

SIMONE ALVES DANTAS

Avaliação do metabolismo de uma emulsão lipídica rica em
colesterol em pacientes com obesidade grau III

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

Área de concentração: Cardiologia

Orientadora: Dra. Barbara Maria Ianni

Co-orientador: Dr. Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor

Dantas, Simone Alves

**Avaliação do metabolismo de uma emulsão lipídica rica em colesterol em
pacientes com obesidade grau III / Simone Alves Dantas.** -- São Paulo, 2005.

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

Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientadora: Barbara Maria Ianni.

Descritores: 1.LIPOPOTEÍNAS LDL 2.LIPÍDIOS 3.OBESIDADE
MÓRBIDA/metabolismo 4.OBESIDADE MÓRBIDA/sangue 5.EMULSÕES
GORDUROSAS INTRAVENOSAS 6.RADIOISÓTOPOS DE CARBONO

USP/FM/SBD-190/05

A verdadeira medida de um homem não é como ele se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas como ele se mantém em tempos de controvérsia e desafio

Martin Luther King Jr

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Lourdes e Antônio

Que durante todos esses anos, não mediram esforços em dedicar suas vidas, para que pudéssemos ter o melhor para nossos futuros. Ensinaram-nos a ter iniciativa, perseverança, independência e coragem; e mesmo longe, sempre participaram das nossas decisões mais importantes.

Ao meu noivo Marcelo

Presente em todos os momentos dessa jornada, vivenciou as dúvidas, questionamentos e alegrias. Pelas diferenças que existem em nós, ensinou-me a ser uma pessoa mais paciente, crítica, objetiva e a reconhecer as prioridades de cada momento. Pela minha ausência freqüente no decorrer desse trabalho.

Ao meu irmão Alexandre

Pela amizade, amor incondicional e por nunca ter desistido de lutar.

A Denise e Kátia,

Pela amizade, respeito e amor que trazem para a nossa família.

Para meu querido “vô Dantas”

Pelo ser humano sensato, sábio e otimista que é; por continuar nos encantando e surpreendendo até hoje pela maneira com a qual enfrenta as adversidades que ainda fazem parte da sua vida. Sua coragem, dedicação e amor aos filhos, possibilitaram-me de estar aqui hoje.

*O valor das coisas não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem. Por isso,
existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e
pessoas incomparáveis*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

À amiga e orientadora Dra. Barbara Maria Ianni

Que aceitou o desafio de me orientar em uma área de pesquisa completamente diferente da sua. Mostrou-me que o conhecimento e o aprendizado caminham harmoniosamente com o respeito, amizade e seriedade dentro de um grupo. Pela confiança, lealdade e dedicação.

Ao Prof. Dr. Charles Mady

Que além de ter me proporcionado a oportunidade de realizar o doutorado, desde o princípio me incluiu nessa família que é a “Cardio Geral”. Pelo incentivo em todos os momentos e por ter me oferecido condições para crescer e amadurecer profissionalmente.

Ao Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

Por ter permitido que esse trabalho fosse desenvolvido no seu laboratório, pelas sugestões, idéias e também por suas críticas.

À Dra. Carmen Vinagre, pela colaboração, estímulo e enorme paciência em responder ao meus questionamentos. Pela amizade que surgiu durante esse trabalho.

Aos amigos da Unidade Clínica de Miocardiopatias, Afonso, Aloir, Edmundo, Fábio, Félix, Paula, Luciano e Vera, que transformam a “nossa Cardio Geral” em um ambiente de excelente convívio e extrema competência. Sempre muito prestativos e atenciosos, estabelecemos vínculos de amizade estão muito além da relação profissional. A Lucinha, pelas incansáveis horas de assistência, pelo carinho, confiança e amizade.

À amiga Lisa Ficker, que de forma muito prestativa, sempre esteve presente em todas as etapas da minha pesquisa. Pelo carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Wilson Mathias Jr e Dra. Jeanne Tsutsui, pela compreensão e apoio.

Aos assistentes do Serviço de Ecocardiografia do Incor: Dras. Ana Clara Rodrigues, Ana Lucia Arruda, Ingrid Kowatsch, Joicely Melo, Marta Lima, Miriam Pardi e aos Drs. Altamiro Ferraz, João Sbano, Marcos Valério Resende e Marcelo Vieira, pelos ensinamentos e compreensão durante esses meses, na qual estive tão envolvida com a finalização da tese.

Aos meus amigos da Especialização em Ecocardiografia: Denilson, George, Magda, Maria Rosa, Solange e Tathiana, companheiros desde o princípio do nosso estágio, compreensivos nas minhas ausências e tolerantes com as concessões que envolveram este processo.

Ao meu querido sogro Lauro
Pela grande gentileza em ter dedicado seu tempo na correção deste texto, pelo carinho e incentivo constante.

Aos pacientes
Que tornaram este trabalho possível.

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journal Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.

Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journal Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

Listas	<i>i</i>
Abreviaturas.....	<i>ii</i>
Tabelas	<i>iii</i>
Figuras	<i>iii</i>
RESUMO	<i>iv</i>
SUMMARY	<i>vii</i>
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVO	18
CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	20
Casuística	21
Critérios de seleção	21
Critérios de inclusão	21
Critérios de exclusão	22
Métodos	23
Esterilização do material	23
Preparação da emulsão LDE	24
Determinações bioquímicas séricas	25
Estudos cinéticos	25
Análise da dose radiológica aplicada	26
Análise compartimental da curva de decaimento plasmático dos lípides radioativos	27
Variáveis do estudo	28
Análise estatística	29
Questões éticas	29
RESULTADOS	30
DISCUSSÃO	36
CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
APÊNDICES	

LISTAS

ABREVIATURAS

ACAT: acetil coenzima A: colesterol acil transferase
ALI: *Annual Limit for Intake*
ANOVA: análise de variância
apo: apolipoproteína
¹⁴C: carbono 14
CE: colesterol éster ou colesterol esterificado
CE-¹⁴C: colesterol éster marcado com carbono 14
TG-³H: triglicérides marcado com trício
CETP: proteína de transferência de colesterol éster
CL: colesterol livre
CT: colesterol total
³H: trício
HCl: ácido clorídrico
HDL: lipoproteína de alta densidade
HDL-c: colesterol de HDL
HGMCoA-redutase: 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase
IDL: lipoproteína de densidade intermediária
IMC: índice de massa corpórea
(k): taxa fracional de transferência
KBq: quilobequerel
KBr: brometo de potássio
LCAT: lecitina colesterol acil transferase
LDE: emulsão lipídica artificial rica em colesterol
LDL: lipoproteína de baixa densidade
LDL-c: colesterol de LDL
LDL-r: receptor de LDL
LH: lipase hepática
LLp: lipase lipoprotéica
mSv: milisievert
mg/dL: miligrama por decilitro
mGy: miligray
Qm: quilomícrons
TFR: taxa fracional de remoção
TG: triglicérides
VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade
VLDL-c: colesterol de VLDL

TABELAS

Tabela 1.	Número e porcentagem de pacientes conforme sexo e grupo	31
Tabela 2.	Análise descritiva das variáveis de estudo, segundo grupo	32
Tabela 3.	Estatística descritiva da taxa fracional de remoção de Tg- ^3H e CE - ^{14}C da emulsão, segundo grupo	33

FIGURAS

Figura 1.	Curvas de remoção plasmática de triglicérides marcados com ^3H da emulsão, nos grupos obeso e controle	35
Figura 2.	Curvas de remoção plasmática de colesterol éster marcado com ^{14}C da emulsão, nos grupos obeso e controle	34

RESUMO

Dantas SA. *Avaliação do metabolismo de uma emulsão lipídica rica em colesterol em pacientes com obesidade grau III* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

INTRODUÇÃO: Obesidade pode estar relacionada a maior incidência de hipertensão arterial, *diabetes mellitus* e alterações nos lípides plasmáticos. Elevações discretas a moderadas de triglicérides e diminuição do colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) caracterizam a principal dislipidemia associada à obesidade, embora às vezes também esteja associada à elevação dos níveis plasmáticos da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Não se sabe, até o momento, como ocorre o metabolismo de LDL nesses pacientes. Emulsões artificiais com estrutura lipídica semelhante a das lipoproteínas plasmáticas foram desenvolvidas em laboratório e têm sido usadas em várias condições, com o intuito de verificar alterações na remoção de lípides da circulação. **OBJETIVO:** Avaliar a cinética plasmática de uma emulsão rica em colesterol que se liga a receptores de LDL e mimetiza o comportamento do colesterol endógeno, em pacientes com obesidade grau III em relação a um grupo controle, pela taxa fracional de remoção da emulsão. **CASUÍSTICA E MÉTODO:** Foi injetada uma emulsão artificial de LDL, chamada LDE, marcada com triglicérides- $[^3\text{H}]$ e colesterol éster- $[^{14}\text{C}]$, em 10 pacientes com obesidade grau III [índice de massa corpórea (IMC) maior que 40 Kg/m^2] e em 10 pacientes controles normais. Foram colhidas amostras de sangue em intervalos de tempo de 5 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas após a injeção, para determinação da curva de decaimento plasmático e cálculo da

taxa fracional de remoção da emulsão. RESULTADOS: Não houve diferença nas concentrações plasmáticas de colesterol total e LDL-colesterol entre os dois grupos; porém os níveis plasmáticos de triglicérides e VLDL-colesterol foram maiores no grupo obesidade. A taxa fracional de remoção de triglicérides, expressa em (h^{-1}) foi $0,086 \pm 0,044$ nos obesos e $0,122 \pm 0,026$ nos controles ($p = 0,040$), mas a taxa fracional de remoção de colesterol éster não apresentou diferença entre os dois grupos, com TFR de $0,052 \pm 0,021$ nos obesos e $0,058 \pm 0,015$ nos controles ($p = 0,971$). CONCLUSÃO: A cinética plasmática da emulsão de triglicérides foi menor no grupo dos obesos, permanecendo mais tempo na circulação. Porém, não houve diferença na remoção plasmática da emulsão marcada com colesterol éster em ambos os grupos.

