0,040±0,014† ‡	0,027±0,009§
Pulmão	0,113±0,068*	0,092±0,199	0,023±0,016‡	0,013±0,007§
Coração	0,066±0,060*	0,022±0,026	0,016±0,018‡	0,012±0,014
Baço	0,133±0,073*	0,051±0,038	0,020±0,015‡	0,017±0,011§
Rim	0,050±0,033	0,038±0,031	0,013±0,007† ‡	0,006±0,003§
Pâncreas	0,002±0,001	0,003±0,002	0,003±0,003	0,008±0,007
Gônadas	0,011±0,006	0,006±0,001	0,003±0,001	0,003±0,001
Adrenais	0,296±0,098	0,148±0,074	0,016±0,004‡	0,022±0,023
Vesícula Biliar	0,116±0,070	0,029±0,008	0,020±0,003	0,021±0,002
Tecido Adiposo	0,003±0,002	0,004±0,002	0,006±0,005	0,001±0,000
Músculo	0,025±0,024	0,017±0,018	0,006±0,005‡	0,008±0,007
Pele	0,006±0,001	0,004±0,001	0,002±0,001	0,003±0,001
Arco Aórtico	0,029±0,026	0,023±0,020	0,015±0,005†	0,032±0,011
Aorta Torácica	0,046±0,036	0,032±0,042	0,009±0,003‡	0,013±0,009
Aorta Abdominal	0,033±0,021	0,062±0,068	0,009±0,004‡	0,013±0,011§

Abreviaturas:  $^3\text{H}$  – CL:  $^3\text{H}$  – colesterol livre;  $^{14}\text{C}$  – CE:  $^{14}\text{C}$  - colesterol esterificado. Resultados expressos em % de radioatividade injetada por grama de tecido, média ± DP.

\* p<0,05, comparado ao  $^{14}\text{C}$ -CE no grupo controle; † p<0,05, comparado ao  $^{14}\text{C}$ -CE no grupo submetido à indução de aterosclerose; ‡ p<0,05, comparado ao  $^3\text{H}$ -CL do grupo controle; § p<0,05, comparado ao  $^{14}\text{C}$ -CE do grupo controle, teste de Mann-Whitney.

A tabela 4 mostra o estudo de correlação entre TFR e % de captação dos lípidos marcados radioativamente da LDE. Verificou-se que a captação de  $^3\text{H}$ -CL e de  $^{14}\text{C}$ -CE pelas adrenais se correlacionou com as suas respectivas TFR. Entretanto, ao se avaliar a captação pelo músculo, pele e vesícula biliar, somente a TFR do  $^{14}\text{C}$ -CE apresentou correlação.

Tabela 4. Correlação entre percentagem de captação tecidual e taxa fracional de remoção do  $^3\text{H}$ -colesterol livre e do  $^{14}\text{C}$ -colesterol esterificado\*.

% captação tecidual	TFR			
	$^3\text{H}$ -CL		$^{14}\text{C}$ -CE	
	r	p	r	p
Adrenais	0,82	0,034	0,93	0,007
Músculo	0,24	ns	0,86	0,024
Pele	0,43	ns	0,79	0,049
Vesícula Biliar	0,18	ns	0,86	0,024

Abreviaturas: TFR: taxa fracional de remoção;  $^3\text{H}$ -CL:  $^3\text{H}$ -colesterol livre;  $^{14}\text{C}$ -CE:  $^{14}\text{C}$ -colesterol esterificado; ns - não significativo.\*Teste de correlação linear de Spearman.

A tabela 5 mostra os resultados da comparação múltipla de Dunns entre os dados de captação de  $^3\text{H}$  - CL e  $^{14}\text{C}$  - CE em ambos os grupos.

A análise de variância mostrou diferenças na % de captação de  $^3\text{H}$  - CL e  $^{14}\text{C}$  - CE entre órgãos e fragmentos arteriais no grupo controle e no grupo submetido à indução de aterosclerose ( $p < 0,01$ ).

Em geral, no grupo controle, o fígado e as adrenais apresentaram maior captação de  $^3\text{H}$  - CL e  $^{14}\text{C}$  - CE em relação aos outros órgãos. O baço e o pulmão apresentaram comportamento semelhante entre si, ou seja, captaram mais  $^3\text{H}$  - CL em relação aos outros órgãos. O mesmo perfil não foi observado para o  $^{14}\text{C}$  - CE.

Nos animais submetidos à indução de aterosclerose, o fígado foi o principal órgão captador de  $^3\text{H}$  - CL, porém não de  $^{14}\text{C}$  - CE.

Tabela 5. Teste de comparação múltipla de Dunns, após teste de Kruskal-Wallis, entre as médias de captação de  $^3\text{H}$ -colesterol livre e  $^{14}\text{C}$ -colesterol esterificado nos órgãos e segmentos arteriais do grupo controle e do grupo submetido à indução de aterosclerose.

	Grupo controle (n=17)		Grupo submetido à indução de aterosclerose (n=13)	
	$^3\text{H}$ – CL	$^{14}\text{C}$ – CE	$^3\text{H}$ – CL	$^{14}\text{C}$ – CE
Fígado vs. Músculo	*	*	***	ns
Fígado vs. Pâncreas	**	**	**	ns
Fígado vs. Gônadas	ns	ns	**	ns
Fígado vs. Tecido adiposo	*	*	ns	ns
Fígado vs. Pele	*	**	**	ns
Baço vs. Músculo	**	ns	ns	ns
Baço vs. Pâncreas	***	ns	ns	ns
Baço vs. Gônadas	*	ns	ns	ns
Baço vs. Tecido adiposo	**	ns	ns	ns
Baço vs. Pele	**	ns	ns	ns
Baço vs. Arco aórtico	*	ns	ns	ns
Pulmão vs. Músculo	*	ns	ns	ns
Pulmão vs. Pâncreas	**	ns	ns	ns
Pulmão vs. Tecido adiposo	*	ns	ns	ns
Pulmão vs. Pele	*	ns	ns	ns
Adrenais vs. Músculo	**	ns	ns	ns
Adrenais vs. Pâncreas	***	**	ns	ns
Adrenais vs. Gônadas	*	ns	ns	ns
Adrenais vs. Tecido adiposo	**	*	ns	ns
Adrenais vs. Pele	**	*	ns	ns
Adrenais vs. Arco aórtico	*	ns	ns	ns

Abreviaturas:  $^3\text{H}$  – CL:  $^3\text{H}$  – colesterol livre;  $^{14}\text{C}$  – CE:  $^{14}\text{C}$  - colesterol esterificado; ns – não significativo.

\* p< 0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; Teste de comparação múltipla de Dunns, após teste de Kruskal-Wallis.

