



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

EDITE VIEIRA SILVA DE CAMPOS

**INFLUÊNCIA DOS MARCADORES SÉRICOS DE SÍNTESE E ABSORÇÃO DE
COLESTEROL SOBRE A ATEROSCLEROSE SUBCLÍNICA
EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

**INFLUENCE OF SERUM MARKERS OF CHOLESTEROL SYNTHESIS AND
ABSORPTION ON SUBCLINICAL ATHEROSCLEROSIS
IN HEALTHY INDIVIDUALS**

CAMPINAS

2021

EDITE VIEIRA SILVA DE CAMPOS

**INFLUÊNCIA DOS MARCADORES SÉRICOS DE SÍNTESE E ABSORÇÃO DE
COLESTEROL SOBRE A ATEROSCLEROSE SUBCLÍNICA EM INDIVÍDUOS
SAUDÁVEIS**

**INFLUENCE OF SERUM MARKERS OF CHOLESTEROL SYNTHESIS AND
ABSORPTION ON SUBCLINICAL ATHEROSCLEROSIS IN HEALTHY
INDIVIDUALS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, na área de Clínica Médica.

Dissertation presented to the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas as part of the requirements for obtaining the title of Master of Science, in the area of Clinical Medicine.

ORIENTADORA: ELIANA COTTA DE FARIA

COORIENTADORA: VANESSA HELENA DE SOUZA ZAGO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA EDITE VIEIRA SILVA DE CAMPOS E ORIENTADA PELA
PROF(A). DR.(A) ELIANA COTTA DE FARIA

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C157i Campos, Edite Vieira Silva de, 1984-
Influência dos marcadores séricos de síntese e absorção de colesterol sobre a aterosclerose subclínica em indivíduos saudáveis / Edite Vieira Silva de Campos. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Eliana Cotta de Faria.
Coorientador: Vanessa Helena de Souza Zago.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Aterosclerose carotídea. 2. Espessura íntima-media carotídea. 3. Absorção intestinal. 4. Fitoesteróis. I. de Faria, Eliana Cotta, 1950-. II. Zago, Vanessa Helena de Souza, 1984-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Influence of serum markers of cholesterol and absorption on subclinical atherosclerosis in healthy individuals

Palavras-chave em inglês:

Carotid atherosclerosis
Carotid intima-media thickness
Intestinal absorption
Phytosterols

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Vanessa Helena de Souza Zago [Coorientador]
Gabriel de Gabriel Taffarello Dorighello
Adriana Machado Saldiba de Lima

Data de defesa: 26-11-2020

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

• ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-9412-7028>
• Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7825730161524649>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

EDITE VIEIRA SILVA DE CAMPOS

ORIENTADORA: PROF^a. DRA. ELIANA COTTA DE FARIA

COORIENTADORA: PROF^a. DRA. VANESSA HELENA DE SOUZA ZAGO

MEMBROS TITULARES:

1. PROF. DRA. VANESSA HELENA DE SOUZA ZAGO

2. PROF. DR. GABRIEL DE GABRIEL TAFFARELLO DORIGHELLO

3. PROF. DRA. ADRIANA MACHADO SALDIBA DE LIMA

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 26/11/2020

Dedico de coração à minha família que, mesmo longe, me deu todo o apoio para terminar este trabalho e amor incondicional durante toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Eliana Cotta de Faria, pela oportunidade, pela confiança na minha capacidade e por todos os ensinamentos.

À minha coorientadora, Dra. Vanessa Helena de Souza Zago, pela dedicação e apoio no momento mais preciso.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Dra. Valéria Sutti Nunes, pela oportunidade, apoio incondicional e pela parceria, por me ensinar grande parte do que sei sobre as metodologias utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.

À Érica Ivana Lazaro Gomes que, desde os meus primeiros dias de laboratório, me tratou com carinho e sempre se empenhou em promover a harmonia das relações pessoais e a união do grupo.

Ao meu amigo Victor França pela amizade, paciência, convivência, confiança e lembrando-me sempre que temos um ao lado do outro nesta caminhada e por todo o apoio nos momentos difíceis. O mestrado foi muito mais feliz com você por perto.

À Jaqueline Gonçalves minha grande amiga, obrigada por tudo, estaremos juntas sempre.

A todos os meus colegas do Laboratório de Lípidos e do Departamento de Patologia Clínica, que durante estes três anos ou mais de estudo, estiveram, em algum momento, ao meu lado: Victor, Jaqueline, Welington, Liriam, Gabriele, Raissa, Ariane, Carminha, Paulinho, Fábio e Bruna. Obrigada por tornarem a rotina do mestrado leve e divertida.

Às amigas Sheila Menegatti e Cibele Cristina Fernandes, pela amizade longa e sincera. À minha irmã Aline que, mesmo distante, sempre acompanhou meus passos e torceu por mim. Aos meus pais, Heleniusa e José Adão, pelos valores que me ensinaram e pelo apoio e incentivo em todas as minhas escolhas. Palavras não são suficientes para expressar minha gratidão e meu amor por vocês.

Ao meu namorado Ângelo Miguel, que nestes sete anos de vida em comum, foi meu companheiro e meu maior incentivador. Obrigada pelo amor e pela paciência, pela gentileza e pelo bom humor, enfim, obrigada por fazer parte da minha vida.

À Deus por ter me apoiado nos momentos mais difíceis, por estar lá sempre que precisei e até quando não precisei, obrigada por tudo principalmente por ensinar-me a acreditar em mim.

“Tudo posso naquele que me fortalece.”

Filipenses 4:13

RESUMO

Introdução: A homeostase de colesterol corpóreo se dá principalmente pelo balanço entre a síntese corpórea e a absorção intestinal de colesterol e desequilíbrios nestas vias podem estar relacionados à progressão da doença aterosclerótica. Estudos indicam que o aumento da absorção e a redução da síntese de colesterol são processos que podem se associar ao risco da doença cardiovascular, porém na maioria deles os marcadores foram avaliados em condições clínicas como obesidade, diabetes mellitus e dislipidemias, situações que podem ser fatores confundidores. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar as relações entre os marcadores séricos de síntese (S) e de absorção (A) de colesterol e os fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV), a espessura mediointimal das carótidas (EMIC) e a presença de placas ateroscleróticas carotídeas em indivíduos saudáveis. Este trabalho foi aprovado sob o parecer 2.617.807/2018 do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). **Material e métodos:** Trata-se de um estudo transversal, realizado no Hospital de Clínicas da Unicamp, em Campinas, São Paulo, Brasil envolvendo 270 voluntários de ambos os sexos rigorosamente selecionados a partir de um convênio com a Secretaria Municipal de Saúde de Campinas. Realizaram-se exames clínicos, avaliações antropométricas e testes laboratoriais incluindo perfis lipídicos e glicometabólicos e proteína C reativa de alta sensibilidade analisados por métodos enzimáticos e/ou colorimétricos, imunoturbidimetria e nefelometria. Os marcadores de síntese desmosterol e latosterol e de absorção campesterol e β -sitosterol foram determinados através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. A espessura mediointimal da carótida (EMIC) e a presença de placas ateroscleróticas foram acessadas por ultrassonografia de modo B de alta resolução. Análises estatísticas descritivas, comparativas, de correlação e associativas foram realizadas. **Resultados:** A idade dos voluntários variou de 19 a 75 anos (mediana =43) sendo 51% do sexo feminino. Placas ateroscleróticas estavam presentes em 19% dos indivíduos. A idade, índice de massa corpórea (IMC), pressão arterial sistólica e diastólica, colesterol total, NHDL- colesterol (colesterol não HDL), triglicérides, glicose e razão de latosterol/ β -sitosterol correlacionaram-se positivamente com EMIC ($p \leq 0,05$). EIMC não foi explicada nem associada aos marcadores S e A nas análises de regressão linear multivariada e na de regressão logística (EIMC $\leq 0,9$ vs $>0,9$ mm) (dados não mostrados). Campesterol associou-se de forma direta e individualmente com a ocorrência de placas ateroscleróticas, *Odds Ratio* (OR) = 1,71 (intervalo de confiança (IC) 95% = 1,04-2,82, $p \leq 0,05$) e inversamente com ambas as razões latosterol/campesterol, OR = 0,29 (IC = 0,11-0,80, $p \leq 0,05$) e latosterol/ β -sitosterol, OR = 0,45 (IC = 0,22-0,95, $p \leq 0,05$). As análises de regressão logística foram ajustadas para sexo, idade, IMC, colesterol total e NHDL-colesterol. Idade, sexo, IMC, proteína C reativa e triglicérides determinaram os marcadores S e A na regressão linear multivariada. **Conclusão:** Os resultados indicaram que o campesterol pode estar associado a placas ateroscleróticas e as relações latosterol/campesterol ou β -sitosterol sugeriram uma associação inversa. Uma vez que a síntese e a absorção são processos reversos, o campesterol pode refletir alterações na homeostase do colesterol corporal com potencial aterogênico. Estudos subsequentes devem ser realizados para elucidar melhor o

papel dos marcadores de síntese e absorção de colesterol na aterosclerose subclínica em indivíduos saudáveis.

Palavras-chave: Aterosclerose carotídea. Espessura mediointimal da carótida. Absorção intestinal. Fitoesteróis.