Descritores: lipoproteínas LDL; lipídios; obesidade mórbida/metabolismo; obesidade mórbida/sangue; emulsões gordurosas intravenosa; radioisótopos de carbono

SUMMARY

Dantas SA. *Metabolism of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with obesity grade III* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

BACKGROUND: Obesity can be associated with hypertension, *diabetes mellitus* and is frequently accompanied by alterations in plasma lipids. Increased levels of triglycerides and lower concentration of high density lipoprotein (HDL-cholesterol) are the main changes related to obesity. Artificial emulsions of defined composition, resembling the lipidic structure of the plasma lipoproteins have been used in several conditions, to evaluate low density lipoprotein (LDL) metabolism. In morbid obesity, the LDL metabolism is poorly understood. OBJECTIVE: The purpose of the present study was to evaluate the kinetic of a cholesterol-rich emulsion that binds to the LDL receptors, called LDE, and resembles the metabolic behavior of the LDL-cholesterol, in a group of patients of morbid obesity comparing to a control group, by the fraction clearance rate (FCR). METHODS: LDE was labeled with [¹⁴C]-cholesteryl ester (¹⁴C-CE) and [³H]-triglycerides (³H-TG) and injected intravenously into 10 normolipidemic, nondiabetic patients with morbid obesity [body mass index (BMI) higher than 40 Kg/m²] and into 10 nonobese healthy controls. Blood samples were collected at 5 minutes, 1, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 hours after the injection, to determine the plasma decay curve, and to calculate the FCR of the emulsion. RESULTS: There was no difference regarding plasma levels of total cholesterol, LDL-cholesterol between the two

groups; but the plasma levels of VLDL-cholesterol and triglycerides were higher in the obesity group. FCR of triglycerides [FCR-TG (h^{-1})] was 0.086 ± 0.044 in the obese group and 0.122 ± 0.026 in the controls ($p = 0.040$), and the FCR of cholesterol ester (h^{-1}) was 0.052 ± 0.021 in the obese group and 0.058 ± 0.015 ($p = 0.971$), in the controls. CONCLUSION: In patients with morbid obesity the LDE labeled triglycerides remain longer in the particle than in the control group. However, there were no alterations in the plasma removal of LDE between the two groups.

Keywords: LDL lipoproteins; lipids; morbid obesity/metabolism; morbid obesity/blood; artificial emulsions with lipidic structure; carbon radioisotopes

INTRODUÇÃO

A obesidade pode ser definida como a quantidade excessiva de tecido adiposo em relação à quantidade de tecido considerada normal (DEURENBERG *et al.*, 1999) e pode estar associada a várias co-morbidades. Em uma pesquisa envolvendo as regiões Nordeste e Sudeste do país foi encontrada uma prevalência de obesidade (índice de massa corpórea maior que 30 Kg/m^2) em aproximadamente 7% dos homens e 12,4% nas mulheres, estimando-se que 0,5% sejam obesos grau III, condição esta previamente chamada de obesidade mórbida (MONTEIRO *et al.*, 1999).

A associação entre a obesidade e maior risco de desenvolver outras doenças foi observada no início do século passado, quando as companhias de seguro de vida relacionaram mortalidade mais precoce nas pessoas obesas em relação às magras, embora nessa época ainda não houvesse um método científico adequado disponível para distinguir entre o excesso de peso e de gordura. Na década de 40 foi demonstrado entre jogadores de futebol americano, que o aumento de peso existente não estava relacionado ao excesso de gordura. Utilizaram a hidrodensitometria nessa avaliação e, a partir desta época, surgiram outros recursos mais adequados para a medição de gordura, a fim de diferenciar o aumento de peso do aumento de tecido adiposo (DEURENBERG *et al.*, 1999).

Atualmente podemos determinar a porcentagem de gordura corpórea por vários métodos, alguns mais sofisticados e caros, como a densitometria, método clássico que diferencia a massa corpórea com e sem gordura em dois compartimentos com diferentes densidades; a bioimpedância, que aplica

correntes alternantes medindo as resistividades dos tecidos; a tomografia computadorizada e a ressonância magnética, que oferecem informações sobre a composição dos tecidos. Outros métodos disponíveis, mais práticos, simples e independentes de laboratório são a medida do espessamento da dobra cutânea, a relação cintura-quadril e o índice de massa corpórea (IMC) (JEBB *et al.*, 1993).

A relação cintura-quadril e a medida da circunferência abdominal são métodos bastante utilizados, fáceis de se calcular e têm boa correlação com a distribuição de gordura intra-abdominal. A medida da dobra cutânea também pode ser utilizada, porém em obesos grau III apresenta maior probabilidade de erro pela dificuldade técnica, mesmo quando realizada por profissionais experientes (DEURENBERG *et al.*, 1999). Porém, o método mais utilizado ainda é o IMC, descrito inicialmente por Quetelet, em 1869 (KEYS A *et al.*, 1972). É calculado pela fórmula: peso em kilogramas, dividido pela altura em metros ao quadrado (Kg/m^2). De acordo com a *World Health Organization* (WHO, 1997) definem-se os valores de corte para obesidade baseados no IMC em:

- magro $<18,5 \text{ Kg/m}^2$
- normal 18,5 a 24,9 Kg/m^2
- sobrepeso 25,0 a 29,9 Kg/m^2
- obeso grau I 30,0 a 34,9 Kg/m^2
- obeso grau II 35,0 a 39,9 Kg/m^2
- obeso grau III $\geq 40,0 \text{ Kg/m}^2$

Dentre as várias co-morbidades relacionadas à obesidade incluem-se as doenças do trato gastrointestinal (hérnia de hiato, refluxo gastro-esofágico, colelitíase e maior incidência de câncer colorretal em relação à população com peso normal); doenças do sistema respiratório (apnéia do sono, devido à obstrução das vias aéreas superiores; sonolência e hipoventilação por diminuição da complacência pulmonar) e comprometimento do sistema osteoarticular, pela sobrecarga de massa corpórea (BOURDAGES *et al.*, 1994).

Existe relação entre obesidade e doenças do sistema cardiovascular, como na hipertensão arterial sistêmica, a qual apresenta aumento na sua prevalência em aproximadamente 2 a 5,6 vezes em relação aos indivíduos com o peso normal (VAN ITALLIE, 1985), provavelmente pela maior sensibilidade do tecido visceral à ação das catecolaminas e pela maior reabsorção renal de sódio (CALLE *et al.*, 1999; SU *et al.*, 1995). O aumento dos níveis de catecolaminas circulantes e maior ativação adrenérgica (SU *et al.*, 1995), associada a maior quantidade de volume sanguíneo circulante (secundário ao aumento do tecido adiposo), podem levar a disfunção diastólica e sistólica do ventrículo esquerdo (ZARICH *et al.*, 1991; ALPERT, 2001). Tanto a sobrecarga de volume como a sobrecarga de pressão podem ser responsáveis pela insuficiência cardíaca nesses pacientes, sendo uma complicação clínica freqüente e também uma das causas de mortalidade na obesidade grau III.

Resistência à insulina, *diabetes mellitus* e dislipidemia são doenças metabólicas intimamente relacionadas à obesidade (KANNEL *et al.*, 2002). O aumento na prevalência de *diabetes mellitus* nesses pacientes ocorre em cerca

de 2,9 vezes, secundário ao aumento na produção hepática de triglicérides e maior síntese de ácidos graxos livres. A incidência de dislipidemia está aumentada em aproximadamente 1,5 vezes, sendo esse efeito mais evidente em indivíduos com idade menor que 45 anos (VAN ITALLIE, 1985). Essa relação entre dislipidemia e obesidade foi mostrada em uma meta-análise envolvendo 70 trabalhos, evidenciando redução de cerca de 1% nos valores de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol), 3% de redução nos valores de triglicérides e aumento de 1% nos valores de colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) a cada quilograma perdido, em indivíduos obesos (DATTILO *et al.*, 1992).

Elevações discretas a moderadas de triglicérides e diminuição do HDL-colesterol caracterizam a principal dislipidemia associada à obesidade, embora também seja possível encontrar níveis de colesterol total elevados (CALLE *et al.*, 1999). O aumento no suprimento de ácidos graxos para o fígado, proveniente das reservas de gordura, leva a maior produção hepática de triglicérides, que após serem sintetizados, são liberados e transportados pelas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). O excesso de triglicérides é trocado pelo colesterol éster contido nas partículas de lipoproteína de alta densidade (HDL) e, quando há elevada produção da VLDL, pode ocorrer seu acúmulo, devido à saturação do processo lipolítico (HOWARD, 1999).

A VLDL sofre ação da lipase lipoprotéica (LLp) nas paredes dos capilares hidrolisando os seus triglicérides em glicerol e ácidos graxos, os quais são absorvidos por vários tecidos, especialmente músculo e tecido adiposo,

onde são reesterificados e armazenados, constituindo as reservas de fonte energética. Quando a energia se faz necessária, a lipase hormônio-sensível hidrolisa as gorduras armazenadas, liberando novamente os triglicérides na circulação (GOLDBERG, 1996).

Acredita-se que fatores endócrinos e altas concentrações plasmáticas de insulina e cortisol, freqüentemente encontradas em pacientes com obesidade central, também estejam envolvidos no aumento na síntese da VLDL hepática (JAHR *et al.*, 1983). O aumento de triglicérides de VLDL e o atraso no seu *clearance* poderiam estar relacionados à diminuição na atividade da lipase lipoprotéica (KISSEBAH *et al.*, 1982) que, por sua vez, também levariam a alterações no metabolismo da HDL (NIKKILA *et al.*, 1977). A diminuição na atividade da LLp associada ao aumento na atividade da lipase hepática (LH), enzima envolvida no remodelamento da HDL pelo estímulo da hidrólise de triglicérides, poderiam contribuir para as baixas concentrações de HDL associados à obesidade e resistência à insulina (LAAKSO *et al.*, 1990). Quando há resistência à insulina ocorre indução excessiva de lipólise do tecido adiposo, aumentando o fluxo de ácidos graxos livres para o fígado (LEONG *et al.*, 1999). O aumento nas concentrações de insulina circulantes também pode levar a maior atividade da LLp no tecido adiposo (SADUR *et al.*, 1982), porém em obesos foi relatada piora na sua ativação, conseqüente à ação da insulina e à sua resistência (ONG *et al.*, 1989). Foi demonstrado que em culturas de hepatócitos a insulina suprimiu agudamente a secreção de triglicérides da VLDL em um curto período de tempo (BARTLETT *et al.*, 1988).

Quanto ao *clearance* plasmático de triglicérides, Coppack *et al.* (1992) encontraram-no diminuído no tecido adiposo de pacientes obesos, embora também tenha sido relatado diminuição da hidrólise de triglicérides da VLDL no período pós-prandial em indivíduos com IMC normal (POTTS *et al.*, 1991), presumivelmente pela competição com os triglicérides dos quilomícrons (Qm) (BRUNZELL *et al.*, 1973). No obeso isto não ocorreu, sugerindo-se que seus Qm são substratos menos efetivos para a LLp do tecido adiposo, promovendo menor competição entre a remoção dos triglicérides da VLDL ou, possivelmente, que as partículas de VLDL são melhores substratos do que os triglicérides dos Qm (MUSLINER *et al.*, 1979).

Outra possível enzima envolvida no processo de transferência entre a HDL e VLDL é a proteína de transferência de colesterol éster (CETP), sintetizada no fígado, intestino e tecido adiposo (MORTON *et al.*, 1982). DULLAART *et al.* (1994) também relataram aumento na atividade da CETP em homens obesos quando comparados a não obesos, acreditando-se que isso pudesse contribuir para o desenvolvimento de hiperlipidemia e baixas concentrações de HDL-colesterol.