### 5.1.5. Lesão aterosclerótica

A figura 4 mostra a fotomicrografia do arco aórtico, aorta abdominal e aorta torácica de coelhos normais e de coelhos submetidos à indução de aterosclerose. Nota-se que coelhos que receberam a dieta rica em colesterol apresentaram aumento na espessura da íntima e formação de lesão aterosclerótica.

A tabela 6 mostra a morfometria microscópica dos 3 segmentos arteriais de coelhos submetidos à indução de aterosclerose determinada pela análise histológica seguida de planimetria. Não foi observado diferenças na % de lesão aterosclerótica entre os 3 segmentos arteriais analisados ( $p=0,66$ ). A análise de variância mostrou diferenças entre o arco aórtico e a aorta abdominal nas áreas da íntima-média, média e lesão aterosclerótica ( $p<0,05$ ).

Observou-se correlação linear positiva entre o consumo de ração rica em colesterol a 1% (g/dia) e a % de lesão aterosclerótica somente no arco aórtico ( $r=0,82$ ;  $p=0,01$ ). Já em relação à % de captação de  $^3\text{H}$  - CL e de  $^{14}\text{C}$  - CE e % da lesão aterosclerótica, não se observou correlação linear em nenhum dos segmentos arteriais estudados (dados não mostrados).

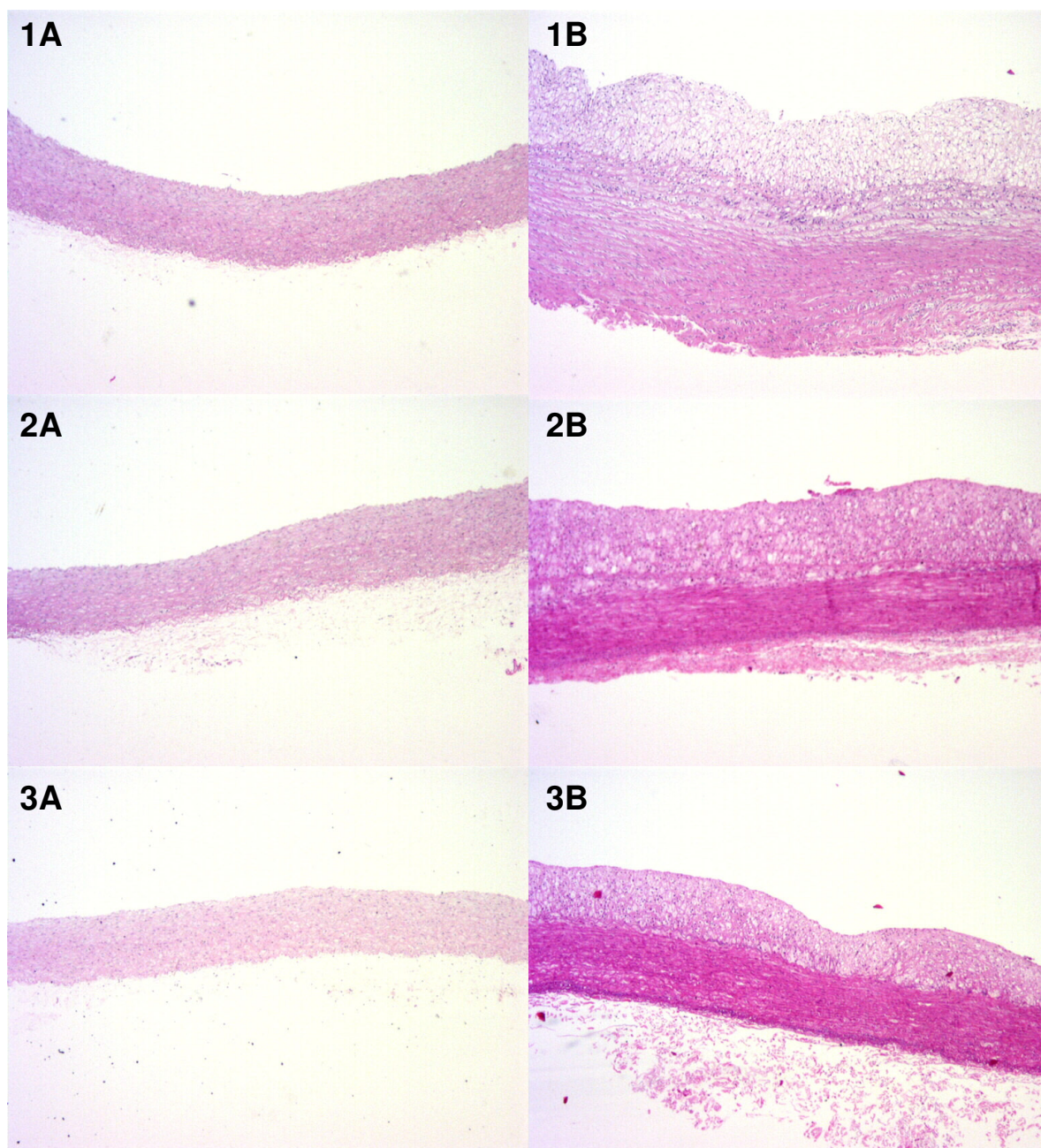


Figura 4. Fotomicrografia dos segmentos arteriais obtidos de coelhos normais (A) e de coelhos submetidos à indução de aterosclerose por dieta rica em colesterol a 1% durante 8 semanas (B): 1 – arco aórtico, 2 – aorta torácica e 3 – aorta abdominal (50X).

Tabela 6. Morfometria microscópica dos segmentos arteriais de coelhos submetidos à indução de aterosclerose após 8 semanas de consumo da dieta rica em colesterol a 1%.

	Arco aórtico (n=9)	Aorta torácica (n=9)	Aorta abdominal (n=9)
Área da íntima-média ( $\mu\text{m}^2$ )	2,36±1,09	2,45±2,57	1,14±0,60*
Área da média ( $\mu\text{m}^2$ )	1,72±0,81	1,65±1,64	0,86±0,36*
Área da lesão aterosclerótica- íntima ( $\mu\text{m}^2$ )	0,66±0,29	0,51±0,61	0,20±0,21*
% lesão aterosclerótica	26,20±5,81	23,13±20,62	17,06±15,73

\*p<0,05, comparado ao arco aórtico, teste de comparação múltipla de Dunns, após teste de Kruskal-Wallis.

## 5.2. Captação da LDE *in vitro* por RAEC

A tabela 7 mostra a influência da massa de LDE na captação de  $^3\text{H}$  - CL e  $^{14}\text{C}$  - CE por células endoteliais aórticas de coelhos. Nota-se que a captação de  $^3\text{H}$  - CL por RAEC foi maior que a de  $^{14}\text{C}$  - CE, independente da massa de LDE incubada (p<0,01).