ABSTRACT

Introduction: Body cholesterol homeostasis occurs mainly due to the balance between hepatic synthesis and intestinal cholesterol absorption and imbalances in these pathways may be related to the progression of atherosclerotic disease. Studies indicate that increased absorption and reduced cholesterol synthesis are processes that can be associated with the risk of cardiovascular disease, however in most of them the markers were evaluated in clinical conditions such as obesity, diabetes mellitus and dyslipidemia, situations that can be confounding factors. Thus, the present study aimed to investigate the relationships between serum cholesterol synthesis (S) and absorption (A) markers and risk factors for cardiovascular diseases (CVD), carotid Intima-media thickness (cIMT) and the presence of atherosclerotic carotid plaques in healthy individuals. This work was approved under the evaluation 2,617,807 / 2018 of the Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas (Unicamp). **Material and methods:** This cross-sectional study carried out at Hospital de Clínicas - Unicamp, in Campinas, São Paulo, Brazil enrolled 270 volunteers of both sexes strictly selected from an agreement with the Municipal Health Department of Campinas. Clinical examinations, anthropometric evaluations and laboratory tests were performed including lipid and glycometabolic profiles and high-sensitivity C-reactive protein analyzed by enzymatic and/or colorimetric methods, immunoturbidimetry and nephelometry. Markers of cholesterol synthesis, desmosterol and lathosterol and cholesterol absorption, campesterol and β -sitosterol, were determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry. cIMT and the presence of atherosclerotic plaques was assessed using the high-resolution B-mode ultrasound method. Descriptive, comparative, correlation and associative analyzes were performed. **Results:** The age of the volunteers ranged from 19 to 75 years (median = 43) with 51% being female. Atherosclerotic plaques were present in 19% of individuals. Age, body mass index (BMI), systolic and diastolic blood pressure, total cholesterol, NHDL-cholesterol (non- HDL cholesterol), triglycerides, glucose and lathosterol/ β -sitosterol ratio were significantly and positively correlated with cIMT ($p \leq 0.05$). EIMc was neither explained nor associated with S and A markers in both multivariate linear regression analysis and logistic regression (EIMc ≤ 0.9 vs > 0.9 mm) (data not shown). Campesterol was directly and individually associated with the occurrence of atherosclerotic plaques, odds ratio (OR) = 1.71 (95% confidence interval (CI) = 1.04-2.82, $p \leq 0.05$) and inverse associations with both lathosterol/campesterol ratios, OR = 0.29 (CI = 0.11-0.80, $p \leq 0.05$) and lathosterol/ β -sitosterol, OR = 0.45 (CI = 0.22-0.95, $p \leq 0.05$) were observed in the univariate logistic regression analysis, with adjusted for sex, age, BMI, total cholesterol, and NHDL-cholesterol. Age, sex, BMI, C reactive protein and triglycerides determined S and A markers in the multivariate linear regression analysis. **Conclusion:** The findings indicated that campesterol may be associated with atherosclerotic plaques and the lathosterol/campesterol or β -sitosterol ratios suggested an inverse association. Since synthesis and absorption are reverse processes, campesterol, could reflect changes in body cholesterol homeostasis with atherogenic potential. Subsequent studies should be performed to better elucidate the role of cholesterol absorption and synthesis markers in sub-clinical atherosclerosis in healthy individuals.

Keywords: Carotid atherosclerosis. Carotid intima-media thickness. Intestinal Absorption. Phytosterols

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Metabolismo do colesterol corpóreo	14
1.2 Marcadores bioquímicos de absorção de colesterol	24
1.3 Marcadores bioquímicos de síntese de colesterol	28
1.4 Homeostase de colesterol e aterosclerose	31
1.5 Relação dos marcadores de síntese e absorção de colesterol e a aterosclerose	37
2 OBJETIVOS	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 População do estudo	41
3.2 Análises laboratoriais	44
3.3 Determinação dos marcadores de síntese e absorção de colesterol	45
3.4 Avaliação da espessura mediointimal das artérias carótidas	46
3.5 Análises estatísticas	46
4 RESULTADOS	48
5 CONCLUSÃO	69
6 REFERÊNCIAS	71
7 ANEXOS	78
7.1 Aprovação CEP/FCM - Projeto Temático FAPESP	78
7.2 Solicitação de Dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	81
7.3 Parecer do comitê de ética em pesquisa	82
7.4 Autorização Prefeitura de Campinas	99
7.5 Comprovante de submissão à revista Clinical Biochemistry	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo do colesterol corpóreo

A maioria dos lipídios encontrados no corpo insere-se nas categorias de ácidos graxos, triglicérides, fosfolipídeos, esfingolipídios, eicosanoides, colesterol (colesterol livre e colesterol esterificado), fitoesteróis, sais biliares, hormônios esteroides e vitaminas lipossolúveis. Esses lipídeos têm estruturas químicas e funções diversificadas e possuem uma característica em comum, sua insolubilidade em água ou caráter apolar (1).

O colesterol é o esteroide mais abundante nos animais (2). É uma molécula anfipática que apresenta características hidrofílicas, ou seja, solúveis em meio aquoso decorrente do grupamento hidroxila associado ao carbono 3, e características hidrofóbicas (insolúveis em água) devido ao núcleo esteroide e por uma cadeia de hidrocarboneto ligada ao carbono 17 na molécula do colesterol (2,3), como mostrado na figura 1.

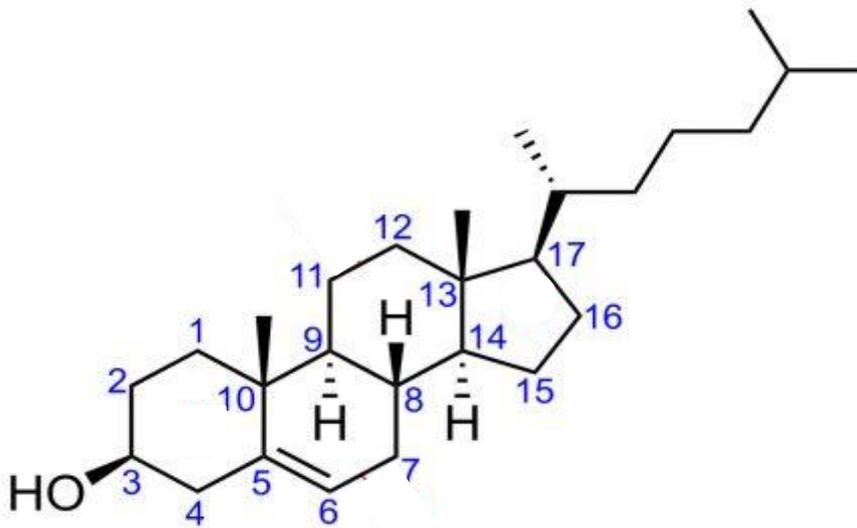


Figura 1: Estrutura molecular do colesterol. Fonte: Adaptada de (8).

O colesterol é uma molécula que tem funções fisiológicas variadas e fundamentais para o funcionamento do organismo, uma vez que é um componente essencial de membranas celulares, regulando sua fluidez. Ainda, é o precursor da síntese de hormônios esteroides, vitamina D e dos ácidos biliares (4,5).

A maior parte do colesterol do organismo origina-se da biossíntese (via endógena), enquanto aproximadamente 30% são fornecidos pela dieta (via exógena) diariamente (4,5).

Em relação ao processo de digestão dos componentes lipídicos da dieta, é importante ressaltar que os triglicérides são as principais gorduras presentes na alimentação humana e a proporção de colesterol ingerida diariamente equivale ao consumo de produtos de natureza animal, o que varia significativamente conforme o tipo de dieta (6).

O processo de digestão dos triglicérides inicia-se de forma limitada na língua (lipase lingual) e no estômago (lipase gástrica), pois essas lipases hidrolisam preferencialmente ácidos graxos de cadeia curta e média (contendo 12 ou menos átomos de carbono), figura 2 (6).

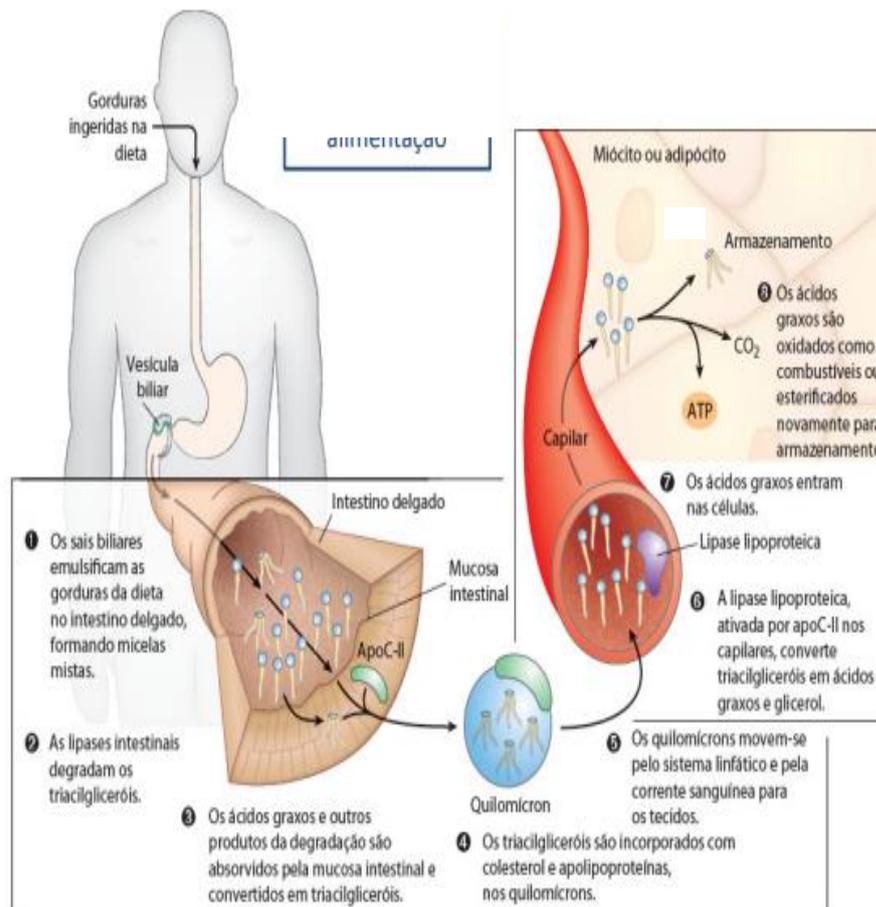


Figura 2: Digestão dos triglicérides. Fonte: Adaptada de (7)

Quando o conteúdo alimentar chega ao duodeno, estímulos hormonais favorecem a contração da vesícula biliar e liberação do seu conteúdo, a bile. Nesta, são encontrados os sais biliares, compostos anfipáticos sintetizados no fígado (8). Dada esta característica, os lipídeos provenientes da alimentação são emulsificados pela ação dos sais biliares no intestino

delgado. A função dos sais biliares é produzir micelas, facilitando assim a digestão pelas enzimas pancreáticas e sua posterior absorção (1).