Em 1947, Vague relatou a “obesidade andróide” ou do tipo central como fator de risco para doença coronária, pela avaliação da relação cintura-quadril. Essa associação entre obesidade e doença arterial coronária foi avaliada por DORN *et al.* (1997) durante um período de seguimento de 28 anos. No estudo de *Framingham*, Hubert *et al.* (1983) mostraram que o ganho de peso na idade adulta levou a maior risco de desenvolver doenças

cardiovasculares em ambos os sexos, porém a obesidade, avaliada pela análise da porcentagem de peso desejável, só exerceu influência no risco de doença coronária e insuficiência cardíaca quando associada a outras co-morbidades, e não devido ao grau de obesidade em si. Manson *et al.* (1990) acompanharam mulheres durante 16 anos e avaliaram a associação entre IMC e mortalidade total de causas específicas e mostraram que, nesse período, ocorreu menos de 1% de mortes de causas cardiovasculares. No *The Expert Panel II* (1993), a obesidade não foi relatada como fator independente para doença arterial coronária, apesar da presença de gordura visceral abdominal ter sido considerada um fator de risco independente (CASASSUS *et al.*, 1992).

Outros estudos demonstraram que principalmente a doença coronária e o acidente vascular cerebral apresentam maior incidência em obesos (RABKIN *et al.*, 1977), porém ainda é controverso o conceito de que qualquer grau de obesidade contribua para o aumento desse risco (CHAPMAN *et al.*, 1971), bem como a inclusão da obesidade como fator de risco independente para doença coronária. Definindo-se a obesidade apenas pelo IMC, alguns pacientes acima de 30 Kg/m² são automaticamente classificados como alto risco, mesmo que tenham perfil metabólico normal (SJOSTROM *et al.*, 1998). Dessa forma, o risco de desenvolver doença coronária na obesidade pode estar relacionado, entre outras causas, a alterações das lipoproteínas plasmáticas (Lp) secundárias ao ganho de peso (DENKE *et al.*, 1994; LAMON-FAVAS *et al.*, 1996) e não apenas aos valores do perfil lipídico em si.

As lipoproteínas plasmáticas são estruturas macromoleculares formadas por compostos insolúveis em água, os triglicérides e o colesterol éster; e por estruturas protéicas chamadas apolipoproteínas (apos), que viabilizam o transporte de lípidos dos órgãos de síntese para os locais de utilização (BACHORIK *et al.*, 1999). As apolipoproteínas desempenham importante papel na estabilização da estrutura da Lp, modulando o seu metabolismo ao atuarem como ativadores e bloqueadores enzimáticos e mediando a captação celular pelos receptores específicos (SCHAEFFER *et al.*, 1978).

As principais classes de lipoproteínas foram definidas nos anos 50 e 60 (BROWN *et al.*, 1986), em quatro tipos: a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), a lipoproteína de densidade intermediária (IDL), a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a lipoproteína de alta densidade (HDL). Atualmente, consideram-se duas outras Lp, os quilomícrons e a lipoproteína (a). As diferenças entre elas estão relacionadas à sua composição (diferenças quantitativas e qualitativas dos lípidos e apolipoproteínas), ao tamanho e a mobilidade eletroforética (LEE *et al.*, 1970; CHAPMAN *et al.*, 1981).

O processo de transporte plasmático de lípidos inicia-se com duas Lp ricas em triglicérides: os quilomícrons, que fazem o transporte de lípidos da dieta, e as VLDL, que fazem o transporte dos lípidos de origem endógena para os tecidos (KANE *et al.*, 1980).

As VLDL são sintetizadas no retículo endoplasmático (GIBBONS, 1990) e moduladas por fatores hormonais, além de serem dependentes do

balanço energético e metabólico. Sua meia-vida na circulação em humanos é de 1-3 horas (KOVANEN *et al.*, 1981) e tem como principal função o transporte de triglicérides e colesterol para os tecidos periféricos (BACHORICK *et al.*, 1999). Este sistema de transporte envolve duas classes de lípidos hidrofóbicos, os triglicérides e o colesterol éster (CE), que são hidrolizados em ácidos graxos e colesterol livre, respectivamente, antes de serem utilizados pelas células (BROWN *et al.*, 1981).

Após ser secretada na circulação, a VLDL entra em contato com outras lipoproteínas e, por meio de colisões, principalmente com a HDL, adquire maiores quantidades de apo E e apo C-II (HAVEL *et al.*, 1988). A apo C-II atua como um co-fator de ativação da lipase lipoprotéica (KRAUSS *et al.*, 1973), enzima ligada às membranas das células endoteliais de capilares em vários tecidos, como tecido adiposo, músculos esquelético e cardíaco, pulmão e glândula mamária. (VILARO *et al.*, 1988). A LLp hidrolisa a VLDL, diminuindo seu tamanho e aumentando sua densidade e, dessa forma, surge uma partícula remanescente denominada lipoproteína de densidade intermediária (IDL).

As partículas de IDL seguem dois caminhos (BROWN *et al.*, 1986): cerca de 50% do total (partículas maiores) são removidos pelo fígado por endocitose e os outros 50% (partículas menores) podem ser removidos ou continuar perdendo triglicérides e fosfolípidos, pela ação da lipase hepática (LH), enzima presente no endotélio dos capilares hepáticos, resultando na lipoproteína de baixa densidade (LDL) (HAVEL, 1984).

As LDL são derivadas da VLDL plasmática na sua maior parte, mas uma pequena porção pode ser proveniente da secreção direta do fígado ou do intestino, com seus níveis circulantes determinados primariamente pela taxa de remoção do plasma e não pela sua taxa de produção (BROWN *et al.*, 1981). A LDL é constituída por cerca de 46% a 50% de colesterol éster, 4% a 8% de triglicérides, 18% a 24% de fosfolípidos, 6% a 8% de colesterol e 18% a 22% de proteínas, representadas por apenas uma molécula de apo B-100 (BACHORICK *et al.*, 1999). Sua meia-vida é de dois a três dias (LEE *et al.*, 1970; LEE *et al.*, 1974) e tem densidade entre 1,020 a 1,063 g/mL. Sua função fisiológica é transportar o colesterol necessário para a síntese de membranas das células em divisão e para a síntese de hormônios esteróides no córtex da supra-renal e gônadas, constituindo cerca de 70% do colesterol plasmático total em indivíduos normais (SOUTAR *et al.*, 1977).

Receptores de alta afinidade que reconhecem a apo B-100 e catabolizam a LDL, fazem do fígado o principal órgão responsável pela sua captação (BROWN *et al.*, 1986). Após a ligação da LDL ao receptor, há formação dos endossomos e, pela diminuição do pH, o complexo receptor-LDL desfaz-se. Este receptor retorna à superfície celular e, por ação das enzimas lisossomais, decompõe a LDL, transformando a apolipoproteína em aminoácidos, o colesterol éster em colesterol livre e os triglicérides em ácidos graxos livres, monoglicérides e glicerol (BROWN *et al.*, 1981).

O colesterol proveniente da decomposição do colesterol éster pode ser utilizado no metabolismo intracelular ou ser reesterificado pela ação da enzima

acetil coenzima A: colesterol acil transferase (ACAT) para ser armazenado. Por meio de ativações e de bloqueios enzimáticos, esse colesterol regula três eventos metabólicos na célula:

1. inibe a biossíntese de colesterol intracelular pela supressão da atividade da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase)
2. ativa a reesterificação do colesterol pela ativação da ACAT
3. inibe a síntese de receptores da LDL, evitando posterior influxo de colesterol e, dessa forma protegendo a célula do seu excesso.

Em situações em que ocorre diminuição do nível intracelular de colesterol, há aumento na síntese de receptores e ativação da biossíntese de colesterol, mantendo dessa forma os níveis intracelulares do colesterol (BROWN *et al.*, 1981; BROWN *et al.*, 1986).

Como os receptores da LDL são os principais responsáveis pela manutenção das concentrações plasmáticas de LDL-colesterol, defeitos no seu número ou função levam a maior dificuldade na captação da lipoproteína, resultando em remoção plasmática deficiente, com conseqüente aumento da sua concentração plasmática (GOLDSTEIN *et al.*, 1985). Isso faz com que a LDL permaneça mais tempo na circulação, aumentando a probabilidade de sofrer modificações, principalmente oxidação por radicais livres. Uma vez oxidada, não é mais reconhecida pelos receptores B e E, e acaba sendo captada pelos macrófagos que não possuem sistema de auto-regulação. Quando sobrecarregados com colesterol éster, os macrófagos são convertidos em

células espumosas, que são componentes clássicos da placa de aterosclerose (GLOMSET, 1973). Além disso, a LDL oxidada é citotóxica e pode causar lesões no endotélio, contribuindo para o processo aterosclerótico.

Outra Lp que também desempenha importante papel no transporte endógeno dos lípidos é a HDL, envolvida no mecanismo de remoção do colesterol dos tecidos extra-hepáticos, chamado transporte reverso de colesterol. É produzida pelo fígado e intestino, composta por 45% a 55% de proteínas, 26% a 32% de fosfolípidos, 15% a 20% de colesterol éster, 2% a 7% de triglicérides, 3% a 5% de colesterol e tem meia-vida de cinco a seis dias (BACHORICK *et al.*, 1999; KWITEROVICH, 2000). A HDL nascente é lançada na circulação com alto conteúdo de colesterol, de fosfolípidos e apolipoproteínas (EISENBERG, 1984) e faz a captação do excesso de colesterol das células de tecidos periféricos e da superfície das lipoproteínas ricas em triglicérides, convertendo-se em uma partícula menor (SCHAEFER *et al.*, 1982), chamada HDL2. Esta se torna substrato para ação da lipase hepática, convertendo-se na HDL3 e retornando ao ciclo de remoção tecidual do colesterol (EISENBERG, 1984).

A determinação plasmática dessas lipoproteínas é realizada rotineiramente pelo seu conteúdo lipídico e/ou protéico; porém, para melhor compreensão da fisiopatologia do metabolismo lipídico e conseqüentemente do processo de aterosclerose, são necessários estudos da cinética plasmática. É possível avaliar a remoção plasmática dessas Lp pela injeção de lipoproteínas nativas marcadas com lípidos radioativos; porém, esse procedimento é bastante

restrito devido a dificuldades no isolamento, na marcação radioativa da partícula e pela necessidade do uso da lipoproteína autóloga, devido ao risco de contaminação com os vírus da hepatite e síndrome da imunodeficiência adquirida.

Dessa forma, novos estudos foram realizados na tentativa de reproduzir a partícula de LDL artificialmente e, assim, minimizar os riscos do procedimento. Krieger *et al.*, em 1978, desenvolveram um método para substituir o núcleo lipídico da LDL por colesterol éster exógeno ou por outra classe lipídica. Estas partículas reconstituídas mostraram atividade biológica similar à da LDL, em relação à captação e catabolismo por fibroblastos *in vitro*.

Em 1982, Ginsburg *et al.* desenvolveram uma emulsão de fosfolípidos e colesterol éster preparada por ultracentrifugação. Foi um estudo físico-químico que demonstrou estabilidade e semelhança em relação ao tamanho e estrutura dessas emulsões, quando comparadas à parte lipídica da LDL.