Observa-se correlação positiva entre a massa de LDE incubada, na faixa estudada (0,075 a 2,4mg) e a captação de  $^{14}\text{C}$  - CE (r=1,0; p=0,003). Entretanto, este mesmo fenômeno não ocorreu em relação ao  $^3\text{H}$  - CL (r=0,77; p=0,10).



Tabela 7. Influência da massa de LDE na captação do  $^3\text{H}$  - colesterol livre e do  $^{14}\text{C}$  - colesterol esterificado por células endoteliais aórticas de coelhos.

LDE (mg)	Radioatividade (cpm/ $\mu\text{g}$ de proteína)	
	$^3\text{H}$ -CL (n=14)	$^{14}\text{C}$ -CE (n=14)
0,075	1134 $\pm$ 656*	197 $\pm$ 89
0,150	1581 $\pm$ 646*	276 $\pm$ 94
0,300	2779 $\pm$ 768*	523 $\pm$ 279
0,600	5644 $\pm$ 1815*	883 $\pm$ 581
1,200	5418 $\pm$ 2692*	907 $\pm$ 398
2,400	4949 $\pm$ 589*	1061 $\pm$ 176

Abreviaturas:  $^3\text{H}$  - CL:  $^3\text{H}$  - colesterol livre;  $^{14}\text{C}$  - CE:  $^{14}\text{C}$  - colesterol esterificado.

\*  $p < 0,01$ , comparado ao  $^{14}\text{C}$  - CE, teste de Mann-Whitney.

### 5.3. Captação da LDE em ratos após tratamento com diazepam

A figura 5 mostra a proporção de  $^3\text{H}$  - CL e  $^{14}\text{C}$  - CE em relação ao colesterol total marcado radioativamente que foi captado pelos tecidos no grupo controle e no grupo tratado com diazepam. No grupo controle, observou-se maior % de  $^3\text{H}$  - CL captado do que de  $^{14}\text{C}$  - CE no baço ( $p=0,02$ ).

No grupo tratado com diazepam, nota-se maior captação de  $^3\text{H}$  - CL do que de  $^{14}\text{C}$  - CE no plasma, baço, fígado e aorta ( $p < 0,01$ ). Nota-se ainda que a % de captação de  $^3\text{H}$  - CL foi maior na aorta do grupo tratado com diazepam comparado ao grupo controle, enquanto a de  $^{14}\text{C}$  - CE foi menor ( $p < 0,05$ ).

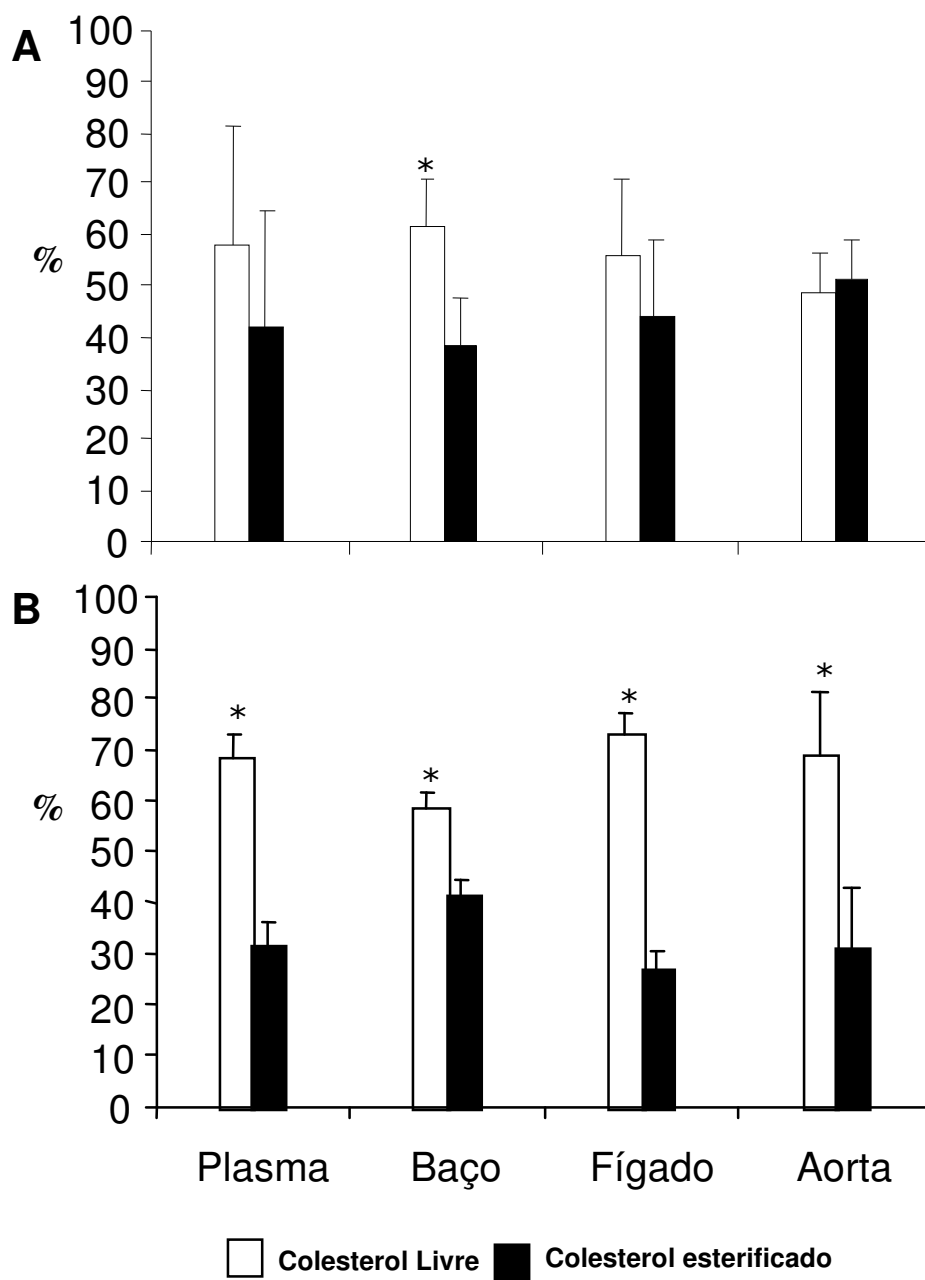


Figura 5. Percentagem de  $^3\text{H}$ -colesterol livre e de  $^{14}\text{C}$ -colesterol esterificado em relação a radioatividade total captada pelo baço, fígado e aorta de ratos 24 h após a injeção da LDE. A: grupo controle, tratado com salina (0,5mL/kg/dia) (n=9); B: grupo tratado com diazepam (0,5mg/kg/dia) (n=9). Resultados expressos em média  $\pm$  DP. \*  $p < 0,01$ ; comparado ao  $^{14}\text{C}$ -CE, teste de Mann-Whitney.