Além de estimular as secreções biliares, a chegada do alimento também favorece a secreção do conteúdo pancreático, rico em bicarbonato e enzimas hidrolíticas, dentre estes, destaca-se a lipase pancreática, que é secretada concomitantemente com outra proteína, a colipase. Seu papel envolve a hidrólise dos triglicérides e a partir deste processo são produzidos ácidos graxos livres e monoglicérides (6).

O pâncreas também produz e secreta esterases que removem os ácidos graxos provenientes de outros compostos (tais como ésteres de colesterol) e a fosfolipase A2 que atua sobre os fosfolídeos, formando ácido graxo livre e um lisofosfolídeo. Ainda, a colesterol-éster-hidrolase hidrolisa os ésteres de colesterol originando o colesterol livre (1,6).

As micelas abrigam os produtos da digestão enzimática, como ácidos graxos livres, glicerol, lisofosfolídeos e colesterol livre. Ainda, integram sua composição os esteróis vegetais e vitaminas lipossolúveis (3). Pela sua natureza físico-química, as micelas interagem com a membrana do enterócito, no lúmen intestinal, e permitem a difusão dos componentes lipídicos pela membrana para dentro da célula (6,8). Os sais biliares não são absorvidos pelos enterócitos nesse momento, eles permanecem no intestino, movendo-se para a parte mais baixa deste e são então, reabsorvidos e levados de volta ao fígado pela circulação entero-hepática permitindo assim que estes sejam reprocessados e reutilizados no processo de digestão dos lípidos da dieta (6,8).

A absorção do conteúdo de colesterol e de esteróis vegetais contido nas micelas ocorre principalmente por meio de difusão controlada ou facilitada pelo transportador NPC1L1 (do inglês *Niemann-Pick C1 Like 1*), que está localizado na membrana apical dos enterócitos. Este é expresso no jejuno e íleo proximal e está localizado tanto na membrana dos enterócitos quanto no fígado (9). O Ezetimibe[®] é o primeiro fármaco utilizado como inibidor da absorção de colesterol e tem como alvo a NPC1L1, impedindo a absorção de colesterol do lúmen intestinal para dentro dos enterócitos, como mostrado na figura 3 (9,10).

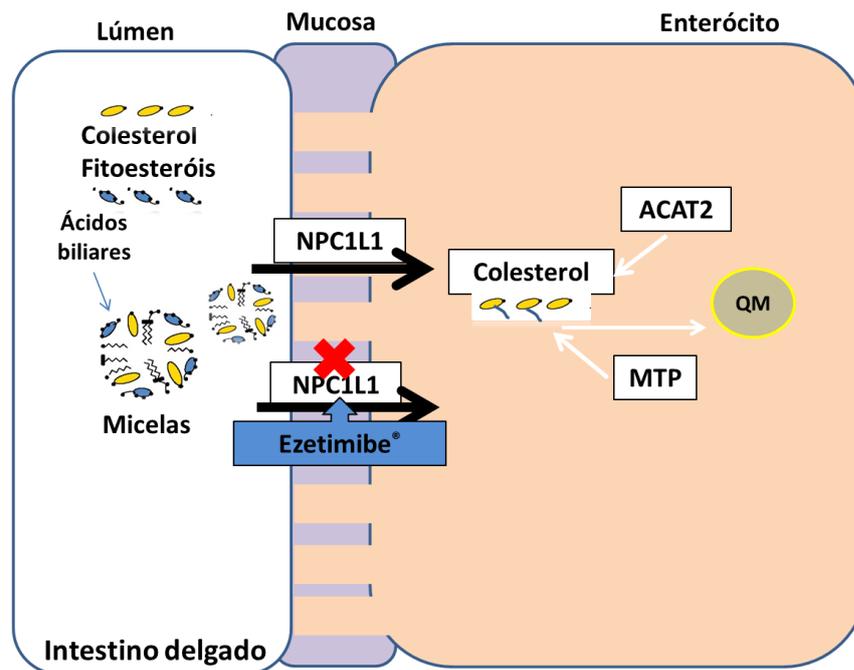


Figura 3: Absorção de colesterol mediada pelo transportador de membrana NPC1L1. Fonte: Adaptada de (11).

Uma vez no enterócito, a molécula de colesterol é esterificada com um ácido graxo em um processo mediado pela ACAT1 e ACAT2 (Acilcolesterol Acil Transferase), enzimas localizadas na membrana do retículo endoplasmático (4). Já os ácidos graxos e o monoglicerídeos são condensados por reações enzimáticas no retículo endoplasmático liso para formar os triglicérides (6). Além de colesterol esterificado e triglicérides, os fosfolípidos também são reconstituídos dentro do retículo endoplasmático. Frente a este processo, cabe a MTP (proteína de transferência microssomal) promover a conjugação deste conteúdo lipídico a uma apolipoproteína estrutural, a apolipoproteína B-48 (Apo B-48) (12).

Assim, as células intestinais empacotam os triglicérides junto com proteínas e fosfolípidos bem como o colesterol esterificado e vitaminas lipossolúveis em uma lipoproteína conhecida como quilomícron, cujo centro agrega os lipídeos hidrofóbicos como colesterol esterificado e triglicérides e estes ficam envolvidos por uma monocamada de fosfolípidos, que permitem que uma capa de hidratação se forme em volta da lipoproteína (6).

Além disso, a superfície do quilomícron contém a ApoB-48, que aumenta a solubilidade desta lipoproteína no meio aquoso (1). Moléculas de colesterol livre estão distribuídas por toda a superfície da lipoproteína para estabilizá-la, de modo que permita a manutenção da sua forma esférica (6).

Os quilomícrons são secretados na linfa e por consequência acabam na circulação sanguínea via ducto torácico, um grande canal linfático que se estende do abdômen até o pescoço, onde se conectam com os vasos sanguíneos venosos e distribuem os lipídeos da dieta para todos os tecidos do corpo (4,6,13).

Após a sua secreção nos capilares linfáticos intestinais, os quilomícrons (figura 4) interagem com outras lipoproteínas presentes na linfa, principalmente a HDL (lipoproteína de alta densidade), dela adquirem duas apolipoproteínas, a apolipoproteína CII (ApoC II) e a apolipoproteína E (ApoE) e doam Apo A-I e Apo A-IV, além de perder fosfolípidos (4,6,13).

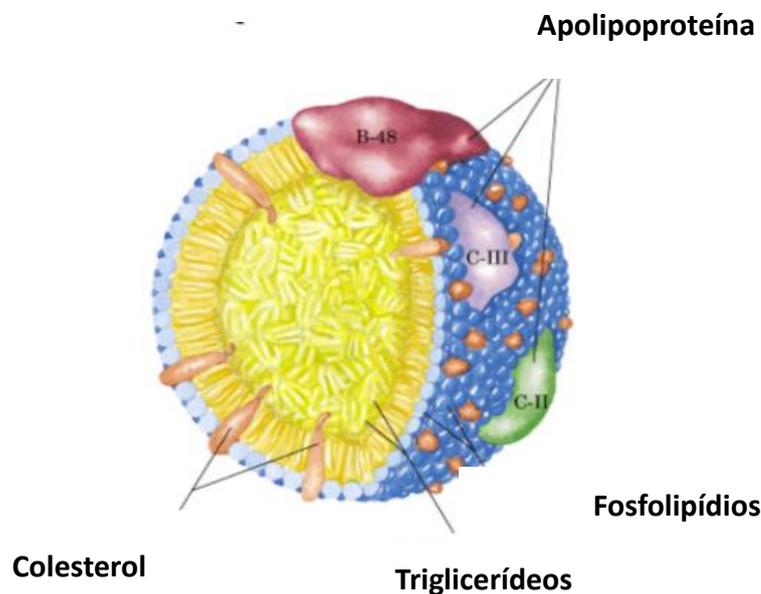


Figura 4: Estrutura do quilomícron. Fonte: Adaptada de (8).

A ApoC II do quilomícron permite que ocorra o reconhecimento da partícula pela Lipoproteína lipase (LPL) enzima localizada na superfície das células endoteliais dos capilares dos músculos esqueléticos e do tecido adiposo. Assim, a LPL atua especificamente sobre os triglicérides no quilomícron, produzindo ácidos graxos livres e glicerol (4,6,13).

Os ácidos graxos liberados podem ser difundidos pelas membranas celulares destes tecidos e serem mobilizados nestas células para a produção de energia (músculo esquelético, principalmente) ou para armazenamento na forma de triglicérides nos adipócitos. O glicerol liberado é solúvel e captado para metabolização no fígado; parte dos ácidos graxos podem ser transportados para este tecido ligados à albumina (4,6,13).

Como os quilomícrons passam por um processo progressivo de depleção em triglicérides, sua densidade aumenta, ao passo que seu diâmetro diminui e assim, eles se

tornam quilomícrons remanescentes, os quais são captados pelo fígado por receptores de membrana que reconhecem a ApoE (6).

O quilomícron remanescente, que agrega em seu conteúdo os triglicerídeos residuais e o colesterol proveniente da dieta é então degradado em seus componentes essenciais, que ficam disponíveis para serem utilizados pelos hepatócitos (1,6).

A gordura ingerida na dieta será utilizada para gerar energia ao organismo ou será armazenada no tecido adiposo, se o indivíduo consome gorduras em excesso, o fígado transforma o glicerol e o ácido graxo em triglicerídeos, estes, por sua vez, são agregados à apolipoproteína B-100 (apo B-100) junto aos fosfolípidos, colesterol livre e colesterol esterificado para formar lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) iniciando a via hepática do metabolismo de lipoproteínas plasmáticas (6,14).

As partículas de VLDL produzidas e liberadas na circulação periférica são pouco mais densas que os quilomícrons, pois contêm um percentual menor de triglicerídeos, mas ainda assim bastante representativo: aproximadamente 50% de triglicérides, 40% de colesterol esterificado e 10% de proteínas como a Apo B100 (6,15). A MTP é necessária para a formação de quilomícron no intestino, mas também é necessária para a formação de VLDL no fígado, sendo expressa, portanto, nos dois tecidos (6,15).