Em 1993, utilizando a metodologia descrita por Ginsburg *et al.*, Maranhão *et al.* desenvolveram uma emulsão artificial com composição lipídica semelhante à da LDL nativa e iniciaram uma série de estudos. Foi testada em ratos a hipótese de que era possível mimetizar o comportamento metabólico da lipoproteína nativa e os resultados mostraram que essa emulsão artificial, chamada LDE, apresentava cinética plasmática semelhante à da LDL nativa, sugerindo captação pelos mesmos receptores da LDL. Também foi avaliada a captação em diferentes amostras de tecidos de animais, mostrando

ser o fígado o local de maior captação. Para testar se a LDE era captada por receptores específicos da LDL, a LDE foi injetada em ratos tratados com 17 α -etinilestradiol, uma medicação que potencializa a atividade dos receptores de LDL e, após o uso dessa medicação, a remoção da emulsão ocorreu de maneira mais rápida. (MARANHÃO *et al.*, 1993)

A LDE não tem proteína, mas foi demonstrado que ao ser injetada na circulação, entra em contato com as Lp nativas e adquire apo E, que serve de ponte para ser reconhecida e captada pelos receptores de LDL. É importante ressaltar que a LDL nativa não possui apo E, ligando-se ao receptor por meio de sua única proteína, a apo B-100.

Em 1997, Maranhão *et al.* avaliaram a cinética plasmática de LDE em indivíduos com hipercolesterolemia, situação na qual os receptores B e E são defeituosos. Observaram que a remoção plasmática da LDE foi mais lenta, conforme já esperado. Nesse trabalho também foi realizado o estudo de competição em linfócitos, confirmando que a LDL nativa compete com a LDE pela captação celular e comprovando que a remoção de ambas é feita pelo mesmo receptor.

Em 1999, Hirata *et al.* estudaram em ratos, os efeitos da inclusão da parte protéica, apo B, na emulsão (LDE-apo B) e compararam a sua remoção com a remoção da LDL nativa e da LDE. Encontraram semelhança na taxa fracional de remoção da LDE-apo B e LDL nativa, as quais foram menores que a taxa de remoção da LDE isolada, concluindo que a apo B é menos eficiente na ligação aos receptores hepáticos que a apo E. Conseqüentemente, se a LDE

fosse associada a apo B, o estudo da cinética plasmática tornar-se-ia mais demorado.

Em 2001, Pinto *et al.* estudaram a cinética da LDE em pacientes jovens, de meia-idade e idosos e observaram que a remoção nos idosos ocorre de maneira mais lenta em relação aos jovens. Encontraram correlação negativa entre taxa de remoção e idade, ou seja, quanto maior a idade, mais lentamente a emulsão é removida da circulação. No grupo de pacientes de meia-idade não houve diferença significativa na remoção, quando comparados aos dois outros grupos.

Em 2003, Santos *et al.*, estudando pacientes com doença arterial coronária, marcaram o colesterol éster e o colesterol livre da emulsão LDE e mostraram que o grupo com doença coronária apresentava remoção mais rápida do colesterol livre em relação ao colesterol esterificado quando comparado ao grupo controle. Como o colesterol livre se dissociou da emulsão, mostrou não ser um bom marcador da partícula na circulação.

A cinética das emulsões artificiais de LDE pode fornecer informações sobre os diversos aspectos dinâmicos do metabolismo da LDL, como velocidade de remoção plasmática e função de receptores celulares. Pode-se também, inferir sobre o processo de lipólise, sobre as ações enzimáticas e transferência de componentes lipídicos de superfície entre outras lipoproteínas.

Com esses trabalhos, pode-se verificar que a utilização da LDE proporcionou uniformidade na preparação e viabilizou o seu uso para um maior

número de pacientes, com períodos de testes mais curtos, possibilitando avaliar o comportamento metabólico da LDL em diversas situações.

Os estudos existentes, até o momento, sobre o metabolismo lipídico na obesidade grau III abordam a via exógena de transporte de lípidos, envolvendo outra lipoproteína artificial, os quilomícrons. Chan *et al.* (2002) avaliaram o metabolismo de partículas remanescentes de quilomícrons em um grupo de sobrepeso e obesos grau I-II, encontrando remoção mais lenta dessas partículas nos obesos quando comparada ao grupo controle. Em outro estudo que avaliou o metabolismo de quilomícrons em mulheres obesas grau I-II, observou semelhança na remoção dos triglicérides entre obesas e controles, mas com menor remoção de colesterol éster no grupo das obesas (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Portanto, apesar de existirem alguns relatos sobre o metabolismo de lipoproteínas em obesos grau I-II, não existem estudos sobre o metabolismo da LDL em pacientes com obesidade grau III, que é uma condição clínica relacionada a várias co-morbidades importantes e alterações nos perfis lipídicos.

OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi avaliar o metabolismo de uma emulsão lipídica artificial rica em colesterol, pela cinética plasmática de triglicérides e colesterol éster, em pacientes com obesidade grau III.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Ambulatório da Unidade Clínica de Miocardiopatias e no Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

CASUÍSTICA

De janeiro de 2002 a dezembro de 2003 foram avaliados pacientes com obesidade grau III provenientes do Ambulatório da Unidade Clínica de Miocardiopatias e, destes, foram selecionados 10 pacientes, que preencheram os critérios de inclusão e exclusão, e que concordaram em participar do estudo. Também foram selecionados 10 indivíduos com IMC até 24,9 Kg/m², normolipidêmicos, normoglicêmicos, pareados por idade e sexo, constituindo o grupo controle normal.

▪ Critérios de seleção

Critérios de inclusão

- pacientes de ambos os sexos, com idade entre 18–55 anos de idade
- pacientes com obesidade grau III

A obesidade foi avaliada pelo IMC, calculado como peso em kilogramas, dividido pela altura em metros ao quadrado [IMC: P (Kg)/A (m²)]. Dessa forma, o peso foi considerado normal quando o IMC estava entre

18,5 a 24,9 Kg/m² e classificado em obeso grau III, quando o IMC estava igual ou maior que 40,0 Kg/m².

Critérios de exclusão

- insuficiência hepática, avaliada pela atividade plasmática da aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT), maiores que três vezes o valor considerado normal
- níveis séricos de jejum de 12 horas, para triglicérides \geq 200 miligramas por decilitro (mg/dL) e colesterol total \geq 240 mg/dL, de acordo com as III Diretrizes de Dislipidemia da Sociedade Brasileira de Cardiologia de 2001
- insuficiência renal aguda ou crônica, avaliada pelos níveis plasmáticos de creatinina maiores que 1,4 mg/dL
- história prévia ou atual das seguintes doenças: neoplasia, doenças auto-imunes, *diabetes mellitus*, hipotireoidismo, hipertireoidismo, doenças inflamatórias e doenças infecciosas
- uso de hipolipemiantes orais nos últimos 90 dias
- uso de contraceptivos orais ou injetáveis nos últimos 90 dias
- gravidez [descartada pela dosagem de gonadotrofina coriônica humana (HCG) na urina].

MÉTODOS

Os lípides marcados com isótopos radioativos, colesterol esterificado (oleato de colesterol-[1-¹⁴C]) e triglicérides (tri-[9,10 (n)- ³H]) foram obtidos da *Amersham International* (Little Chalfont, Inglaterra), ambos com marcação no anel esteroidal. Os lípides trioleína, oleato de colesterol, colesterol e fosfatidilcolina, utilizados para o preparo da emulsão foram adquiridos da *Sigma Chemical Company* (St. Louis, USA). A pureza dos lípides foi avaliada pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCO) (0,5mm de espessura), utilizando sílica gel 60H e sistema solvente de hexano: éter etílico: ácido acético (70: 30: 1) v/v/v.

Os demais reativos e solventes foram adquiridos da Merck (Rio de Janeiro, Brasil).

▪ Esterilização do material

Toda vidraria utilizada neste estudo foi submetida à esterilização e despirogenização a seco (estufa 180°C, por 90 minutos) e a vapor (autoclavagem a 120°C, 1,5 atmosfera por 30 minutos). Todo o procedimento de preparo das emulsões foi realizado em fluxo laminar vertical. Os materiais plásticos e de borracha utilizados foram descartáveis. Alíquotas das emulsões artificiais foram submetidas ao teste de presença de pirogênicos e esterilidade, no Laboratório de Metabolismo de Lípides.

▪ **Preparação da emulsão LDE**

A LDE foi preparada segundo a técnica descrita por Ginsburg *et al.* (1982) e modificada por Maranhão *et al.* (1993). Em um frasco foram pipetados 40 miligramas (mg) de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol (*Sigma Chemical Co* – St. Louis, EUA), a partir de estoques preparados em clorofórmio/metanol (2:1) (*Merck* – Darmstadt, Alemanha). Foram adicionados 740 kilobquerel (kBq) de oleato de colesterol-¹⁴C e 148 kBq de trioleína-³H (*Amersham International* – Reino Unido). Em seguida a mistura foi seca sob fluxo de nitrogênio, em banho-maria a 37° C e mantida em dessecador a vácuo por 16 horas, a 4° C, para remoção dos solventes residuais.

A mistura de lípides foi então, ressuspensa com 10 mL de tampão-tris HCl 0,01M, pH 8,0 e emulsificada por irradiação ultra-sônica (*Branson Sonifier 450*, USA) a 125 *watts* de potência, durante 3 horas, sob uma atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando de 51 a 55° C. Em seguida, foi purificada em duas etapas de ultracentrifugação (*Ultracentrifuga Beckmen*, USA).

Na primeira delas, a emulsão foi centrifugada a 35.000 rotações por minuto (rpm), durante 30 minutos, a 4° C. Em seguida foi aspirado e desprezado 1,0 mL do sobrenadante, correspondente às partículas de maior tamanho e menor densidade. A densidade dos 9,0 mL restantes, foi ajustada para 1,21 g/mL com brometo de potássio (KBr). A emulsão foi novamente submetida a ultracentrifugação a 35.000 rpm durante 2 horas, a 4° C. Ao

término foram aspirados 2,0 mL do sobrenadante correspondentes a LDE. Esta emulsão foi dializada durante 12 horas, a 4° C, em tampão tris-HCl para retirada do KBr e esterilizada por passagem em filtro *Millipore*[®] 0,22 µ de diâmetro.

▪ **Determinações bioquímicas séricas**

No mesmo dia da avaliação da cinética da LDE foram colhidas amostras de sangue após 12 horas de jejum, para as determinações bioquímicas. Foram realizadas as seguintes dosagens plasmáticas:

- níveis plasmáticos de triglicérides, uréia e glicose, em miligramas por decilitro (mg/dL), dosadas pelo método colorimétrico-enzimático
- níveis plasmáticos de colesterol total e HDL-colesterol, em miligramas por decilitro (mg/dL), dosados pelo método colorimétrico-enzimático. O valor de LDL-colesterol foi obtido pela diferença entre colesterol total e a somatória da HDL-colesterol e da VLDL-colesterol, sendo a VLDL-colesterol calculada pela divisão dos níveis plasmáticos de triglicérides por 5 (fórmula de Friedewald) (FRIEDEWALD *et al.*, 1972)
- concentrações de apolipoproteínas A-I e B, em gramas por litro (g/L), dosadas por imunoturbidimetria.