## **6. DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

Para elucidar os processos envolvidos na aterogênese e metabolismo lipídico, coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol ou semi-sintética composta de caseína têm sido utilizados como modelo experimental da aterosclerose. Estas dietas, conforme a percentagem de colesterol acrescido, elevam a concentração sérica de colesterol, predominantemente pela maior produção hepática de VLDL, provocando a formação de placas ateroscleróticas, que variam sua constituição desde pré-lesões formadas por células espumosas e estrias gordurosas até placas fibromusculares sujeitas à calcificação e eventos tromboembólicos (BOCAN et al., 1993; KOLODGIE et al., 1996).

A dieta rica em colesterol a 1% administrada por dois meses em coelhos tem como característica principal a formação de células espumosas e o depósito lipídico, com pequena migração e proliferação de células musculares na íntima arterial (BOCAN et al., 1993; FINKING; HANKE, 1997). No presente estudo, a dieta rica em colesterol a 1% administrada por 8 semanas foi suficiente para produzir hiperlipidemia e, conseqüentemente, formação de lesão aterosclerótica nos 3 segmentos arteriais analisados. A dieta não foi tóxica aos animais durante o período experimental uma vez que estes não apresentaram perda ponderal.

Estudos relatam que o arco aórtico é o segmento arterial que desenvolve espontânea e predominantemente lesões ateroscleróticas (FINKING; HANKE, 1997; MOGHADASIAN, 2002), entretanto, em nosso estudo, não observamos diferenças na percentagem de lesão aterosclerótica entre o arco aórtico, a aorta torácica e a aorta

abdominal avaliados microscopicamente. Por outro lado, a correlação positiva entre o consumo de ração rica em colesterol e a percentagem de lesão aterosclerótica somente no arco aórtico sugere maior susceptibilidade deste segmento à indução de aterosclerose.

Alguns estudos têm relacionado as diferenças entre as duas formas de colesterol, a livre e a esterificada, e suas implicações quanto ao depósito e/ou captação destes lípidos na parede arterial (REDGRAVE; WEST, 1972; STENDER et al., 1978; STENDER et al., 1979; STENDER, 1982; KRUTH, 1985; ARAGANE et al., 2001). O CE, localizado no núcleo da estrutura da partícula de lipoproteína, reflete a captação da lipoproteína e, portanto, foi utilizado como marcador da remoção da LDE pelos receptores de LDL das membranas celulares.

Em nosso estudo a cinética plasmática, tanto do CL quanto do CE da LDE, é mais lenta em coelhos que consumiram a dieta rica em colesterol. Nestes animais, a dieta induz a produção hepática de lipoproteínas anormais ricas em colesterol e com densidade semelhante às partículas de VLDL, as  $\beta$ -VLDL e, conseqüentemente, provoca alterações nas lipoproteínas plasmáticas que se elevam na circulação (GUDMUNDESEN et al., 1993). Somado a isto, os coelhos são animais naturalmente deficientes em LH e a hipercolesterolemia, induzida por dieta, promove a saturação da atividade da LH com prejuízo na remoção plasmática das lipoproteínas (CHANG; BORENSZTAJN, 1993). Estes estudos sugerem que os nossos resultados sejam decorrentes tanto da competição da LDE com as lipoproteínas naturais, que estão aumentadas neste grupo, quanto de prejuízos na sua remoção plasmática. No entanto, a correlação negativa entre as concentrações séricas de CT e TG e a TFR da LDE encontrada no grupo submetido à indução de

aterosclerose, reforça a hipótese de que a remoção lenta da LDE seja resultado da competição entre a LDE e as lipoproteínas naturais.

Meijer et al. (1993) demonstraram que coelhos com hipercolesterolemia moderada ou severa induzida por dieta rica em colesterol tendem a aumentar a 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 e ser captado pelos hepatócitos (O'BRIEN et al., 2003). Já o CE, por sua característica hidrofóbica, necessita obrigatoriamente de proteínas de transferência especializadas para se deslocar entre as lipoproteínas (GARRET; GRISHAM, 1995). No presente estudo, encontramos maior TFR e captação hepática do CL quando comparado ao CE no grupo submetido à indução de aterosclerose. Isso sugere que o CL da LDE está se dissociando da partícula e se deslocando para outras lipoproteínas. Enquanto o CE, localizado somente na LDE, e o CL localizado nas lipoproteínas naturais e na LDE, são captados pelos receptores de LDL, parte do CL pode se dissociar e também ser captado por difusão passiva pelas células hepáticas.

Neste estudo verificamos que a captação hepática da LDE diminuiu após o consumo da dieta rica em colesterol. 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. Em coelhos, a dieta rica em colesterol promove uma diminuição em torno de 50% da capacidade das partículas de  $\beta$ -VLDL se ligarem aos receptores de LDL da membrana dos hepatócitos (LOOSE-MITCHELL et al., 1991), e por conseguinte, menor captação do colesterol dessas lipoproteínas pelo fígado (CHANG; BORENSZTAJN, 1993). Com isso a diminuição da expressão hepática dos

receptores de LDL e/ou sua saturação, somado a competição da LDE com as lipoproteínas naturais e saturação da atividade da LH, poderiam explicar a menor TFR e captação de CL e CE que observamos nos animais submetidos à indução de aterosclerose.

No presente estudo, a captação de CE da LDE pelo arco aórtico foi maior do que a de CL no grupo submetido à indução de aterosclerose. Em coelhos, também foi observado acúmulo de CE em áreas com lesões ateroscleróticas, mesmo quando induzidas mecanicamente (BONDJERS; BJÖRKERUD, 1973). Ao contrário, alguns estudos relatam maior concentração de CL do que de CE em aorta de coelhos submetidos à indução de aterosclerose (STENDER et al., 1978; KRUTH, 1985). No entanto, este excesso de CL presente na aorta pode ser explicado pelo aumento da hidrólise de CE que foi captado como parte da lipoproteína (STENDER et al., 1979; STENDER, 1982).

Como citado anteriormente, em coelhos, o arco aórtico é o segmento arterial que desenvolve inicial e predominantemente lesões ateroscleróticas. No grupo submetido à indução de aterosclerose, verificamos que a captação tanto de CL quanto de CE é maior pelo arco aórtico do que pelas aortas torácica e abdominal. Esses mesmos resultados foram observados por Aragane et al. (2001).