Ao entrarem na circulação as partículas de VLDL interagem com outras classes de lipoproteínas, especialmente a HDL. Neste processo, atuam como aceptoras de ApoC II e Apo E. A ApoC II recebida é reconhecida pela LPL, que por sua vez executa os mesmos processos descritos anteriormente em relação à hidrólise de ligações presentes nos triglicerídeos (16,17).

Desta forma, a LPL realiza a hidrólise dos triglicérides de VLDL, liberando ácidos graxos que são redistribuídos para o tecido adiposo para armazenamento ou podem ser utilizados principalmente no músculo esquelético como substrato energético (6,16,17).

Este processo de hidrólise reduz significativamente o conteúdo em triglicérides de VLDL, o que diminui seu diâmetro e conserva o colesterol agregado durante o processo de sua formação. Esta lipoproteína remanescente é conhecida como lipoproteína de densidade intermediária (IDL) (6,18). Grande parte das partículas de IDL são reconhecidas por receptores hepáticos e removidas, sendo degradadas e o seu conteúdo redistribuído segundo às necessidades teciduais metabólicas. Entretanto, parte da IDL é reconhecida e captada por receptores dos sinusóides hepáticos, favorecendo a atuação da lipase hepática (LH) (6,17).

Esta enzima é responsável pela hidrólise do conteúdo residual de triglicérides presentes em IDL, e o resultado deste processo é a formação de uma lipoproteína menor, que

conserva a principal apolipoproteína estrutural da VLDL (Apo B-100) e é rica em colesterol esterificado: a LDL, ou lipoproteína de baixa densidade (6,18).

As partículas de LDL circulantes são responsáveis pelo fornecimento de colesterol esterificado aos tecidos periféricos, principalmente às suprarrenais, às gônadas e ao tecido adiposo, entretanto, quase 80% são removidas pelos hepatócitos via receptor de LDL (LDLR), também chamado de receptor ApoB-100/ApoE (19).

A captação celular de colesterol de LDL é intermediada pela presença do LDLR na superfície celular, uma vez que este é capaz de reconhecer a ApoB-100 e promover a formação do complexo LDL-LDLR que é internalizado via endocitose (8,19).

Os LDLRs são glicoproteínas carregadas negativamente presentes especialmente em depressões na membrana celular, sendo estas recobertas com a proteína clatrina, que estabiliza o formato destas regiões específicas na membrana plasmática (16).

Após a endocitose do complexo formado, a vesícula contendo LDL-LDLR perde seu revestimento de clatrina e se funde com outras vesículas semelhantes, formando vesículas maiores chamadas endossomos que são compartimentos membranosos formados a partir do processo de endocitose devido à atividade da ATPase endossomal o pH interno diminui, o que faz com que a LDL se dissocie de seu receptor (6,16).

Os receptores então migram para um lado do endossomo, enquanto as partículas de LDL permanecem livres dentro do lúmen da vesícula. O receptor é então direcionado para vesículas de reciclagem que o retornam à membrana celular para realizar um novo ciclo e as partículas de LDL são degradadas frente a fusão em lisossomos, responsáveis pela digestão intracelular. A ApoB-100 é degradada em aminoácidos, os ésteres de colesterol presentes no núcleo das partículas das LDL são também hidrolisados, liberando colesterol livre no citoplasma, como apresentado na figura 5 (1,19,20).

O LDLR é uma glicoproteína sintetizada no retículo endoplasmático e está expresso na maioria das células, especialmente no fígado. As células captam colesterol do plasma por meio desses receptores sendo a expressão do LDLR na superfície da célula fortemente regulada: se o conteúdo de colesterol celular estiver elevado, haverá uma diminuição do número de receptores a serem sintetizados, porém se a célula precisar de colesterol, a expressão dos LDLR aumenta, e conseqüentemente aumentará o número de receptores na superfície da célula, como mostrado na figura 5 (17).

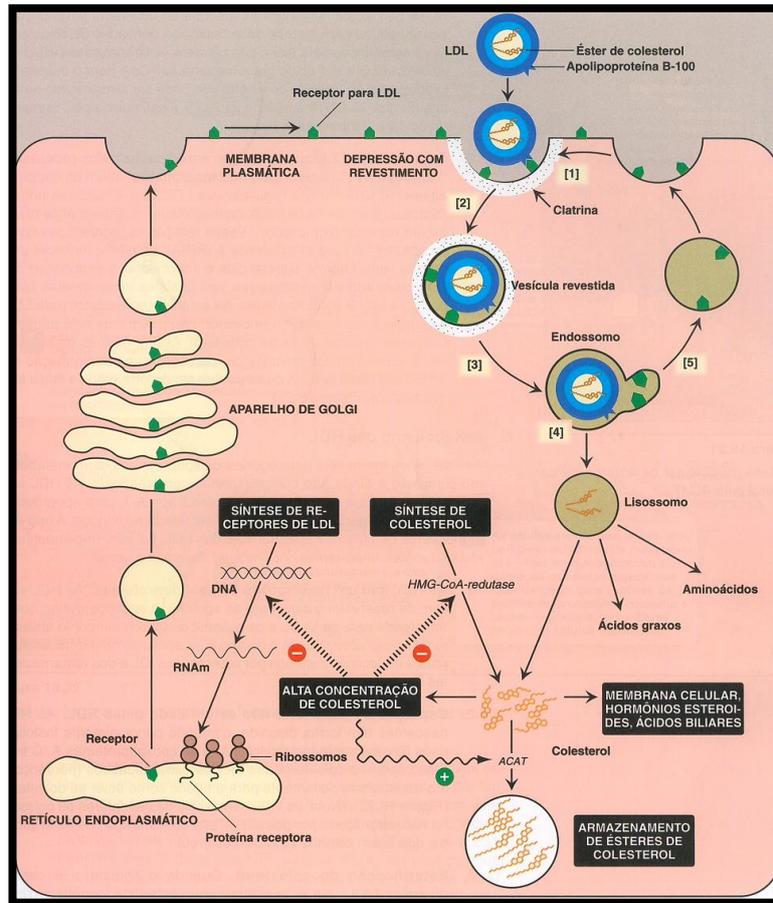


Figura 5: Captação e degradação da LDL. [1] LDLR internalizado; [2] Formação da vesícula revestida pela clatrina e internalização do complexo LDL-LDLR; [3] Formação do endossomo; [4] LDL desliga-se do LDLR; [5] Migração do LDLR para a membrana celular para serem reciclados; HMG-CoA-redutase=3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA; ACAT= Acilcolesterol Acil transferase; DNA= ácido desoxirribonucleico; RNAm= ácido ribonucleico mensageiro. Fonte: Adaptada de Harvey, 2012 (8).

Uma parte do colesterol livre intracelular pode ser oxidado, gerando óxidos de colesterol. Estas moléculas têm por função primordial controlar e regular a transcrição de genes de proteínas e enzimas envolvidas no metabolismo lipídico intracelular; entre os principais alvos, estão os genes da ACAT, da HMG-CoA redutase (hidroximetilglutaril coenzima A redutase), dos receptores de LDL e dos receptores de HDL, estabelecendo assim um controle constante das concentrações de colesterol no meio intracelular (21).

Além disso, o colesterol livre é esterificado pela ação da ACAT2 no meio intracelular, sendo o armazenamento feito sob a forma de gotículas no citoplasma. Assim, a ACAT2 previne a distribuição de colesterol livre irregular nas membranas intracelulares, processo que consiste em um importante fator citotóxico (22).

A partícula de HDL também atua na homeostase corpórea de colesterol. Esta lipoproteína é formada como estruturas discoidais ricas em proteínas, a mais abundante é a

apolipoproteína A-I (Apo A-I) que medeia o efluxo de colesterol celular através do ABCA1 (do inglês, *ATP-binding cassette transporter A1*) atuando principalmente no transporte do excesso de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado em um processo chamado transporte reverso de colesterol (23).

Diversas etapas são necessárias para que ocorra o transporte reverso do colesterol (figura 6), entretanto é essencial o processo mediado pela ABCA1, como a transferência de fosfolípídios e colesterol de membranas celulares para a Apo A-I pobre em lipídios no espaço extracelular (24).

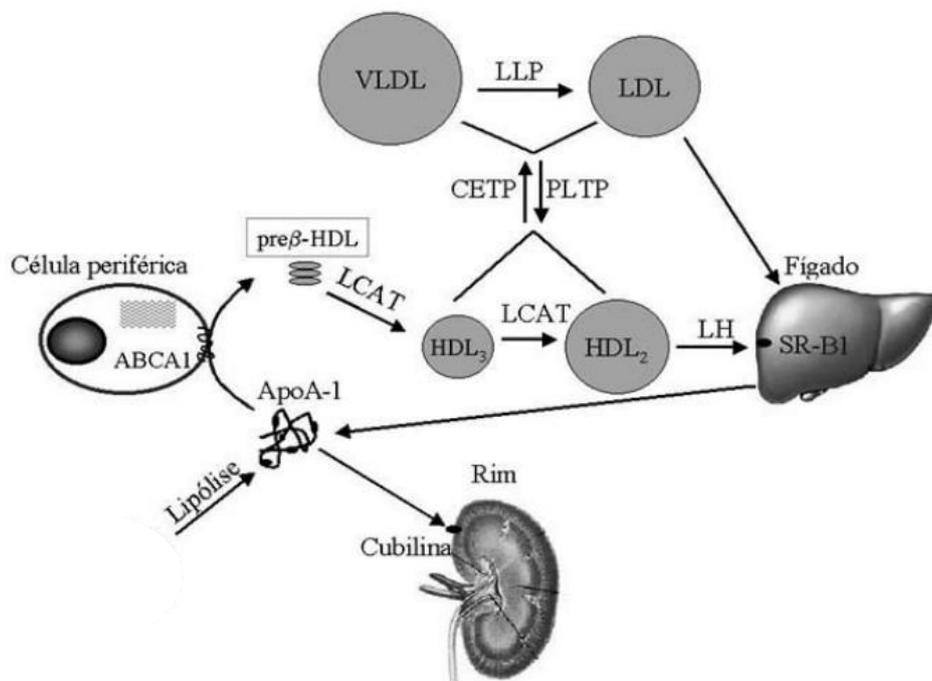


Figura 6: Principais vias do transporte reverso do colesterol e metabolismo da HDL. Fonte Adaptada de (24).