▪ **Estudos cinéticos**

Os estudos da cinética plasmática de LDE foram iniciados nos participantes que se encontravam em jejum de 12 horas, por volta das 9 horas

da manhã. Durante o dia foram permitidas três refeições hipogordurosas, incluindo o café da manhã, almoço e jantar, servidos aproximadamente às 9:00, 12:00 e 18:00 horas, respectivamente.

Foram injetados 100 microlitros (μl) de LDE, contendo 70 kBq de oleato de colesterol- ^{14}C e 121 kBq de trioleína- ^3H e colhidas amostras de 6 mL de sangue em tubos de ensaio contendo 250 U.I. de heparina sódica (*Roche – Brasil*), durante as 24 horas subseqüentes, em intervalos regulares e pré-determinados de 5 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas.

As amostras de sangue foram, então, centrifugadas a 2.700 rpm, durante 10 minutos, em centrífuga *Sorvall* (modelo RT7, Wilmington, EUA), para obtenção do plasma. Alíquotas de 1,0 mL de plasma foram pipetadas em frascos de cintilação e acrescentadas a esses frascos 5,0 mL de solução cintiladora *Ultima GoldTM XR* (*Packard – Groningen, Holanda*) para a determinação da radioatividade presente nas amostras, na qual foi utilizado um contador Beta (*Packard Tricarb*, modelo 2100 TR, EUA). As contagens obtidas foram utilizadas para o cálculo das curvas de decaimento plasmático e dos parâmetros cinéticos dos componentes lipídicos radioativos da emulsão, por meio de um programa computacional de análise compartimental, chamado *AnaComp*[®] versão 4.1 (MESQUITA, 1994).

▪ **Análise da dose radiológica aplicada**

A dose radiológica injetada foi avaliada de acordo com as normas da *International Commission on Radiological Protection* (ICRP) (SOWBY,

1984). O parâmetro *Annual Limit for Intake* (ALI) de radionuclídeo é definido como a quantidade de radioisótopo que induz a uma dose equivalente de 50 milisievert (mSv). Para componentes orgânicos marcados com ^{14}C ou ^3H , os valores de ALI são 9×10^7 e 3×10^9 bequerel (Bq), respectivamente. No presente estudo, a dose injetada de ^{14}C foi de $22,2 \times 10^4$ Bq, que equivale a: $(22,2 \times 10^4 \text{ Bq} / 9 \times 10^7 \text{ Bq}) \times 50\text{mSv} = 0,1233\text{mSv}$. Para o ^3H a dose injetada foi de $44,4 \times 10^4$ Bq, equivalente a $(44,4 \times 10^4 \text{ Bq} / 3 \times 10^9 \text{ Bq}) \times 50 \text{ mSv} = 0,0075 \text{ mSv}$.

A dose equivalente incorporada no corpo inteiro, em consequência da exposição aos lípides radioativos, foi estimada em 0,04 mSv, conforme avaliado pelo método MIRD - *Medical Internal Radiological Dosimetry* (SMITH, 1977), muito abaixo do limite permitido pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, de 50 mSv (CNEN, 1988).

▪ **Análise compartimental da curva de decaimento plasmático dos lípides radioativos**

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

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

- compartimento 2: LDE (já com as apolipoproteínas)
- $k_{1,0}$: representa a fração da emulsão que é removida do compartimento plasmático por outra via não específica (não pelo receptor da LDL)
- $k_{1,2}$: representa a fração da emulsão que adquire apolipoproteínas e sofreu ação da LLp
- $k_{2,0}$: representa a fração 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), expresso em h^{-1} , utilizando-se as respectivas taxas fracionais de transferência (k):

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

- **Variáveis do estudo**

- grupos: obesos grau III e controle
- características demográficas: sexo, idade
- variáveis clínicas
 - ♦ bioquímicas: perfil lipídico (dosagem de colesterol total, triglicérides, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol), apolipoproteína A-I e B
 - ♦ índice de massa corpórea (IMC)

- **Análise estatística**

Foi utilizado o teste exato de Fischer na comparação dos grupos em relação ao sexo.

Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney na comparação das médias do perfil bioquímico e do IMC, de acordo com os grupos. Para todas as análises foi utilizado o software SPSS versão 10.0. Foi considerada diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

- **Questões éticas**

Os participantes deste estudo foram orientados sobre a natureza da pesquisa, receberam e assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”, assim como lhes foram explicados todos os seus itens. Este documento seguiu as normas da **Resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde, de 10 outubro 1996**, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética para Análises de Pesquisas (CAPPesq nº 492/02) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), em 2002.

RESULTADOS

▪ **Comparação dos grupos em relação às características demográficas e clínicas**

Conforme já descrito, foram analisados 20 pacientes, sendo 10 obesos grau III e 10 do grupo controle. Os resultados da tabela 1 mostram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupo de pacientes, em relação a sexo ($p = 1,000$).

Tabela 1. Número e porcentagem de pacientes conforme sexo e grupo

Sexo	Grupo		Total n(%)
	Obeso n(%)	Controle n(%)	
masculino	3 (30)	4 (40)	7 (35)
feminino	7 (70)	6 (60)	13 (65)
TOTAL	10 (100)	10 (100)	20 (100)

$p = 1,000$ (Fisher)

Na tabela 2, comparam-se os grupos em relação às variáveis do estudo. Os grupos foram semelhantes em relação às médias de idade ($p = 0,684$), níveis plasmáticos de colesterol total ($p = 0,481$), LDL-colesterol ($p = 0,143$), apo A-I ($p = 0,898$) e apo B ($p = 0,606$).

Houve diferença estatisticamente significativa em relação às médias de HDL-colesterol (com valores de 45 ± 10 mg/dL nos obesos e 58 ± 17 mg/dL no grupo controle; $p = 0,043$), VLDL-colesterol (29 ± 7 mg/dL nos obesos e 21 ± 10 mg/dL no grupo controle; $p = 0,043$) e triglicérides (144 ± 32 mg/dL para os obesos e 101 ± 45 mg/dL no grupo controle; $p = 0,019$).

Tabela 2. Análise descritiva das variáveis de estudo, segundo grupo

Variável	Grupo		P
	Obesos (n =10) média \pm DP	Controles (n =10) média \pm DP	
Idade (anos)	44 ± 10	46 ± 12	0,684
IMC (Kg/m ²)	48 ± 5	22 ± 3	<0,001
Colesterol total (mg/dL)	199 ± 32	186 ± 23	0,481
HDL-c (mg/dL)	45 ± 10	58 ± 17	0,043
VLDL-c (mg/dL)	29 ± 7	21 ± 10	0,043
LDL-c (mg/dL)	125 ± 30	106 ± 21	0,143
Triglicérides (mg/dL)	144 ± 32	101 ± 45	0,019
Apo A-I (g/L)	$1,34 \pm 0,20$ (n= 9)	$1,39 \pm 0,27$ (n= 5)	0,898
Apo B (g/L)	$0,80 \pm 0,22$ (n= 9)	$0,90 \pm 0,21$ (n= 5)	0,606

DP = desvio padrão

IMC = índice de massa corpórea; CT = colesterol total; HDL-c = colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-c = colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; LDL-c = colesterol da lipoproteína de baixa densidade; Apo = apolipoproteína

▪ **Comparação das taxas fracionais de remoção entre os grupos**

Na tabela 3, são expressas as taxas fracionais de remoção (TFR) da LDE marcada. A TFR dos triglicérides da emulsão foi significativamente menor no grupo dos obesos grau III, quando comparados aos controles [$0,086 \pm 0,044$ (h^{-1}) nos obesos e $0,122 \pm 0,026$ (h^{-1}) nos controles; $p = 0,040$]. Já a TFR de remoção de colesterol éster não apresentou diferença entre os grupos [$0,052 \pm 0,021$ (h^{-1}) nos obesos e $0,058 \pm 0,015$ (h^{-1}) no grupo controle; $p = 0,971$], evidenciando que, no grupo dos obesos a remoção do colesterol éster da emulsão ocorreu de maneira semelhante aos controles, apesar da grande diferença de peso.

Tabela 3. Estatística descritiva da taxa fracional de remoção de TG-³H e CE -¹⁴C da emulsão, segundo grupo

	Grupo (n)		P
	Obeso média \pm DP (n = 9)	Controle média \pm DP (n = 9)	
TFR-TG (h^{-1})	$0,086 \pm 0,044$ (n = 9)	$0,122 \pm 0,026$ (n = 9)	0,040
TFR-CE (h^{-1})	$0,052 \pm 0,021$ (n = 10)	$0,058 \pm 0,015$ (n = 10)	0,971

DP = desvio padrão

TFR-TG (h^{-1}): taxa fracional de remoção de triglicérides

TFR-CE (h^{-1}): taxa fracional de remoção de colesterol éster

As figuras 1 e 2 apresentam as curvas de remoção plasmática de triglicérides ($^3\text{H-TG}$) e colesterol éster ($^{14}\text{C-CE}$) da emulsão LDE.

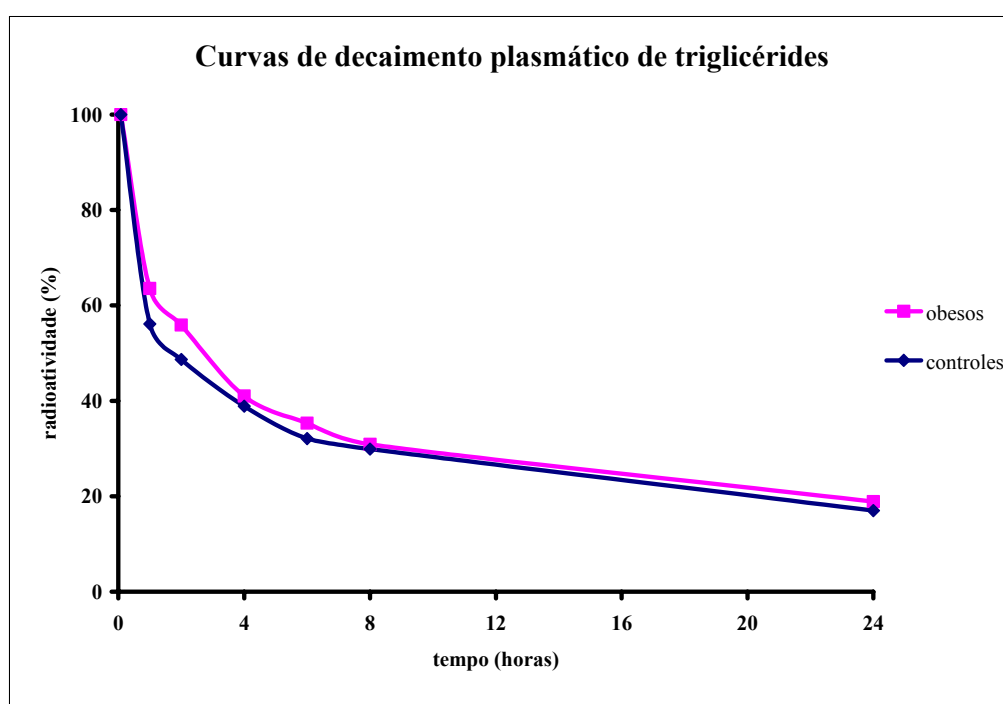


Figura 1. Curvas de remoção plasmática de triglicérides marcados com ^3H da emulsão, nos grupos obeso e controle