As lipoproteínas, como LDL, LDL pequenas e densas e remanescentes de VLDL, quando elevadas na circulação podem provocar lesões no endotélio vascular que facilitam a penetração dessas partículas na íntima arterial. No espaço endotelial, as lipoproteínas podem sofrer oxidação por radicais livres e daí serem fagocitadas pelos macrófagos (CHOY et al., 2004; ZIPES et al., 2005). Em coelhos, no estágio inicial da aterogênese induzida por dieta rica em colesterol, as células endoteliais já expressam em sua superfície moléculas de adesão, como a P-selectina e a VCAM-

1, responsáveis pelo recrutamento de monócitos e linfócitos T (SAKAI et al., 1997; LI et al., 1993). Os monócitos migram para os sítios de lesão endotelial, penetram na íntima e se diferenciam em macrófagos. Estes fagocitam as lipoproteínas modificadas pelos receptores “scavenger” e formam as células espumosas (CHOY et al., 2004). Em lesões ateroscleróticas de coelhos, há aumento na expressão dos receptores “scavenger”, assim como dos receptores de VLDL, enquanto os receptores de LDL, regulados pelo colesterol intracelular disponível, têm sua expressão diminuída (HILTUNEN et al., 1998<sub>B</sub>). Em nosso estudo, como citado anteriormente, a captação da LDE pelo fígado diminuiu com a administração da dieta rica em colesterol provavelmente pela redução na expressão de receptores B/E. Contudo, não encontramos diferenças na captação da LDE pelo arco aórtico quando comparamos o grupo controle com o grupo submetido à indução de aterosclerose. Neste caso podemos sugerir que a cinética plasmática da LDE mais lenta no grupo submetido à indução de aterosclerose aumenta a susceptibilidade da LDE a sofrer modificações, o que facilitaria a captação da LDE pelos receptores “scavenger”.

Assim como o fígado, no grupo controle, as adrenais apresentaram maior captação de CL e CE em relação a maioria dos órgãos analisados. Preferencialmente, o colesterol esterificado da HDL é captado pelas células através de um receptor específico, o SR-BI, localizados em diversos tecidos, principalmente, os esteroideogênicos, como gônadas e adrenais (AZHAR et al., 2003; CONNELLY; WILLIAMS, 2003). Estes órgãos utilizam o colesterol como substrato para síntese de hormônios esteróides e, portanto, precisam captar, de modo contínuo, o colesterol. Este fato pode explicar a correlação positiva encontrada entre a TFR da LDE e sua captação pelas adrenais.



Outro órgão importante na captação do colesterol foi o pulmão. Neste órgão os lípides provenientes das lipoproteínas são utilizados para produção da substância surfactante, que tem como função revestir o alvéolo e manter a função pulmonar normal (POELMA et al., 2003). No grupo controle, a captação pulmonar de CL foi maior quando comparado ao CE, provavelmente pelo CL ser fonte para formação de ésteres de colesterol na síntese da substância surfactante (GUTHMANN et al., 1997).

No estudo “in vitro” da captação da LDE por células endoteliais aórticas de coelhos, observamos que quanto maior a massa de LDE incubada maior a captação de CE pelas células, indicando que as partículas de LDE sejam removidas pelos receptores de LDL presentes nestas células. Entretanto, este mesmo fenômeno não foi observado em relação a captação do CL da LDE pelas células. Contudo, quando comparamos a captação das duas formas de colesterol por estas células, verificamos que a captação de CL foi maior do que a de CE independente da massa de LDE incubada. Isso indica que o CL é captado pelos mesmos receptores que captaram o CE e, além disso, esteja se dissociando da LDE e se depositado nestas células por uma via independente, que pode ser por difusão passiva e/ou por interação entre a LDE e as membranas celulares.

No estudo realizado em ratos, não verificamos diferenças entre a captação das duas formas de colesterol da LDE pela aorta no grupo controle. Entretanto, quando os ratos foram tratados com diazepam, houve maior captação arterial de CL do que de CE da LDE. Em diferentes espécies animais, o diazepam foi capaz de inibir a atividade da LCAT (WONG et al., 1992), e a atividade da ACAT, “in vitro” (BELL, 1984). Aragane et al. (2001) observaram que o tratamento com F-1394, outro inibidor da ACAT, levou a diminuição da concentração de CE no arco aórtico de

coelhos submetidos à indução de aterosclerose. Em macrófagos peritoneais de camundongos, a incubação do inibidor de ACAT, U18666A, provocou o acúmulo de CL e a formação de cristais de colesterol (KELLNER-WEIBEL et al., 1998). Dessa forma, talvez a diferença na captação entre o CL e CE no grupo tratado com diazepam seja efeito da diminuição da atividade da LCAT e ACAT. Como consequência da diminuição da esterificação do colesterol, o colesterol se encontra em sua forma mais instável, a livre, que pode se dissociar facilmente das lipoproteínas e se depositar na parede arterial.

Em estudos anteriores em nosso laboratório, foi observado que pacientes portadores de DAC apresentam distúrbio no metabolismo do CL e CE da LDE, nos quais o CL foi removido mais rapidamente da circulação sanguínea (SANTOS et al., 2003; COUTO et al.; 2007). Esses resultados somados aos achados do presente estudo sugerem que o aumento nas concentrações de lipoproteínas aterogênicas, como a LDL, ou distúrbios no processo de estabilização do colesterol, favorecem a dissociação entre o CL e o CE dessas partículas, e podem elevar o risco de desenvolvimento da aterosclerose, assim como agravar o processo de aterogênese.

## **7. CONCLUSÕES**

## 7. CONCLUSÕES

- Em coelhos, a hiperlipidemia e a aterosclerose promoveram alteração no metabolismo do colesterol da LDE. A remoção mais lenta da LDE pode tornar as partículas mais susceptíveis a modificações, assim como, facilitar a dissociação do CL da partícula.

- Em estudo “in vitro” com células endoteliais aórticas de coelhos, o CL também apresentou comportamento diferente do CE da LDE, sendo mais facilmente captado por estas células.

- A inibição da esterificação do colesterol, mediada pela inibição da LCAT e ACAT pelo tratamento com diazepam, acarretou no aumento da captação de CL pelos tecidos.

A hiperlipidemia ou distúrbios no processo de estabilização do colesterol, pode favorecer a dissociação entre o CL e o CE dessas partículas, e elevar o risco de desenvolvimento da aterosclerose, assim como agravar o processo de aterogênese.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, J.; PASTERNAK, R.C. Changing the natural history of coronary artery disease. **Cardiol. Clin.**, v.14, p.1-17, 1996.

ACCAD, M.; SMITH, S. J.; NEWLAND, D. L.; SANAN, D. A.; KING JUNIOR, L. E.; LINTON, M. F.; FAZIO, S; FARESE JUNIOR, R. V. Massive xanthomatosis and altered composition of atherosclerotic lesions in hyperlipidemic mice lacking acyl CoA: cholesterol acyltransferase 1. **J. Clin. Invest.**, v.105, p.711-719, 2000.