Este processo permite que a partícula nascente de HDL agregue colesterol livre e fosfolípidos de tecidos extra-hepáticos, incluindo de células espumosas presentes na íntima arterial (16). É importante ressaltar que a enzima LCAT (lecitina-colesterol aciltransferase) ligada a Apo A-I é responsável pela esterificação do colesterol livre efluxado; este, mais hidrofóbico, migra para o interior da partícula, o que altera sua conformação estrutural. Este processo resulta na geração de partículas de HDL3, bastante densas e esféricas (16,24,25).

As partículas de HDL3 são pequenas e pobres em lipídios, mas apresentam maior capacidade de funcionar comoceptoras de colesterol, inibir a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais *in vitro* e proteger a LDL do estresse oxidativo, quando comparadas à HDL2 (25).

A HDL3 medeia o efluxo de colesterol celular através do ABCA1, mas também pode remover o colesterol das células por meio da interação com o ABCG1 (do inglês, *ATP-binding cassette transporter G1*) e de fato, aproximadamente 20% da captação do colesterol celular ocorre via ABCG1; ocorre também via interação com o SR-BI (do inglês, *Scavenger Receptor Class B Type I*). Por meio da ação da LCAT são gerados mais ésteres de colesterol, garantindo o aumento do diâmetro da partícula que passa a ser chamada HDL2 (16,24–28).

A remoção do conteúdo de colesterol da HDL pelo SR-BI (23,29) na superfície dos hepatócitos leva à remoção seletiva de ésteres de colesterol das partículas sem internalizar suas proteínas, os fosfolípidios e as apolipoproteínas (16,23,24,26–29). Assim, HDL pobre em lípidos pode reiniciar o efluxo de colesterol nos tecidos, e consequentemente, o transporte reverso de colesterol (TRC) (23,24).

É importante ressaltar que o colesterol direcionado aos hepatócitos via HDL será utilizado conforme as necessidades metabólicas do organismo e promoverá alterações significativas na sinalização à síntese endógena e ao efluxo de colesterol, que é uma etapa primordial do TRC responsável pela proteção celular contra o acúmulo de colesterol e seus efeitos deletérios subjacentes (17,23,30).

A HDL atua no espaço subendotelial removendo o excesso de colesterol presente nos macrófagos da camada íntima arterial, o que caracteriza uma de suas principais funções anti-aterogênicas (23).

Com relação ao metabolismo da HDL esta é reconhecida pela importância da sua interação com as outras classes de lipoproteínas plasmáticas. Ao passo que a HDL é uma importante doadora de ApoC-II e ApoE para VLDL e quilomícrons, ela também pode ser formada a partir do metabolismo destas lipoproteínas ricas em triglicerídeos: isso é possível pela presença de apo A-I, que se desprende junto ao colesterol livre e fosfolípidos frente à remodelação exercida pela LPL sobre estas lipoproteínas (16,24).

Ainda, a CETP (proteína de transferência de colesterol esterificado) realiza um intercâmbio entre HDL, VLDL, LDL e quilomícrons, estabelecendo a transferência dos ésteres de colesterol ou parte deles para as lipoproteínas que contêm ApoB e em troca estas cedem triglicerídeos para HDL, que passa a ser substrato que permite a atuação da lipase hepática. Este processo é importante, pois, por um lado, permite a formação de HDLs menores e mais densas, aptas a reiniciar o efluxo e por outro, enriquecem em colesterol esterificado as frações que contêm ApoB (16,24).

Em resumo, o TRC gera um gradiente de retirada do excesso de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, bile e luz intestinal possibilitando sua excreção fecal (16,24).

Na prática a homeostase do colesterol corpóreo se dá pelo balanço entre a via de absorção exógena, caracterizada pelos processos de transporte e metabolização do colesterol proveniente do intestino, as vias de síntese *de novo* predominantemente hepática e a excreção fecal. Estas vias variam de acordo com características genéticas, bem como o ritmo circadiano, o peso corporal, fatores terapêuticos e a quantidade colesterol no organismo proveniente da dieta (4,17,31).

Uma revisão detalhada sobre as técnicas de mensuração dos marcadores de síntese e absorção do colesterol na literatura foi publicada por MacKay e Jones (32).

Os métodos disponíveis para quantificar a síntese do colesterol *in vivo* são diversos e baseiam-se no balanço corpóreo do colesterol, na conversão fracional do esqualeno, na incorporação de marcadores como o deutério (DI, deuterium incorporation), na análise da distribuição de massa isotopomérica (MIDA, mass isotopomer distribution analysis) e, ainda, na determinação de precursores do colesterol (no plasma ou soro) utilizada e descrita neste trabalho por cromatografia gasosa acoplada à um espectrofotômetro de massa (32).

Para a absorção do colesterol os métodos disponíveis foram descritos como métodos diretos (perfusão intestinal) e indiretos (balanço do colesterol, utilização de radioisótopos ou de isótopos estáveis, níveis séricos de fitoesteróis exógenos) e a quantificação sérica de fitoesteróis, utilizada e descrita neste trabalho por cromatografia gasosa acoplada à um espectrofotômetro de massa (32).

As razões entre os marcadores da síntese e da absorção do colesterol, (precursor metabólito/fitoesterol) foram utilizadas neste trabalho como uma estimativa do metabolismo versus balanço de colesterol (32).

1.2 Marcadores bioquímicos de síntese de colesterol

O colesterol é sintetizado em todas as células, principalmente no fígado e intestino através de um processo complexo que envolve inúmeras enzimas e mais de 30 etapas diferentes. Estes processos ocorrem a partir do sua molécula precursora, o acetil-CoA, que é proveniente do processo de beta oxidação dos ácidos graxos, metabolismo da glicose e/ou aminoácidos (33).

A síntese do colesterol pode ser dividida em duas vias bioquímicas diferentes, que podem ser reguladas de forma independente. Aproximadamente 80% da produção ocorre pela via chamada Kandutsch-Russel, onde colesterol é produzido a partir do 7-dehidrocolesterol, tendo o lanosterol como precursor; os 20% restantes podem ser produzidos pela via Bloch, tendo como precursor direto do colesterol o desmosterol (33,34), como apresentado na figura 7.

Pouco se sabe sobre qual das duas vias é realmente usada nas diferentes células e tecidos, ou quanto de colesterol exatamente cada via produz. Estas limitações ocorrem em parte porque é difícil distinguir entre as moléculas intermediárias que são intimamente relacionadas e que são formadas em cada via. Entretanto, são amplamente aceitas como as duas vias principais para a síntese do colesterol (34).

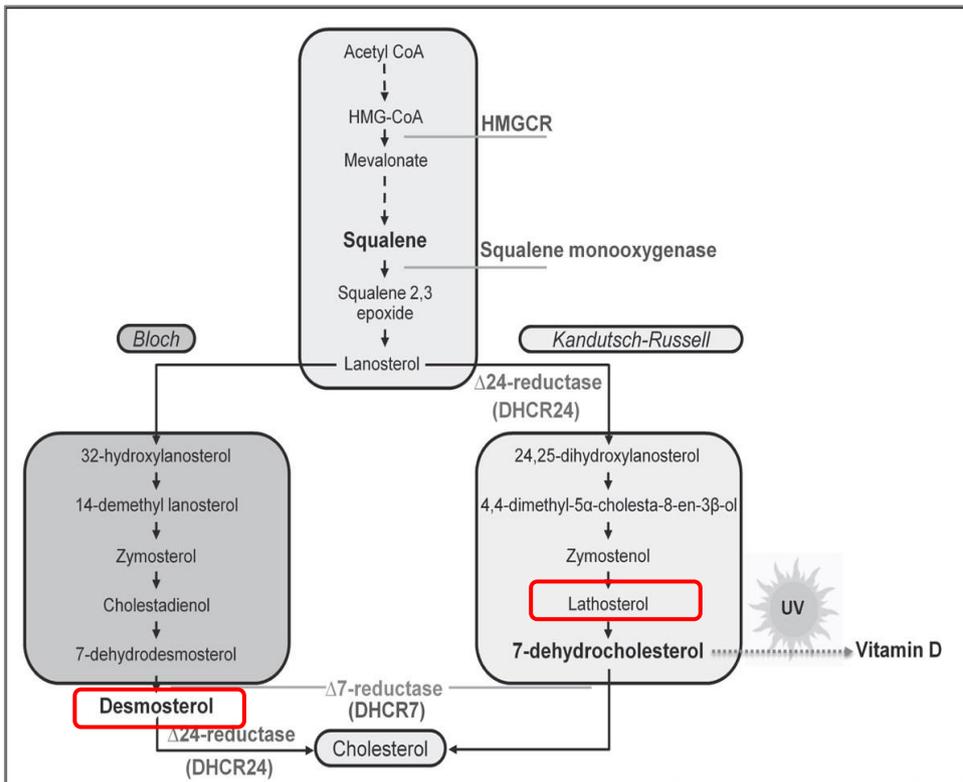


Figura 7: Síntese de colesterol através das vias de Bloch e Kandutsch-Russell, enfatizando os precursores apresentados desmosterol e lanosterol. Fonte: Adaptada de (35).

De forma geral, a biossíntese ocorre em quatro grandes etapas. Na primeira, acontece a conversão do acetil-CoA em mevalonato, onde duas moléculas de acetil-CoA são condensadas, por ação da enzima tiolase, formando acetoacetil-CoA, o qual agrega uma terceira molécula de acetil-CoA para formar o β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), reação catalisada pela HMG-CoA sintase. O HMG-CoA é então reduzido a mevalonato pela HMG-CoA redutase (6).

Na segunda etapa, ocorre a conversão do mevalonato em isoprenoides, por meio da adição de fosfato (três grupos) ao mevalonato, derivados de três moléculas de adenosina trifosfato (ATP). Na terceira etapa ocorre a formação do esqualeno, através da condensação dos isoprenoides (seis unidades). Finalmente, ocorre a ciclização do esqualeno, processo que forma os quatro anéis planares do núcleo do colesterol. Todas as reações ocorrem no retículo endoplasmático (6,36).