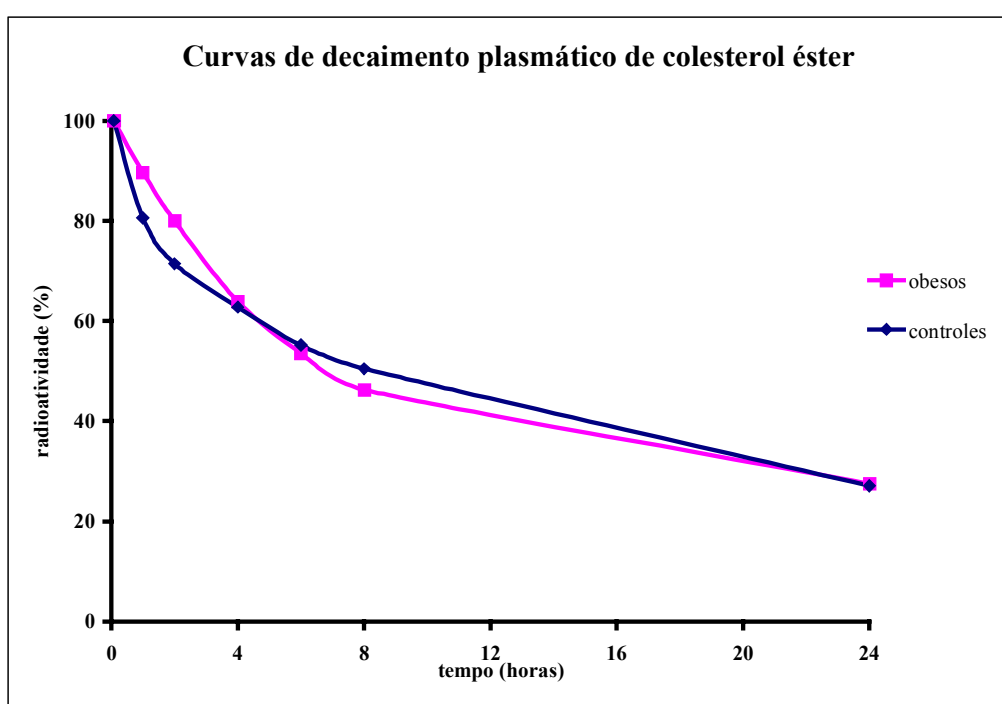


Figura 2. Curvas de remoção plasmática do colesterol éster marcado com ^{14}C da emulsão, nos grupos obeso e controle

DISCUSSÃO

Os estudos iniciais sobre o metabolismo de lípidos utilizavam lipoproteínas autólogas, ou seja, provenientes do próprio paciente, as quais tornavam os procedimentos, do ponto de vista prático, mais trabalhosos e caros, além de apresentarem risco de contaminação na sua manipulação.

Em 1993, Maranhão *et al.* desenvolveram em laboratório uma partícula artificial chamada LDE, que apresentava uma parte lipídica semelhante à parte lipídica da LDL, mas sem sua parte protéica. Desde então, a LDE tem sido utilizada em uma série de estudos, proporcionando informações sobre aspectos dinâmicos do metabolismo da LDL (MARANHÃO *et al.*, 1997; PINTO *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2003; PUK *et al.*, 2004). Pode-se empregar essa emulsão em um número maior de pessoas, tornando o procedimento mais fácil e seguro e, dessa forma, facilitando o estudo da cinética plasmática do colesterol.

A obesidade é uma doença que envolve alterações metabólicas, incluindo modificações no perfil lipídico. Estudos abordando alguns aspectos do metabolismo nesses pacientes já foram realizados, mas nenhum deles envolvendo a remoção de LDL em indivíduos com IMC acima de 40 Kg/m².

Na avaliação do metabolismo da emulsão LDE, estuda-se o transporte endógeno das lipoproteínas que se inicia com a VLDL hepática, originando a LDL e, diferentemente dos quilomícrons, sua síntese não depende da ingestão e absorção alimentar gordurosa. Em nosso trabalho, estudamos uma população com obesidade grau III, todos com IMC acima de 40 Kg/m², utilizando a LDE marcada radioativamente com colesterol éster e triglicérides. A taxa fracional

de remoção dos triglicérides da emulsão apresentaram remoção mais lenta no grupo obeso quando comparado ao grupo controle. Porém a remoção de colesterol éster da emulsão foi semelhante nos dois grupos.

Em estudo realizado em mulheres obesas grau I e II com IMC entre 30 a 40 Kg/m², foi observado menor remoção plasmática de triglicérides de quilomícrons artificiais após um período de dieta de 2 meses, possivelmente devido a mudanças adaptativas na atividade da LLp, secundárias a perda de peso. No período prévio a dieta, a lipólise de triglicérides foi maior nas obesas (OLIVEIRA *et al.*, 2002), presumivelmente devido a maior insulinemia e maior síntese de LLp (OLIVECRONA *et al.*, 1995), justificando a taxa de remoção fracional igual nos dois grupos.

Nossos resultados mostram menor taxa de remoção de triglicérides da LDE em obesos, sugerindo menor atividade lipolítica, podendo haver relação com os níveis plasmáticos aumentados de VLDL-c encontrados.

POTTS *et al.* (1995) também demonstraram remoção plasmática mais lenta de triglicérides em indivíduos obesos com IMC entre 32-56 Kg/m², utilizando uma emulsão artificial de quilomícrons, os quais são lipoproteínas ricas em triglicérides produzidas após ingestão e absorção de gorduras. A emulsão que utilizamos neste trabalho, LDE, é constituída principalmente de colesterol e pequena quantidade de triglicérides e, mimetiza a LDL, que é uma Lp sintetizada no fígado e metabolizada por uma via diferente da via dos Qm. Os obesos incluídos no nosso trabalho foram semelhantes ao grupo controle em relação aos níveis plasmáticos de colesterol total, LDL-colesterol, mas

diferiram em relação às concentrações de HDL-colesterol, VLDL-colesterol e triglicérides. A remoção do colesterol éster foi similar nos dois grupos, apesar da grande diferença de peso entre os controles e obesos. Quanto à atividade lipolítica, esta foi menor nos obesos, com conseqüente atraso na remoção de triglicérides, embora não possamos afirmar exatamente quais fatores relacionados à obesidade exerceram maior influência. Apesar das concentrações de triglicérides estarem mais altas nesse grupo, todos os seus integrantes apresentavam níveis plasmáticos abaixo de 200 mg/dL, que até o momento, é um valor considerado limítrofe, de acordo com as III Diretrizes sobre Dislipidemia, da Sociedade Brasileira de Cardiologia de 2001.

Sabemos que o *clearance* de triglicérides é primariamente um reflexo da sua hidrólise e, em menor extensão, da captação das lipoproteínas pelas vias de alta afinidade, porém ainda é bastante controverso se a capacidade hidrolítica está aumentada ou diminuída nos obesos (ZERBINATTI *et al.*, 1991). Acredita-se que a relação entre dislipidemia e obesidade abdominal seja mediada por um mecanismo etiopatogênico independente dos outros fatores de risco conhecidos, visto que a gordura intra-abdominal tem um metabolismo ativo particular (KROTKIEWSKI *et al.*, 1983). Algumas variáveis, como diferenças metodológicas e coletas realizadas em diferentes locais de tecido adiposo, poderiam contribuir para esses resultados discordantes (TASKINEN *et al.*, 1982).

Chan *et al.* (2002) avaliando a remoção de partículas remanescentes ricas em triglicérides, em indivíduos com obesidade visceral com IMC de

29-37 Kg/m², encontraram taxa de remoção de remanescentes, significativamente menor nos obesos que entre os controles. Foi sugerido alteração no processo lipolítico e no *clearance*, levando a menor catabolização dessas partículas,

Ainda não está claro se na obesidade, um defeito na secreção, na hidrólise ou na captação da partícula seja responsável pela hipertrigliceridemia e qual lipoproteína contribui mais significativamente. Há evidências paradoxais sugerindo que o defeito é primariamente central, conseqüente à hipersecreção de VLDL em resposta ao aumento no suprimento do substrato (COUILLARD *et al.*, 1998; LEWIS *et al.*, 1990). Alterações nos níveis plasmáticos de LDL-c relacionados à obesidade são controversas (DENKE *et al.*, 1994; SEIDELL *et al.*, 1990).

Embora seja sugerido que o peso exerça influência sobre o colesterol (MILLER *et al.*, 1958), deve-se levar em consideração algumas variáveis como idade, sexo, etnia e condição sócio-econômica (MICOZZI *et al.*, 1989; MAJERONI *et al.*, 1992), além do fator genético.

De acordo com DIETZ (1989) e outros investigadores (ANGELIN *et al.*, 1982; STAHLBERG *et al.*, 1997; MCCUNE *et al.*, 1987) há elevada síntese de colesterol nas células hepáticas de ratos magros e obesos e em humanos obesos. Embora o fígado seja o principal órgão responsável pela síntese do colesterol, o tecido adiposo também pode sintetizá-lo, porém de forma limitada, levando-nos a acreditar que o excesso de colesterol encontrado em obesos possa ser de origem hepática (SCHREIBMAN *et al.*, 1975)

Apesar da existência de trabalhos relacionados ao metabolismo de lípidos em obesos, não existe, até o momento, nenhum outro estudo avaliando o comportamento metabólico da LDL na obesidade grau III. Este é um trabalho pioneiro, que levantou questionamentos sobre alguns aspectos do metabolismo lipídico na obesidade, relacionados à hipercolesterolemia, *diabetes mellitus* e atividade da lipase lipoprotéica. Essas dúvidas devem ser respondidas em protocolos apropriados, alguns dos quais já estão em andamento.

CONCLUSÕES

A remoção de triglicérides marcados com trício, expressa pela taxa fracional de remoção da emulsão LDE, foi menor no grupo obesidade grau III quando comparada ao grupo controle. Porém, a taxa fracional de remoção de colesterol éster marcado com carbono 14 foi semelhante em ambos os grupos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alpert MA. Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of the clinical syndrome. *Am J Med Sci* 2001;321:225-36.

Angelin B, Backman L, Einarsson K, Eriksson L, Ewerth S. Hepatic cholesterol metabolism in obesity: activity of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Lipid Res* 1982;23:770-3.