ARAGANE, K.; KOJIMA, K.; FUJINAMI, K.; KAMEI, J.; KUSUNOKI, J. Effect of F-1394, an acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor, on atherosclerosis induced by high cholesterol diet in rabbits. **Atherosclerosis**, v.158, p.139-145, 2001

AZHAR, S.; LEERS-SUCHEA, S.; REAVEN, E. Cholesterol uptake in adrenal and gonadal tissues: the SR-BI and 'selective' pathway connection. **Front Biosci.**, v.8, p.S998-S1029, 2003.

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.

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

BELL, F. P. Diazepam inhibits cholesterol esterification by arterial ACAT and plasma LCAT, in vitro. **Atherosclerosis**, v.50, p.345-352, 1984.

BELL, F. P. Inhibition of acyl CoA:cholesterol acyltransferase and sterologenesi in rat liver by diazepam, in vitro. **Lipids**, v.20, p.75-79, 1985.

BERLINER, J. A.; TERRITO, M. C.; SEVANIAN, A.; RAMIN, S.; KIM, J. A.; BAMSHAD, B.; ESTERSON, M.; FOGELMAN, A. M. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. **J. Clin. Invest.**, v. 85, p.1260-1266, 1990.

BIGGERSTAFF, K. D.; WOOTEN, J. S. Understanding lipoproteins as transporters of cholesterol and other lipids. **Adv. Physiol. Educ.**, v.28, p.105-106, 2004.

BOCAN, T. M.; MUELLER, S. B.; UHLENDORF, P. D.; NEWTON, R. S.; KRAUSE, B. R. Comparison of CI-976, an ACAT inhibitor, and selected lipid-lowering agents for antiatherosclerotic activity in iliac-femoral and thoracic aortic lesions: a biochemical, morphological, and morphometric evaluation. **Arterioscler. Thromb.**, v.11, p.1830-1843, 1991.

BOCAN, T. M.; MUELLER, S. B.; MAZUR, M. J.; UHLENDORF, P. D.; BROWN, E. Q.; KIEFT, K. A. The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation. **Atherosclerosis**, v.102, p.9-22, 1993.

BONDERS, G.; BJÖRKERUD, S. Cholesterol accumulation and content in regions with defined endothelial integrity in the normal rabbit aorta. **Atherosclerosis**, v.17, p.71-83, 1973.

BONDERS, G.; BJÖRKERUD, S. Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury. **Atherosclerosis**, v.17, p.84-94, 1973.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.

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

BURNSTEIN, 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.

CAVELIER, C.; LORENZI, I.; ROHRER, L.; ECKARDSTEIN A. V. Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. **Biochim. Biophys Acta**, v.1761, p.655-666, 2006.

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.

CHANG, C.; DONG, R.; MIYAZAKI, A.; SAKASHITA, N.; SHANG, Y.; LIU, J.; GUO, M.; LI, B. L.; CHANG, T. Y. Human acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) and its potential as a target for pharmaceutical intervention against atherosclerosis. **Acta Biochim. Biophys. Sinica**, v.38, p.151-156, 2006.

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

CONNELY, M. A.; WILLIAMS, D. L. SR-BI and cholesterol uptake into steroidogenic cells. **Trends Endocrinol Metab.**, v.14, p.467-472, 2003.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins**: patologia estrutural e funcional. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan S. A., p. 445-456, 2000.

COUTO, R. D.; DALAN, L. A. O.; LISBOA, L. A. F.; MESQUITA, C. H.; VINAGRE, C. G. C.; 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, p.411-418, 2007.

CUPARENCO, B.; HORÁK, J.; CUCUIANU, M.; HÂNCU, N.; NEGREA, S.; SEUSAN, E.; VINCZE, J. Effects of some benzodiazepine derivatives on fibrinolysis and serum lipids in normolipidaemic rats and in humans. **Atherosclerosis**, v.31, p.435-441, 1978.

DEVLIN, T.M. **Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations**. 5 ed. New York: Wiley-Liss Publication, 2002.

DOBIÁSOVÁ, M.; FROHLICH, J. Understanding the mechanism of LCAT reaction may help to explain high predictive value of LDL/HDL cholesterol ratio. **Physiol. Res.**, v.47, p.387-397, 1998.

DURRINGTON, P. HDL in risk prediction and its direct and indirect involvement in atherogenesis. **Atherosclerosis**, v.3, p.3S-12S, 2002.

EATON, C. B. Traditional and emerging risk factors for cardiovascular disease. **Prim. Care**, v. 32, p.963-976i, 2005.



ERICKSSON, S.; ERICKSSON, M.; VITOLS, S.; EINARSSON, K.; BERGLUND, L.; ANGELIN, B. Influence of age on the metabolism of plasma low density lipoproteins in healthy males. **J. Clin. Invest.**, v.82, p.591-596, 1991.

FAZIO, S.; MAJOR, A. S.; SWIFT, L. L.; GLEAVES, L. A.; ACCAD, M.; LINTON, M. F.; FARESE JUNIOR, R. V. Increased atherosclerosis in LDL receptor-null mice lacking ACAT1 in macrophages. **J. Clin. Invest.**, v.107, p.163-171, 2001.

FIELDING, C. J.; FIELDING, P. E. Intracellular cholesterol transport. **J. Lipid Res.**, v.38, p.1503-1521, 1997.

FINKING, G.; HANKE, H. Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. **Atherosclerosis**, v.135, p.1-7, 1997.

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

FROHLICH, J.; MCLEOD, R. Lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.201, p.181-194, 1986.

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

GJONE, E. Familial lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency. **Birth Defects Orig. Artic. Ser.**, v.18, p.423-31, 1983.

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

GLASS, C. K; WITZTUM, J. L. Atherosclerosis: The road ahead. **Cell.**, v.104, p.503-516, 2001.

GOLDMAN, L.; BRAUNWALD, E. **Cardiologia na clínica geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 425-447, 2000.

GORENSTEIN, C.; POMPÉIA, S. Farmacocinética e farmacodinâmica dos BDZs in: BERNIK, Márcio Antonini (coord). **Benzodiazepínicos: Quatro décadas de experiência**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1999.

GUDMUNDSEN, O.; BERG, T.; ROOS, N.; NENSETER, M. S. Hepatic uptake of  $\beta$ -VLDL in cholesterol-fed rabbits. **J. Lipid Res.**, v.34, p.589-600, 1993.

GUTHMANN, F.; HARRACH-RUPRECHT, B.; LOOMAN, A. C.; STEVENS, P. A.; ROBENEK, H.; RUSTOW, B. Interaction of lipoproteins with type II pneumocytes in vitro: morphological studies, uptake kinetics and secretion rate of cholesterol. **Eur J Cell Biol.**, v.74, p.197-207, 1997.