Na reação de ciclização, o esqualeno é transformado em lanosterol, que é o primeiro esterol na via de biossíntese do colesterol, dada a atividade da enzima 24-Dehydrocholesterol Reductase ou Δ 24-reductase (DHCR24) (33). A partir da formação do lanosterol as etapas subsequentes dependem da via pelo qual o colesterol será produzido. Na via de Bloch (figura 7), o lanosterol é convertido a desmosterol, e este serve como substrato para a enzima DHCR24, que o converte a colesterol. Já na via de Kandutsch-Russel a enzima DHCR24 catalisa a conversão do lanosterol a 24, 25-dihidroilanosterol, substrato para reações subsequentes que levam a formação de latosterol. Este, por sua vez, é substrato para a DHCR7 7-Dehydrocholesterol Reductase, DHCR7 (7-desidrocolesterol), cujo produto final é o colesterol (33,35).

As enzimas DHCR24 e DHCR7 geram colesterol a partir do desmosterol e latosterol, respectivamente e localizam-se no citoplasma e retículo endoplasmático e o processo corresponde a uma série de reações complexas de polimerização e ciclização (15,36).

Para compreensão do metabolismo corpóreo do colesterol foram utilizadas ao longo dos anos abordagens que buscavam avaliar os marcadores bioquímicos que refletissem a homeostase do colesterol como a sua síntese endógena e absorção.

Neste contexto, mostrou-se relevante a utilização de marcadores de síntese de colesterol como o latosterol e desmosterol, que são conhecidos como os precursores de colesterol, pois as concentrações séricas destes precursores correlacionam-se fortemente com a estimativa da síntese do colesterol quando são normalizados para o nível de colesterol sérico (33,37,38).

Esses marcadores estão estruturalmente relacionados ao colesterol, apesar de diferirem na complexidade de sua cadeia lateral, que é anexada ao anel esteroide (39). O latosterol tem ligação dupla no carbono 7 e o desmosterol possui uma dupla ligação no carbono 5 e carbono 24, como mostrado na figura 8 (30,40).

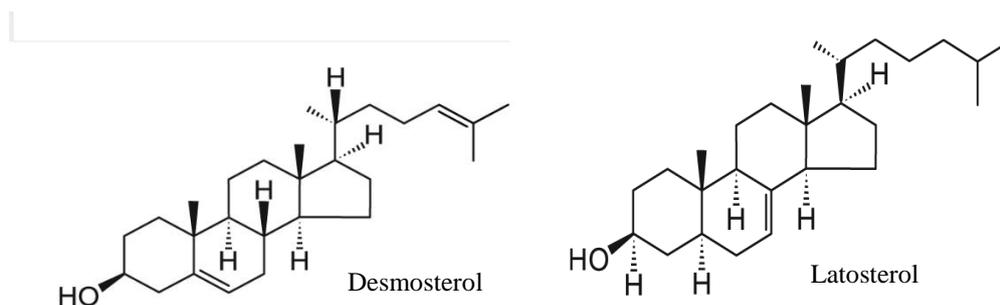


Figura 8: Estrutura molecular de desmosterol e latosterol. Fonte: Adaptada (35).

A razão pela qual é possível avaliar estes esteróis como marcadores está no fato de que os precursores do colesterol são mais hidrofílicos do que o próprio colesterol, o que garante certa mobilidade nas células e capacidade de penetrar nas membranas; estas propriedades são marcadamente maiores em relação ao colesterol (33).

Assim, os precursores do colesterol são liberados dos tecidos para a circulação em quantidades que se correlacionam positivamente com a atividade da via sintética. Estudos de base populacional mostram que as concentrações de latosterol são de 10 (2–20) $\mu\text{mol/l}$ e desmosterol 5 (2–7) $\mu\text{mol/l}$ (33,40–42).

A regulação da biossíntese de colesterol é realizada principalmente pela expressão e função da enzima HMG-CoA redutase, diretamente influenciada pela quantidade de colesterol presente no meio intracelular (15,36). Entretanto, esta enzima também é fortemente influenciada por fatores endógenos hormonais, como por exemplo, a relação insulina/glucagon, e por fatores exógenos, como o uso de fármacos inibidores da sua atividade entre outros (6).

A sensibilidade às concentrações do colesterol intracelular é intermediada por fatores de transcrição ligados à membrana pela SREBP-2 (proteína de ligação ao elemento de resposta ao esterol 2) que que ativam genes que codificam enzimas de colesterol e biossíntese de ácidos graxos. A SREBP-2 está ancorada no retículo endoplasmático liso e as concentrações do colesterol a mantem ligada às proteínas SCAP (proteína ativadora de clivagem SREBP) e INSIG 1 (gene 1 induzido por insulina); a diminuição de colesterol permite a dissociação de INSIG 1 do complexo. Assim, SREBP-2 e SCAP migram para o complexo de Golgi, onde as proteases S1P e S2P (proteases Site 1 e Site 2) são ativadas pela SCAP e clivam SREBP-2 do complexo. Este processo permite que SREBP-2 exerça o papel de fator de transcrição, migrando para o núcleo da célula e favorecendo a transcrição de genes associados à síntese de colesterol, com destaque para o do LDLR (o que levará a maior captação de colesterol transportado pela LDL) e o da HMG-CoA redutase (favorecendo a síntese endógena) (43,44).

Quando o colesterol no interior das células está elevado, ocorre a diminuição da atividade enzimática da HMG-CoA redutase, bem como há redução da expressão de receptores de LDL e a produção de colesterol endógena. Entretanto, é marcante o aumento da atividade de ACAT2, para estocar colesterol esterificado (33,35,44,45).

Assim como SREBP-2, o receptor nuclear X do fígado (LXR) também é um elemento regulador relevante do metabolismo de colesterol. Este fator de transcrição ativado por ligante atua obrigatoriamente por meio da formação de heterodímeros com o RXR ou receptor retinoide X. Juntos, modulam a transcrição de diversos genes via ligação a regiões específicas do DNA. Em condições basais há repressão do heterodímeros LXR/RXR, e conseqüentemente não há estímulo à transcrição. Entretanto, a presença de ligantes que induzem alterações conformacionais no complexo permitem a liberação dos elementos repressores e recrutamento de co-ativadores. Fisiologicamente, os esteróis oxidados ou oxisteróis, derivados de colesterol e formados quando há acúmulo intracelular, são estímulos que levam a ativação do complexo LXR/RXR. Uma das respostas mais marcantes deste processo é a regulação positiva da expressão de transportadores de colesterol transmembrana, como o ABCA1 e ABCG1 (43,44,46).

Portanto, a determinação da concentração sérica de precursores do colesterol como latosterol e desmosterol constitui uma relevante abordagem que reflete a síntese corpórea do colesterol (47).

1.3 Marcadores bioquímicos de absorção de colesterol

Os marcadores de absorção de colesterol conhecidos como fitoesteróis ou esteróis vegetais são componentes estruturais de células vegetais e a sua forma livre exerce importante papel na estabilização da bicamada lipídica das membranas, desempenhando função análoga à do colesterol em tecidos animais (39).

Os fitoesteróis mais frequentes presentes na dieta são o campesterol, β -sitosterol e o estigmasterol, encontrados em alimentos como óleos vegetais, especialmente de milho, girassol, soja e oliva, oleaginosas como amêndoas, cereais, gérmen de trigo e farelo de trigo, além de frutas e hortaliças, como maracujá, laranja e couve-flor (48).

Uma dieta ocidental contém cerca de 300 mg de esteróis (fitoesteróis) e 30 mg de estanois vegetais (fitoestenóis). Estes estanois vegetais apresentam forma saturada, sem duplas ligações, e seus principais representantes são o sitostanol e o campestanol que podem

ser produzidos pela hidrogenação dos fitoesteróis. Dietas vegetarianas são caracterizadas pela ingestão de fitoesteróis de até 500 mg/dia (48).

A estrutura química dos fitoesteróis (figura 9) é similar à do colesterol, diferindo pela presença de um ou dois grupos metil ou etil na cadeia lateral da molécula no carbono 24 (39). Ainda, possuem moléculas mais volumosas e mais hidrofóbicas, o que lhes confere uma maior afinidade pelas micelas intestinais do que o próprio colesterol (49,50).

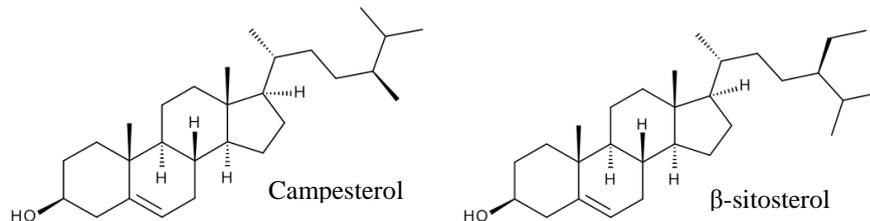


Figura 9: Estrutura molecular do campesterol e β -sitosterol. Fonte: Adaptada de (35)

O manuseio de esteróis e estanois que entram no lúmen intestinal via dieta é essencialmente um processo trifásico. A primeira fase é amplamente de natureza físico-química, ocorre intraluminalmente culminando na incorporação de colesterol e outros esteróis e estanois em micelas mistas que servem como veículos para transportar essas substâncias pouco solúveis em água até a superfície da membrana da borda em escova dos enterócitos. Esta etapa de solubilização é essencial para a entrada subsequente de qualquer tipo de esteroide na célula absorptiva, de onde podem potencialmente atingir a circulação (51).

De fato, durante o processo digestório ocorre a competição entre os fitoesteróis e o colesterol para a incorporação nas micelas, processo que pode repercutir diretamente na taxa de absorção (52).