Bachorik PS, Rifkind BM, Kwiterovich PO. Lipídeos e dislipoproteinemias. In: Henry JB. *Diagnósticos clínicos e tratamentos por métodos laboratoriais*. 2ed. São Paulo: Manole; 1999.

Bartlett SM, Gibbons GF. Short- and longer-term regulation of very-low-density lipoprotein secretion by insulin, dexamethasone and lipogenic substrates in cultured hepatocytes. A biphasic effect of insulin. *Biochem J* 1988;249:37-43.

Bourdages H, Goldenberg F, Nguyen P, Buchwald H. Improvement in obesity-associated medical conditions following vertical banded gastroplasty and gastrointestinal bypass. *Obes Surg* 1994;4:227-231.

Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232:34-47.

Brown MS; Kovanen PT; Goldstein JL. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* 1981;212:628-35.

Brunzell JD, Hazzard WR, Porte D Jr, Bierman EL. Evidence for a common, saturable, triglyceride removal mechanism for chylomicrons and very low density lipoproteins in man. *J Clin Invest* 1973;52:1578-85.

Calle EE, Thun MJ, Petrelli JM, Rodriguez C, Heath CW Jr. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 1999;341:1097-105.

Casassus P, Fontbonne A, Thibault N, Ducimetiere P, Richard JL, Claude JR, Warnet JM, Rosselin G, Eschwege E. Upper body fat distribution: a hyperinsulinemia-independent predictor of coronary heart mortality- the Paris Prospective Study. *Arterioscler Thromb* 1992;2:1387-1392.

Chan DC, Watts GF, Barrett PH, Mamo JC, Redgrave TG. Markers of triglyceride-rich lipoprotein remnant metabolism in visceral obesity. *Clin Chem* 2002;48:217-9.

Chapman JM, Coulson AH, Clark VA, Borun ER. The differential effect of serum cholesterol, blood pressure and weight on the incidence of myocardial infarction and angina pectoris. *J Chronic Dis* 1971;23:631-45.

Chapman MJ, Goldstein S, Lagrange D, Laplaud PM. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res* 1981;22:260-6.

Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) - Diretrizes básicas de radioproteção. São Paulo, 1988. [Norma 3.01]

Coppack SW, Evans RD, Fisher RM, Frayn KN, Gibbons GF, Humphreys SM, Kirk ML, Potts JL, Hockaday TD. Adipose tissue metabolism in obesity: lipase action in vivo before and after a mixed meal. *Metabolism* 1992;41:264-72.

Couillard C, Bergeron N, Prud'homme D, Bergeron J, Tremblay A, Bouchard C, Mauriège P, Després JP. Postprandial triglyceride response in visceral obesity in men. *Diabetes* 1998;47:953-60.

Dattilo AM, Kris-Etherton PM. Effects of weight reduction on blood lipids and lipoproteins: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 1992;56:320-8.

Denke MA, Sempos CT, Grundy SM. Excess body weight. An under-recognized contributor to dyslipidemia in White American women. *Arch Intern Med* 1994;154:401-10.

Deurenberg P, Yap M. The assessment of obesity: methods for measuring body fat and global prevalence of obesity. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 1999;1:1-11.

Dietz WH. Obesity. *J Am Coll Nutr* 1989;8:13S-21S.

III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemia e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia 2001;77(supl.):1-48.

- Dorn JM, Schisterman EF, Winkelstein W JR, Trevisan M. Body mass index and mortality in a general population sample of men and women. The Buffalo Heart Study. *Am J Epidemiol* 1997;146:919-31.
- Dullaart RP, Sluiter WJ, Dikkeschei LD, Hoogenberg K, Van Tol A. Effect of adiposity on plasma lipid transfer protein activities: a possible link between insulin resistance and high density lipoprotein metabolism. *Eur J Clin Invest* 1994;24:88-94.
- Eisenberg S. High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res* 1984;25:1017-58.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DD. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin chem* 1972;18:499-502.
- Gibbons GF. Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem J* 1990;268:1-13.
- Ginsburg GS, Small DM, Atkinson D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low-density lipoprotein. *J Biol Chem* 1982;257:8216-8227.
- Glomset JA. The metabolic role of lecithin: cholesterol acyltransferase: perspectives from pathology. *Adv Lipid Res* 1973;11:1-65.
- Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *Lipid Res* 1996;37:693-707.

- Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor and the regulation of cellular cholesterol metabolism. *J Cell Sci* 1985;3:131-7.
- Havel RJ. The formation of LDL: mechanisms and regulation. *J Lipid Res* 1984;25:1570-76.
- Havel RJ, Hamilton RL. Hepatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. *Hepatology* 1988;8:1689-704.
- Hirata RD, Hirata MH, Mesquita CH, Cesar TB, Maranhão RC. Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsion model in rats. *Biochem Biophys Acta* 1999;1439:53-62.
- Howard BV. Insulin resistance and lipid metabolism. *Am J Cardiol* 1999;84:28J-32J.
- Hubert HB, Feinleib M, Mcnamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham heart study. *Circulation* 1983;67:968-77.
- Jahr H, Ratzmann KP, Beckert R, Besch W, Hahn HJ. Enhanced synthesis, storage, and secretion of insulin in pancreatic islet derived from obese subjects. *Metabolism* 1983;32:1101-6.
- Jebb SA, Elia M. Techniques for the measurement of body composition: a practical guide. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1993;17:611-21.

- Kane JP, Hardman DA, Paulus HE. Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:2465-9.
- Kannel WB, Wilson PW, Nam BH, D'Agostino RB. Risk stratification of obesity as a coronary risk factor. *Am J Cardiol.* 2002;90:697-701.
- Keys A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Taylor HL. Indices of relative weight and obesity. *J Chronic Dis* 1972;25:329-43.
- Kissebah AH, Alfarsi S, Evans DJ, Adams PW. Integrated regulation of very low density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein-B kinetics in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1982;31:217-25.
- Kovanen PT, Bilheimer DW, Goldstein JL, Jaramillo JJ, Brown MS. Regulatory role for hepatic low density lipoprotein receptors in vivo in the dog. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:1194-8.
- Krauss RM, Herbert PN, Levy RI, Fredrickson DS. Further observations on the activation and inhibition of lipoprotein lipase by apolipoproteins. *Circ Res* 1973;33:403-11.
- Krieger M, Brown MS, Faust JR, Goldstein JL. Replacement of endogenous cholesteryl esters of low density lipoprotein with exogenous cholesteryl linoleate. Reconstitution of a biologically active lipoprotein particle. *J Biol Chem* 1978;253:4093-101.

- Krotkiewski M, Bjorntorp P, Sjostrom L, Smith U. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest* 1983;72(3):1150-62.
- Kwiterovich Jr PO. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. *Am J Cardiol* 2000;86:5L-10L.
- Laakso M, Sarlund H, Mykkanen L. Insulin resistance is associated with lipid and lipoprotein abnormalities in subjects with varying degrees of glucose tolerance. *Arteriosclerosis* 1990;10:223-31.
- Lamon-Fava S, Wilson PW, Schaefer EJ. Impact of body mass index on coronary heart disease risk factors in men and women. The Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:509-15.
- Lewis GF, O'meara NM, Soltys PA, Blackman JD, Iverius PH, Druetzler AF, Getz GS, Polonsky KS. Postprandial lipoprotein metabolism in normal and obese subjects: comparison after the vitamin A fat-loading test. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:041-50.
- Leong KS, Wilding JP. Obesity and diabetes. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 1999;13:221-37.
- Lee DM, Alaupovic P. Physicochemical properties of low-density lipoproteins of normal human plasma. Evidence for the occurrence of lipoprotein B in associated and free forms. *Biochem J* 1974;137:155-67.

Lee DM, Alaupovic P. Studies of the composition and structure of plasma lipoproteins. Isolation, composition, and immunochemical characterization of low density lipoprotein subfractions of human plasma. *Biochemistry* 1970;9:2244-52.

Majeroni BA, Smallen G, Crawford ME. Body mass and weight as indicators for cholesterol screening. *J Fam Pract* 1992;35:537-9.

Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Monson RR, Speizer FE, Hennekens CH. A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1990;322:882-9.

Maranhão RC, Cesar TB, Pedroso-Mariani SR, Hirata MH, Mesquita CH. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids* 1993;28:691-6.

Maranhão RC, Roland IA, Toffoletto O, Ramires JA, Gonçalves, RP, Pileggi F. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to LDL receptors. *Lipids* 1997;32:627-33.

Mccune SA, Jurin RR. Effect of mevinolin on cholesterol metabolism in obese and lean Zucker rats. *Biochem Pharmacol* 1987;36:875-9.

Mesquita CH. Cinética do quilomícron marcado com $^3\text{H-TG}$ e $^{14}\text{C-CE}$. Análise compartimental auxiliar. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), 1994.

- Micozzi MS, Albanes D, Stevens RG. Relation of body size and composition to clinical biochemical and hematologic indices in US men and women. *Am J Clin Nutr* 1989;50:1276-81.
- Miller DC, Trulson MF, Mccann MB, White PD, Stare FJ. Diet, blood lipids and health of Italian men in Boston. *Ann Intern Med* 1958;49:1178-200.
- Monteiro CA, Conde WL. Tendência secular da obesidade segundo estratos sociais: Nordeste e Sudeste do Brasil 1975-1989-1997. *Arq Bras End e Metabologia* 1999;43:186-194
- Morton RE, Zilversmit DB. Purification and characterization of lipid transfer protein(s) from human lipoprotein-deficient plasma. *J Lipid Res* 1982;23:1058-67.
- Musliner TA, Herbert PN, Kingston MJ. Lipoprotein substrates of lipoprotein lipase and hepatic triacylglycerol lipase from human post-heparin plasma. *Biochim Biophys Acta* 1979;575:277-88.
- Nikkila EA, Huttunen JK, Ehnholm C. Postheparin plasma lipoprotein lipase and hepatic lipase in diabetes mellitus. Relationship to plasma triglyceride metabolism. *Diabetes* 1977;26:11-21.
- Oliveira MR, Maranhão RC. Plasma kinetics of a chylomicron-like emulsion in normolipidemic obese women after a short-period weight loss by energy-restricted diet. *Metabolism* 2002;51:1097-103.

Olivecrona T, Bergh M, Hultin M, Olivecrona G. Nutritional regulation of lipoprotein lipase. *Can J Cardiol* 1995;11:73G-78G.

Ong JM, Kern PA. Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue. *J Clin Invest* 1989;84:305-11.

Pinto LB, Wajngarten M, Silva EL, Vinagre CC, Maranhao RC. Plasma kinetics of a cholesterol-rich emulsion in young, middle-aged, and elderly subjects. *Lipids* 2001;36:1307-11.

Potts JL, Coppack SW, Fisher RM, Humphreys SM, Gibbons GF, Frayn KN. Impaired postprandial clearance of triacylglycerol-rich lipoproteins in adipose tissue in obese subjects. *Am J Physiol* 1995;268:E588-94.

Potts JL, Fisher RM, Humphreys SM, Coppack SW, Gibbons GF, Frayn KN. Peripheral triacylglycerol extraction in the fasting and post-prandial states. *Clin Sci (Lond)* 1991;81:621-6.