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

HILTUNEN, T. P.; LUOMA, J. S.; NIKKARI, T. ; YLÄ-HERTTUALA, S. .Expression of LDL receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein, and scavenger receptor in rabbit atherosclerotic lesions: Marked Induction of scavenger receptor and VLDL receptor expression during lesion development. **Circulation**, v.97, p.1079-1086, 1998b.

HIRATA, R. D. C.; 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.1437, p.53-62, 1999.

HO, Y. K.; SMITH, R. G.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. **Blood**, v.52, p.1099-1114, 1978.

HOMMA, Y. Predictors of atherosclerosis. **J. Atheroscler Thromb.**, v.11, p.265-270, 2004.

HUNNINGHAKE, D.; WALLACE, R. B.; REILAND, S.; BARRETT-CONNOR, E.; WAHL, P; HOOVER, J.; HEISS, G. Alterations of plasma lipid and lipoprotein levels associated with benzodiazepine use--the LRC Program Prevalence Study. **Atherosclerosis**, v.40, p.159-165, 1981.

HUSSAIN, M. M. A proposed model for the assembly of chylomicrons. **Atherosclerosis**, v.148, p1-15, 2000.

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, 1994.

IKONEN, E. Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. **Physiol. Rev.**, v.86, p.1237-1261, 2006.

KATAOKA, H.; KUME, N.; MIYAMOTO, S.; MINAMI, M.; MORIWAKI, H.; MURASE, T.; SAWAMURA, T.; MASAKI, T.; HASHIMOTO, N.; KITA, T.; Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. **Circulation**, v.99, p.3110-3117, 1999.

KELLNER-WEIBEL, G.; JEROME, W. G.; SMALL, D. M.; WARNER, G. J.; STOLTENBORG, J. K.; KEARNEY, M. A.; CORJAY, M. H.; PHILLIPS, M. C.; ROTHBLAT, G. H. Effects of intracellular free cholesterol accumulation on macrophage viability: a model for foam cell death. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.18, p.423-31, 1998.

KOLODGIE, F. D.; KATOCS, A. S, Jr.; LARGIS, E.E.; WRENN, S. M.; CORNHILL, J. F.; HERDERICK, E. E.; LEE, S. J.; VIRMANI, R. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol. Methodological considerations regarding individual variability in response to dietary cholesterol and development of lesion type. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.16, p.1454-64, 1996.

KRUTH, H. S. Subendothelial accumulation of unesterified cholesterol: an early event in atherosclerotic lesion development. **Atherosclerosis**, v.57, p.337-341, 1985.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran: pathologic basis of disease**. 6 ed. Philadelphia: Saunders, 2005.

KUSUNOKI, J.; HANSOTY, D. K.; ARAGANE, K.; FALLON, J. T.; BADIMON, J. J.; FISHER, E. A. Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibition reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation**, v.103; p.2604-2609, 2001.

LI, H; CYBULSKY, M. I.; GIMBRONE JUNIOR, M. A.; LIBBY, P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. **Arterioscler Thromb.**, v.13, p.197-204, 1993.

LIBBY, P.; THEROUX, P. Pathophysiology of coronary artery disease. **Circulation**, v.111, p.3481-3488, 2005.

LOOSE-MITCHELL, D. S.; POORMAN, J. A.; SMITH, S. A.; OVERTURF, M. L.; MORRISETT, J. D.; GOTTO, A. M.; SOMA, M. R. Cholesterol metabolism in hypercholesterolemia-resistant rabbits. **Atherosclerosis**, v.87, p.169-81, 1991.

MÄNTTÄRI, M.; MÄLKÖNEN, M.; MANNINEN, V. Effect of diazepam on endothelial permeability, plasma lipids and lipoproteins in cholesterol fed rabbits. **Acta Med. Scand.**, v.660, p.109S-113S, 1982.

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

MARANHÃO, R. C.; FERES, M. C.; MARTINS, M. T.; MESQUITA, C. H., TOFFOLETTO, O.; VINAGRE, C. G. C.; GIANINNI, S. D.; PILEGGI, F. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to LDL receptors. **Lipids**, v.32, p.627-633, 1997.

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

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.

MATTHEWS, C. M. E. The theory of tracer experiments with <sup>131</sup>I-labelled plasma proteins. **Phys Med Biol.**, v. 2, p.36-42, 1957.

MAXFIELD, F. R.; MENON, A. K. Intracellular sterol transport and distribution. **Current Opinion in Cell Biology**, v.18, p.379-385, 2006.

MEIJER, G. W.; DEMACKER, P. N.; VAN TOL, A.; GROENER, J. E.; VAN DER PALEN, J. G.; STALENHOEF, A. F.; VAN ZUTOHEN, L M.; BEYNEN, A. C. Plasma activities of lecithin:cholesterol acyltransferase, lipid transfer proteins and post-heparin lipases in Inbred strains of rabbits hypo- or hyper-responsive to dietary cholesterol. **Biochem. J.**, v.293, p.729-734, 1993.

MENDEZ, A. J. Cholesterol efflux mediated by apolipoproteins is an active cellular process distinct from efflux mediated by passive diffusion. **J. Lipid Res.**, v.38, p.1807-1821, 1997.

MESQUITA, C. H. **Análise compartimental auxiliar**. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), [Publicações IPEN]; 1994.

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.

MOGHADASIAN, M. H. Experimental atherosclerosis: a historical overview. **Life Sciences**, v.70, p.855-865, 2002.

MORENO, A.; CARTAGENA, A.; GUILERMO, M. Apolipoproteína E y enfermedad cardiovascular / Apolipoprotein E and cardiovascular disease. **Rev. Fac. Med.**, Bogotá, v.54, p.53-65, 2006.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper: Bioquímica**. 9 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2002.

NOLL, G. Pathogenesis of atherosclerosis: a possible relation to infection. **Atherosclerosis**, v.140, p.3S-9S, 1998.

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.

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.22, p.270-274, 2003.

ORAM, J. F.; YOKOYAMA, S. Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. **Lipid Res.**, v.37, p.2473-2491, 1996.

PATEL, D. J.; WONG, H.Y.; NEWMAN, H. A.; NIGHTINGALE, T. E.; FRASINEL, C.; JOHNSON, F. B.; PATEL, S.; COLEMAN, B. Effect of valium (diazepam) on experimental atherosclerosis in roosters. **Artery**, v.10, p.237-249, 1982.

PINTO, L. B.; WAJNGARTEN, M.; SILVA, E. L.; VINAGRE, C. C.; MARANHÃO, R. C. Plasma kinetics of a cholesterol-rich emulsion in young, middle-aged, and elderly subjects. **Lipids**, v.36, p.1307-1311, 2001.