O transporte dos fitoesteróis para o meio intracelular ocorre via transportador NPC1L1; como o colesterol utiliza o mesmo mecanismo, se reconhece que nesta fase do processo também pode haver competição pelo transportador (10). Entretanto, o metabolismo dos esteróis vegetais é distinto do colesterol pois são substratos pobres para a ACAT, o que explica por que os esteróis vegetais não são esterificados facilmente e permanecem na forma livre dentro da célula. Como consequência, os esteróis vegetais livres, em contraste com os ésteres de colesterol, não são eficientemente incorporados aos quilomícrons, figura 10 (10,53).

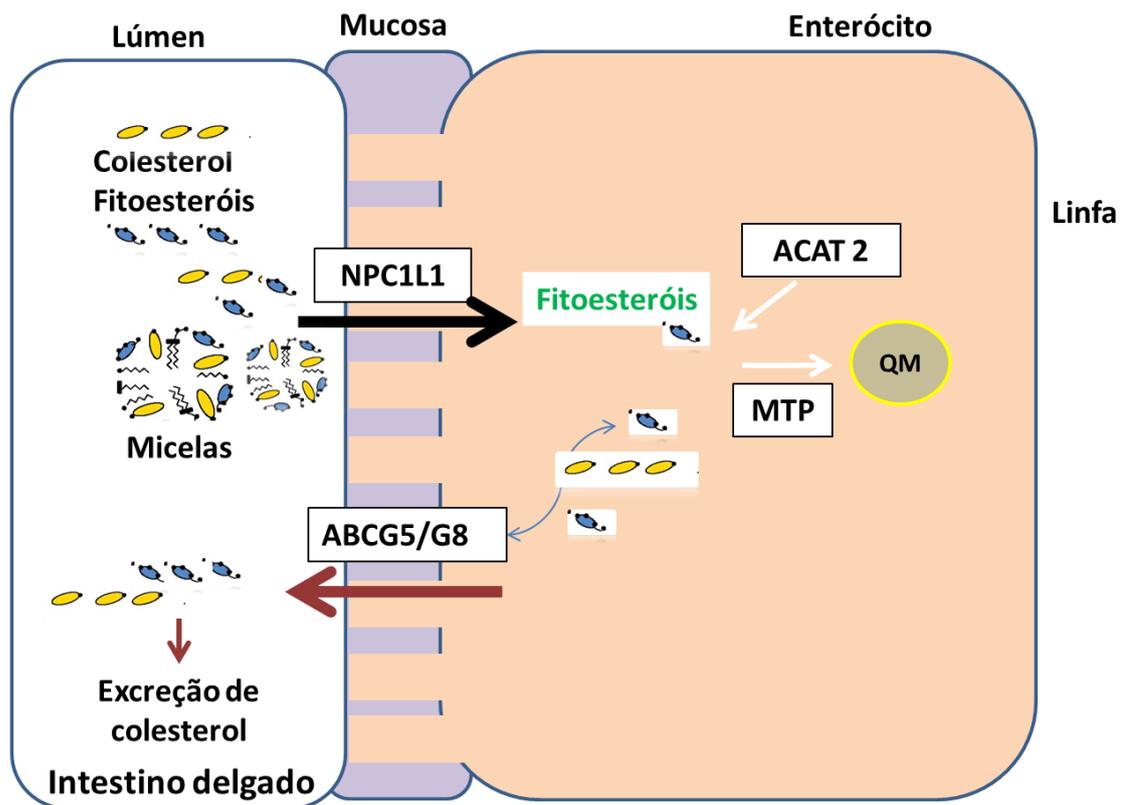


Figura 10: Absorção de fitoesteróis. Fonte Adaptado de (11)

A maioria dos esteróis intracelulares livres são excretados de volta para o lúmen intestinal por meio do transportador ABCG5/G8. Na ausência ou deficiência desses transportadores, ocorre a sitosterolemia, uma doença hereditária autossômica recessiva rara, na qual mutações nos transportadores ABCG5/G8 resultam em concentrações fortemente elevadas de esteróis vegetais no soro e nos tecidos (39).

As concentrações séricas de esteróis vegetais, dos quais são β -sitosterol e campesterol os mais abundantes, estão aproximadamente 50 vezes maiores na sitosterolemia do que em indivíduos normais. Esse distúrbio hereditário do metabolismo lipídico resulta na formação de xantomas de pele e tendões, alterações estruturais em eritrócitos e trombócitos, hemólise e, em alguns pacientes, aumento do risco cardiovascular (33).

Os fitoesteróis esterificados são incorporados aos quilomícrons e participam dos processos metabólicos intrínsecos às lipoproteínas plasmáticas. A distribuição quantitativa de esteróis vegetais nas principais classes de lipoproteínas é semelhante à do colesterol e, portanto, eles circulam principalmente em partículas de LDL e HDL. Os fitoesteróis são excretados pela via biliar, uma vez que os transportadores ABCG5/G8 são expressos nos hepatócitos e estão presentes nos canalículos biliares (53).

A absorção intestinal dos esteróis e estanois vegetais é bem menor do que a do colesterol; com a baixa absorção dos fitoesteróis e eficiente excreção biliar, após captação pelo fígado, as concentrações de fitoesteróis circulantes são baixas, variando de 0,3 a 1,0 mg/dL (48).

Desde a década de 1950 têm-se atribuído aos fitoesteróis seu efeito biológico mais conhecido e estudado, que é a capacidade de reduzir a concentração de LDL-C circulante. Vários estudos apontam que as concentrações plasmáticas dos fitoesteróis refletem a ingestão do colesterol da dieta (40,52), e que esta taxa tem influência na homeostase do colesterol corpóreo (33,54,55).

Após a ingestão dos fitoesteróis estes competem com o colesterol para serem absorvidos na luz intestinal, e esta competição diminui a absorção de colesterol; por consequência, diminuem a concentração de LDL-C circulante, e alguns estudos relatam a diminuição no risco de doenças cardiovasculares, mas os estudos são controversos (56).

Esta redução da absorção produz um estado de deficiência relativa de colesterol estimula mecanismos contraregulatórios, ou seja, a biossíntese de colesterol e a atividade do LDLR para manter a homeostase do colesterol. Portanto, a modulação da absorção do colesterol é, potencialmente, uma forma eficaz de reduzir as concentrações plasmáticas de colesterol LDL na população em geral (32,57).

Um estudo publicado em 2014 relatou mecanismos envolvidos na inibição da absorção do colesterol mediada pelos fitoesteróis: primeiro, a competição entre colesterol e fitoesteróis pela incorporação nas micelas no trato gastrointestinal; segundo, uma vez internalizados esses esteróis vegetais podem ser destinados de diferentes formas; terceiro a competição pelos transportadores ABCG5/G8, com os fitoesteróis sendo primeiramente reconhecidos e bombeados para o lúmen intestinal pelos transportadores e por fim os fitoesteróis sendo pouco esterificados em comparação com o colesterol por ACAT2 e, dessa forma, a sua menor incorporação em quilomícrons (51).

1.4 Homeostase de colesterol e aterosclerose

A doença cardiovascular (DCV) é uma das principais classes de morbimortalidade em todo o mundo (45). Estima-se que a cada ano sejam registrados 17,7 milhões de óbitos no mundo (58) decorrentes destas doenças. No Brasil cerca de 350 mil pessoas a cada ano morrem por doenças cardiovasculares, sendo responsáveis por aproximadamente 30% de todas as mortes (59). Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) a taxa de

mortalidade atualmente registrada em decorrência desta doença varia de 98 a 267 óbitos notificados para cada 100 mil habitantes (59).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), três quartos das mortes por DCV ocorrem em países de baixa e média renda. Características como desnutrição, inatividade física, consumo de álcool e tabagismo são fatores de risco com grande destaque para o desenvolvimento de DCV (58,60).

A aterosclerose é um processo subjacente à grande parte das manifestações cardiovasculares e o número elevado de fatores de risco associados pode representar a maior gravidade da doença (18,61). Consequentemente, as manifestações como infarto agudo do miocárdio (IAM) e acidente vascular cerebral (AVC) são resultantes da interação de inúmeros fatores de risco para DCV(18).

Os fatores de risco para aterosclerose podem ser divididos em duas classes: não modificáveis que incluem a hereditariedade (história familiar de DCV), sexo, idade e/ou fatores de risco modificáveis, que estão relacionados aos hábitos de vida como tipo de dieta, obesidade (incluindo depósito de gordura na região abdominal), hipertensão arterial, o diabetes mellitus, o tabagismo, o uso abusivo de álcool, o sedentarismo, o estresse e as dislipidemias (18).

Os fatores de risco estão relacionados a elevado risco cardiovascular e quanto maior o número de fatores de risco presente nos indivíduos maior será a probabilidade de apresentar um evento cardiovascular, da mesma forma, quanto melhor o controle dos hábitos de vida, com redução do número de fatores de risco modificáveis associados, maior será a redução do risco cardiovascular (18,62)

As dislipidemias são causadas por alterações metabólicas que ocorrem em resposta a distúrbios nas etapas do metabolismo lipídico, e são classificadas laboratorialmente como hipercolesterolemia isolada, com aumento isolado do LDL-C ($\text{LDL-C} \geq 160 \text{ mg/dL}$); hipertrigliceridemia isolada, com aumento isolado dos triglicérides ($\text{TG} \geq 150 \text{ mg/dL}$ em jejum calórico ou $\geq 175 \text{ mg/dL}$ sem jejum; hiperlipidemia mista com aumento do LDL-C ($\text{LDL-C} \geq 160 \text{ mg/dL}$) e dos triglicérides ($\text{TG} \geq 150 \text{ mg/dL}$ em jejum calórico ou $\geq 175 \text{ mg/dL}$ sem jejum, se e HDL-C baixo (homens $< 40 \text{ mg/dL}$ e mulheres $< 50 \text{ mg/dL}$) isolada ou em associação ao aumento de LDL-C ou de triglicérides (18,63).

A etiologia das dislipidemias pode ser primária, ou seja, associada a fatores genéticos podendo ter natureza monogênica ou poligênica. Dentre as dislipidemias de causa primária mais frequentes destaca-se a hipercolesterolemia familiar, provocada por alterações no gene que codifica o receptor de LDL ou de ApoB-100, entre outros (18).