Puk C, Vinagre CG, Bocchi E, Bacal F, Stolf N, Maranhao RC. Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion in patients submitted to heart transplantation. *Transplantation* 2004;78:1177-81.

Rabkin SW, Mathewson FA, Hsu PH. Relation of body weight to development of ischemic heart disease in a cohort of young North American men after a 26 year of observation period: the Manitoba Study. *Am J Cardiol* 1977;39(3):452-8.

- Sadur CN, Eckel RH. Insulin stimulation of adipose tissue lipoprotein lipase. Use of the euglycemic clamp technique. *J Clin Invest* 1982;69:1119-25.
- Santos RD, Hueb W, Oliveira AA, Ramires JA, Maranhao RC. Plasma kinetics of a cholesterol-rich emulsion in subjects with or without coronary artery disease. *J Lipid Res* 2003;44:464-9.
- Schreibman PH, Dell RB. Human adipocyte cholesterol. Concentration, localization, synthesis, and turnover. *Clin Invest* 1975;55:986-93.
- Schaefer EJ, Eisenberg S, Levy RI. Lipoprotein apoprotein metabolism. *J Lipid Res* 1978;19:667-87.
- Schaefer EJ, Zech LA, Jenkins LL, Bronzert TJ, Rubalcaba EA, Lindgren FT, Amodt RL, Brewer JR. Human apolipoprotein A-I and A-II metabolism. *J Lipid Res* 1982;23:850-62.
- Seidell JC, Cigolini M, Charzewska J, Ellsinger BM, Di Biase G. Fat distribution in European women: a comparison of anthropometric measurements in relation to cardiovascular risk factors. *Int J Epidemiol* 1990;19:303-8.
- Sjostrom L, Rissanen A, Andersen T, Boldrin M, Golay A, Koppeschaar HP, Krempf M. Randomised placebo-controlled trial of orlistat for weight loss and prevention of weight regain in obese patients. European Multicentre Orlistat Study Group. *Lancet*. 1998;352:167-72.

- Smith EM. Dose estimate techniques. In: Nuclear medicine physics, instrumentation and agents. Saint Louis - Mosby, 1977.
- Soutar AK, Myant NB, Thompson GR. Simultaneous measurement of apolipoprotein B turnover in very-low-and low-density lipoproteins in familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 1977;28:247-56.
- Sowby FS. Radiation protection. ICRP publication 30. part I. Limits for intakes of radionuclides by workers. In: Sowby FS. Oxford: Pergamon; 1984.
- Su HY, Sheu WH, Chin HM, Jeng CY, Chen YD, Reaven GM. Effect of weight loss on blood pressure and insulin resistance in normotensive and hypertensive obese individuals. *Am J Hypertens* 1995;8:1067-71.
- Stahlberg D, Rudling M, Angelin B, Bjorkhem I, Forsell P, Nilsell K, Einarsson K. Hepatic cholesterol metabolism in human obesity. *Hepatology* 1997;25:1447-50.
- Vague J. La différenciation sexuelle, facteur déterminant des formes de l'obésité. *Presse Med* 1947;30:339-40.
- Van Itallie TB. Heart implications of overweight and obesity in the United States. *Ann Intern Med* 1985;103:983-8.
- Vilaro S, Llobera M, Bengtsson-Olivecrona G, Olivecrona T. Synthesis of lipoprotein lipase in the liver of newborn rats and localization of the enzyme by immunofluorescence. *Biochem J* 1988;249:549-56.

Zarich SW, Kowalchuk GJ, McGuire MP, Benotti PN, Mascioli EA, Nesto RW. Left ventricular filling abnormalities in asymptomatic morbid obesity. *Am J Cardiol* 1991;68:377-81.

Zerbinatti CV, Oliveira HC, Wechesler S, Quintao EC. Independent regulation of chylomicron lipolysis and particle removal rates: effects of insulin and thyroid hormones on the metabolism of artificial chylomicrons. *Metabolism* 1991;40:1122-7.

Taskinen MR, Nikkila EA, Kuusi T, Harmo K. Lipoprotein lipase activity and serum lipoproteins in untreated type 2 (insulin-independent) diabetes associated with obesity. *Diabetologia* 1982;22:46-50.

The Expert Panel II. Summary of the second report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. *JAMA* 1993;269:3015-23.

World Health Organization .Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report on a WHO Consultation on Obesity. Geneve, 3-5 June 1997.WHO/NUT/NCD/98.1

APÊNDICES

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Avaliação do metabolismo de uma emulsão lipídica rica em colesterol em pacientes com obesidade grau III**

2. PESQUISADOR: Barbara Maria Ianni CARGO/ FUNÇÃO: médica assistente /orientadora
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 34.123

UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade Clínica de Cardiopatias Gerais

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 11 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa ; 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; 3. desconfortos e riscos esperados; 4. benefícios que poderão ser obtidos; 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

1. O Sr (a) vai participar de um estudo que avalia o funcionamento do colesterol e das gorduras que estão presentes dentro do corpo e a capacidade do corpo de tirar essas gorduras do sangue. Nós chamamos isto de metabolismo de lípides.

2. Para fazer essa avaliação será usada uma técnica (injeção de emulsão na circulação) já utilizada em avaliações anteriores em centenas de pacientes. É como se colocasse um remédio na veia quando se está com dor e chama-se de emulsão lipídica artificial, que é um líquido contendo lípidos com taxa de radioatividade 10 vezes menor que a de uma radiografia do pulmão. Não há risco para a saúde.

(Para pacientes do sexo feminino: precisamos saber se a sra ainda “menstrua” e se faz uso de alguma proteção contra gravidez. É necessário fazer exame de gravidez na urina, para afastar qualquer possibilidade de estar grávida e, se o resultado for positivo na urina, será necessário fazer o exame de sangue. Caso se confirme gravidez a sra não poderá ser incluída no estudo).

O Sr (a) vai dormir no hospital no dia anterior ao exame e deverá chegar por volta de 18 horas. No dia do exame serão feitas nove coletas de amostras de sangue. Nesse dia o Sr (a) dormirá novamente no hospital para fazer a última coleta no dia seguinte.

a) Para se coletar o sangue é preciso pegar 1 veia do braço, da mesma forma que se colhe sangue em qualquer laboratório

b) Após isto, será injetada a emulsão e serão colhidas novas amostras (6,0 mL), em intervalos de tempo pré-estabelecidos (após 5 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas). Como será necessário coletar pequenas quantidades de sangue várias vezes no decorrer do dia, se o Sr (a) preferir, pode-se deixar um soro na veia para evitar colocar uma agulha no braço todas às vezes.

3. O desconforto é o de coletar sangue várias vezes.

4. Este exame é importante para se avaliar como essas substâncias (gorduras) circulam no seu corpo e se há alteração no funcionamento das gorduras causada pela obesidade.

5. Os exames propostos podem fornecer informações importantes para se avaliar o metabolismo da gordura sem colocar em risco à saúde ou a vida de cada pessoa

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

**V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS
RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO
EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS**

Dra. Simone Alves Dantas

Unidade Clínica de Cardiopatias Gerais – Instituto do Coração – HCFMUSP
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 - CEP 05403-900 fone: (11) 3069-5057
fax: (11) 3069-5346

Dra. Barbara Maria ianni

Unidade Clínica de Cardiopatias Gerais – Instituto do Coração – HCFMUSP
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 - CEP 05403-900 fone: (11) 3069-5057 fax: (11) 3069-5346

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 20 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO

(Resolução Conselho Nacional de Saúde 196, de 10 outubro 1996)

1. Este termo conterà o registro das informações que o pesquisador fornecerá ao sujeito da pesquisa, em linguagem clara e acessível, evitando-se vocábulos técnicos não compatíveis com o grau de conhecimento do interlocutor.
2. A avaliação do grau de risco deve ser minuciosa, levando em conta qualquer possibilidade de intervenção e de dano à integridade física do sujeito da pesquisa.
3. O formulário poderá ser preenchido em letra de forma legível, datilografia ou meios eletrônicos.
4. Este termo deverá ser elaborado em duas vias, ficando uma via em poder do paciente ou seu representante legal e outra deverá ser juntada ao prontuário do paciente.
5. A via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido submetida à análise da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq deverá ser idêntica àquela que será fornecida ao sujeito da pesquisa.

GRUPO OBESIDADE GRAU III

Nome	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	Glicemia (mg/dL)	Insulina (μUI/mL)	Colesterol (mg/dL)	HDL (mg/dL)	VLDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	TG (mg/dL)	apo A-I (g/L)	apo B (g/L)	TFR-TG (h ⁻¹)	TFR-CE (h ⁻¹)
ACR	M	40	127	1,62	48,39	89	10,4	198	28	37	133	183	1,00	1,06	0,0808	0,0705
UF	M	39	168	1,73	56,13	107	48,6	222	35	19	168	95	1,12	1,15	0,1111	0,0526
EJH	M	63	117	1,61	45,25	100	16,1	182	36	28	118	138	-	-	0,0007	0,0006
MPP	F	40	113	1,52	48,78	95	30	179	53	26	100	132	1,60	0,71	0,0885	0,071
RVN	F	40	134	1,58	53,68	129	11,9	194	47	29	118	147	1,32	0,75	0,0796	0,0599
MCSJ	F	35	130	1,58	52,07	98	18,4	137	48	19	70	94	1,24	0,47	-	0,0428
MJGS	F	51	98	1,53	41,86	133	12,2	209	52	39	118	193	1,43	0,65	0,0647	0,0462
SLASAP	F	33	120	1,64	44,62	83	10,6	219	43	32	144	160	1,34	0,75	0,0839	0,0476
ANG	F	50	116	1,55	48,28	100	12,9	260	63	29	168	144	1,63	0,97	0,091	0,067
CARS	F	54	102	1,54	43,09	88	8,8	192	49	31	112	155	1,40	0,66	0,171	0,0606

GRUPO CONTROLE

Nome	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	TG (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	VLDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)	TFR-TG (h ⁻¹)	TFR-CE (h ⁻¹)
BFR	M	44	72,3	1,82	21,83	135	163	35	104	24	0,137	0,051
ESF	F	26	64	1,83	19,11	108	189	22	100	67	0,145	0,0484
EN	M	50	76	1,74	25,10	107	195	21	113	61	0,1659	0,0603
EF	M	61	73	1,71	24,96	197	163	39	80	44	0,1229	0,056
IFTS	F	58	52,9	1,48	24,15	83	212	17	119	76	0,106	0,055
JAS	F	32	45,2	1,52	19,56	51	202	10	105	82	0,0728	0,0566
MCGP	F	52	52	1,5	23,11	123	211	25	131	55	-	0,0976
MAGS	M	37	82,4	1,87	23,56	82	199	16	131	52	0,1261	0,0529
SRS	F	42	58,5	1,64	21,75	39	141	8	66	67	0,111	0,06
ZPS	F	58	45	1,58	18,03	86	184	17	115	52	0,1108	0,0394