PLUTZKY, J. The vascular biology of atherosclerosis. **Am. J. Med.**, v.115, p.55S-61S, 2003.

POELMA, D. L.; JU, M. R.; BAKKER, S. C.; ZIMMERMANN, L. J.; LACHMANN, B. F.; VAN IWAARDEN, J. F. A common pathway for the uptake of surfactant lipids by alveolar cells. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v.30, p.751-758, 2004.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RHAINDS, D.; BRISSETTE, L. The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. Defining the rules for lipid traders. **Int. J. Biochem. and Cell Biol.**, v.36, p. 39-77, 2004.

RICCIARELLI, R., ZINGG, J-M., AZZI, A. Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD 36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells. **Circulation**, v.102, p.82-87, 2000.

RIDKER, P.M.; GENEST, J.; LIBBY, P. Risk factors of atherosclerotic disease. *In* **Heart Disease**: a textbook of cardiovascular medicine. E. Braunwald, D. P. Zipes, P. Libby, editors. Philadelphia: WB Saunders Company, p.1010-1039, 2001.

REDGRAVE, T. G.; WEST, C. E. The relationship between esterified and free cholesterol content in experimental rabbit atheroma. **Atherosclerosis**, v.6, p.135-137, 1972.

ROSS, R. Pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature**, v.362, p.801-809, 1993.

SAKAI, A.; KUME, N.; NISHI, E.; TANOUE, K.; MIYASAKA, M.; KITA, T. P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 are focally expressed in aortas of hypercholesterolemic rabbits before intimal accumulation of macrophages and T lymphocytes. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.17, p.310-316, 1997.

SANTOS, R. D.; HUEB, W.; OLIVEIRA, A. A.; RAMIRES, J. A.; MARANHÃO R. C. Plasma kinetics of a cholesterol-rich emulsion in subjects with or without coronary artery disease. **J. Lipid. Res.**, v.44, p.464-469, 2003.

SCHROEDER, F.; GALLEGOS, A. M.; ATSHAVES, B. P.; STOREY, S. M.; McINTOSH, A. L.; PETRESCU, A. D.; HUANG, H.; STARODUB, O.; CHAO, H.; YANG, H.; FROLOV, A.; KIER, A. B. Recent advances in membrane microdomains: rafts, caveolae, and intracellular cholesterol trafficking. **Exp. Biol. Med.**, v.226, p.873-890, 2001.

SIMONS, K.; IKONEN, E. How cells handle cholesterol. **Science**, v.110, p.2155-2164, 2000.

SOCCIO, R. E.; BRESLOW, J. L. Intracellular cholesterol transport. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.24, p.1150-1160, 2004.

SOLAJIC-BOZICEVIC, N.; STAVLJENIC-RUKAVINA, A.; SESTO, M. Lecithin:cholesterol acyltransferase activity in patients with acute myocardial infarction and coronary heart disease. **Artery**, v.18, p.326-340, 1991.

STENDER, S. Arterial entrance and metabolism of free and esterified plasma cholesterol measured in vivo in experimental animals by a dual isotope method. **Atherosclerosis**, v.32, p.129-130, 1979.

STENDER, S. The in vivo transfers of free and esterified cholesterol from plasma into the arterial wall of hypercholesterolemic rabbits. **Scand. J. clin. Lab. Invest.**, v.42, p.43-52, 1982.

STENDER, S.; CHRISTENSEN, S.; NYVAD, O. Uptake of labeled free and esterified cholesterol from plasma by the aortic intima-media tissue measured in vivo in three animal species. **Atherosclerosis**, v.31, p.279-293, 1978.

STOCKER, R.; KEANEY JUNIOR, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol. Rev.**, v.84, p.1381-1478, 2004.

TAILLEUX, A.; DURIEZ, P.; FRUCHART, J. C.; CLAVEY, V. Apolipoprotein A-II, HDL-metabolism and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v.164, p.1-13, 2002.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 2 ed. New York: Wiley, 2005.

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

WARNER, G. J.; STOUT, G.; BAMBERGER, M.; JOHNSON, W. J.; ROTHBLAT, G. H. Cell toxicity induced by inhibition of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase and accumulation of unesterified cholesterol. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.5772-5778, 1995.

WONG, H. Y.; LOO, G.; SHERIEF, H. T.; ZHUANG, H. Z. Effects of diazepam (Valium) on aortic atherogenesis and plasma lecithin:cholesterol acyltransferase activity in cockerels fed an atherogenic diet. **Artery**, v.19, p.39-46, 1992.

WONG, H. Y.; NIGHTINGALE, T. E.; PATEL, D. J.; RICHARDI, J. C.; JOHNSON, F. B., ORIMILIKWE, S. O., DAVID, S. N. Long-term effects of diazepam on plasma lipids and atheroma in roosters fed in atherogenic diet. **Artery**, v.7, p.496-508, 1980.

WU, H.; MOULTOW, K. S.; GLASS, C. K. Macrophage scavenger receptors and atherosclerosis. **Trends Cardiovasc. Med.**, v.2, p. 220-225, 1992.

YAGYU, H.; KITAMINE, T.; OSUGA, J.; TOZAWA, R.; CHEN, Z.; KAJI, Y.; OKA, T.; PERREY, S.; TAMURA, Y.; OHASHI, K.; OKAZAKI, H.; YAHAGI, N.; SHIONOIRI, F.; IIZUKA, Y.; HARADA, K.; SHIMANO, H.; YAMASHITA, H.; GOTODA, T. YAMADA, N.; ISHIBASHI, S. Absence of ACAT-1 atherosclerosis but causes dry eye and cutaneous xanthomatosis in mice with congenital hyperlipidemia. **J. Biol. Chem.**, v.275, p. 21324-21330, 2000.

YANCEY, P. G.; BORTNICK, A. E.; KELLNER-WEIBEL, G.; de la LLERA-MOYA, M.; PHILLIPS, M. C.; ROTHBLAT, G. H. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.23, p.712-719, 2003.

YLÄ-HERTTUALA, S.; PALINSKI, W.; ROSENFELD, M. E.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T.E.; BUTLER, S.; WITZTUM, J. L.; STEINBERG, D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. **J. Clin. Invest.**, v.84, p.1086-1095, 1989.



YLÄ-HERTTUALA, S.; LUOMA, J.; KALLIONPPAA, H.; LAUKKANEN, M.; LEHTOLAINEN, P.; VIITA, H. Pathogenesis of atherosclerosis. **Maturitas**, v.23, p.47-49, 1996.

YOKOYAMA, S. Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. **Biochim. Biophys Acta**, v.1592, p. 231-244, 2000.

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