As dislipidemias secundárias estão relacionadas a outras doenças como síndrome metabólica, obesidade, diabetes mellitus, doenças hepáticas e renais, hipotireoidismo, uso de medicamentos (diuréticos, betabloqueadores, anabolizantes, corticosteroides e anticoncepcionais) e relacionadas ao estilo de vida como hábito alimentar e sedentarismo (63).

Os fatores de risco estão bem estabelecidos e estão relacionados às questões socioeconômicas e ocupacionais, podendo estar presentes em idade precoce e progredir com o avançar desta, exibindo intensidade diretamente proporcional ao número e gravidade dos fatores de risco do indivíduo (18,62).

De forma geral, estes contribuem para alterações significativas no endotélio vascular (disfunção endotelial) que permitem o fácil acesso de lipoproteínas ricas em colesterol, especialmente a LDL-C, ao espaço subendotelial das artérias de grande e médio calibre. De forma simplificada, o colesterol total, mas principalmente o LDL-C, é um fator de risco comumente associado à morte por DCV, podendo ser considerado o elemento chave no processo aterosclerótico (18,58).

A aterosclerose é caracterizada por uma longa fase assintomática, podendo ter início no estágio de vida intrauterino ou na infância (64). É uma doença que progride assumindo uma natureza inflamatória crônica, proliferativa, degenerativa e com base multifatorial, figura 11 (18,65).

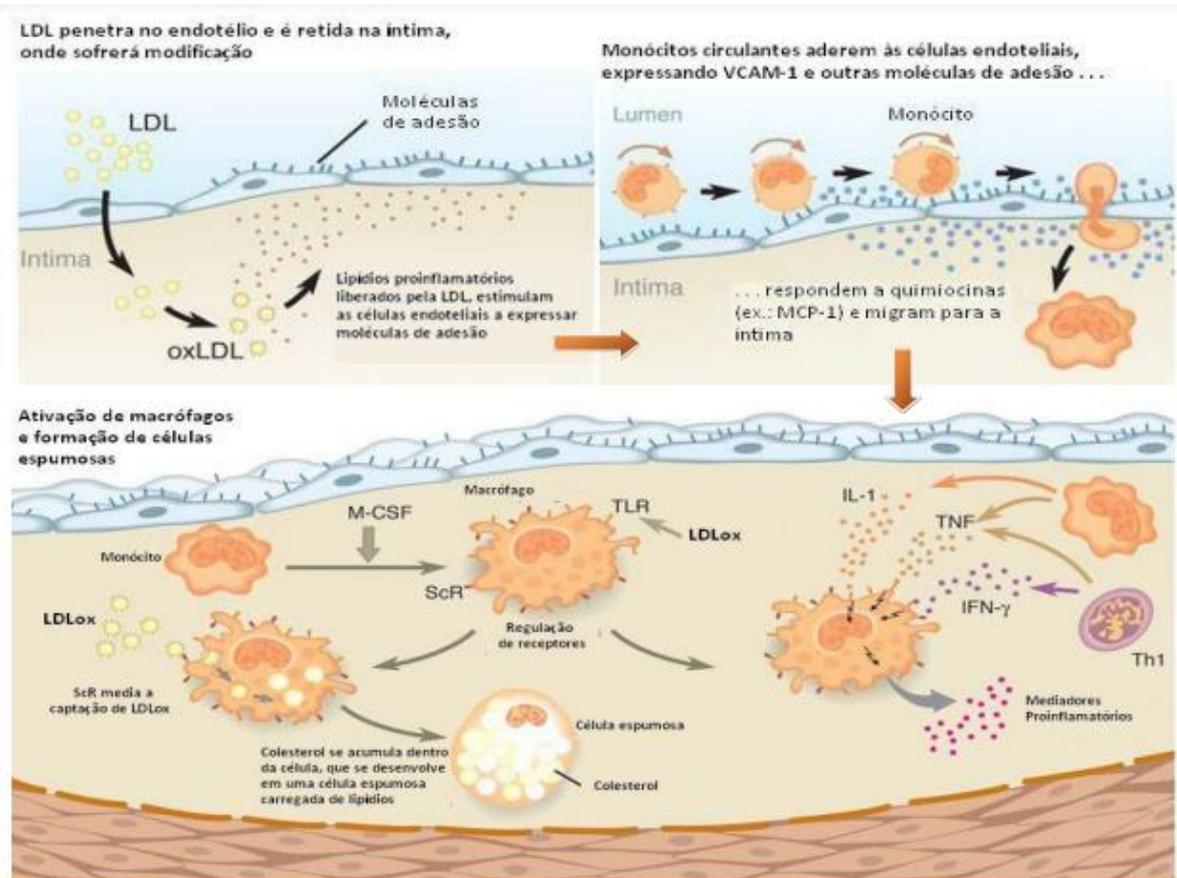


Figura 11: Aterosclerose e oxidação do LDL. Fonte Adaptada de (66).

O endotélio vascular de uma artéria é constituído por três camadas distintas, dentre as quais a túnica interna (ou íntima) que forra o vaso internamente; a túnica média, que é formada por células musculares lisas, envolvidas por colágeno e elastina e a túnica adventícia que apresenta grande quantidade de fibras colágenas e elásticas, contém mastócitos, terminações nervosas e micro vasos que penetram no tecido conjuntivo adjacente que faz com que o limite externo do vaso não seja definido (15).

O início da aterogênese ocorre muitos anos antes das manifestações estruturais e clínicas da doença o que pode ser atribuído a fenômenos que geralmente ocorrem simultaneamente, como à disfunção endotelial associada ao acúmulo de lipoproteínas ricas em colesterol esterificado (como o LDL) no espaço subendotelial. Este processo é relevante, pois esta lipoproteína quando retida neste espaço, é suscetível às modificações oxidativas na sua estrutura ocasionada por produtos metabólicos como radicais livres de oxigênio, principalmente quando existe a presença de fatores de risco que favorecem o estresse oxidativo (18,67).

Fatores de risco como as dislipidemias, a obesidade visceral, hipertensão arterial e tabagismo favorecem significativamente a disfunção endotelial e, conseqüentemente,

umentam a permeabilidade vascular, interferindo no equilíbrio entre a vasoconstrição e vasodilatação (15).

Este aumento da permeabilidade por si só aumenta a expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais, como a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), bem como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e a molécula de adesão E-selectina (64,65,68). Ainda, compromete sua capacidade de liberar óxido nítrico, um importante vasodilatador, bem como outras substâncias que podem auxiliar no controle de aderência de macromoléculas como plaquetas e monócitos ao endotélio vascular (15,18,64).

Frente a estas alterações, especialmente pela retenção de LDL oxidada (LDLox), os monócitos residentes se diferenciam a macrófagos e passam a reconhecer e fagocitar estas partículas, graças a presença de receptores do tipo *scavenger* (69). Estes macrófagos estabelecem uma resposta local pró-inflamatória, e iniciam a secreção de citocinas e quimiocinas cujo objetivo é amplificar a resposta mediante o recrutamento de monócitos para o local da lesão (18,64).

Estes mediadores pró-inflamatórios amplificam a expressão de moléculas de adesão pelo endotélio vascular, o que favorece significativamente a migração de monócitos (diapedese) e sua diferenciação no espaço subendotelial, os tornando aptos a fagocitar as partículas de LDLox (64,70,71).

Conforme o processo inflamatório se estabelece com uma natureza crônica, há um acúmulo de macrófagos repletos de lípidos (também chamados de células espumosas) e a sinalização para proliferação e migração de células musculares lisas, que tendem a se dispor próximos ao endotélio vascular e produzem uma série de elementos da matriz extracelular, especialmente colágeno (18,64). Assim, é formada a capa fibrosa da placa aterosclerótica, que dependendo da natureza inflamatória do tecido e subsequente produção de metaloproteases, pode ser resistente e estável ou altamente propensa à ruptura e exposição do conteúdo rico em tecido necrótico e lípidos oxidados (64,65,72).

As placas ateroscleróticas estão associadas a diferentes desfechos clínicos cardiovasculares, podendo ser consideradas placas estáveis, que tem como característica uma capa fibrosa e comumente associadas com inclusões calcificadas e com ausência ou apenas pequenas quantidades de lípidos extracelulares (73). Já as placas vulneráveis apresentam grande conteúdo de lípidos e possuem uma capa fibrosa fina, elas são mais propensas a rupturas, que podem levar à trombose, à embolização de fragmentos lipídicos, levando à oclusão de vasos e os reconhecidos desfechos cardiovasculares (73).

Durante o processo contínuo de formação da placa, duas forças principais de remodelação do tecido podem estar operando: por um lado, as células musculares lisas aumentam a força estrutural ao produzir a matriz de tecido conjuntivo da placa e por outro lado, a inflamação associada à presença de LDL-C, estimula a degradação do tecido; então se uma placa tende a estabilidade ou instabilidade dependerá de qual mecanismo domina o seu curso de formação em um determinado período de tempo (73).

A relação entre as DCV e as concentrações de colesterol elevadas está bem descrita na literatura (18,63,74). Concentrações elevadas do colesterol total e LDL-C, redução na concentração de HDL-C e elevação das triglicérides podem levar à doença coronariana; inclusive, a redução das concentrações de LDL-C é a base para a maioria das estratégias de prevenção e tratamento de DCV (18,70,74).

Estudos epidemiológicos observacionais prospectivos usando dados de participantes individuais e reunido em uma metanálise relatam de forma consistente uma associação contínua entre a exposição à concentração plasmática de LDL-C, risco de ocorrência de DCV e o risco de mortalidade por da doença cardiovascular (70).

A íntima associação da aterosclerose com inflamação crônica e a gravidade dos desfechos justifica a busca por um marcador capaz de refletir a fisiopatologia subjacente à doença, bem como a delimitação do risco individual, mesmo em indivíduos aparentemente saudáveis. Assim, este marcador pode se apresentar como uma proteína ou enzima encontrada em uma amostra biológica, como o sangue e/ou a urina, ou algo que possa ser detectado através de imagem tecidual, bem como indicar a presença da afecção ou lesão a um órgão (17,75).

As concentrações das lipoproteínas plasmáticas são utilizadas como fatores de risco para aterosclerose e a ultrassonografia das artérias carótidas também tem grande contribuição. Esta abordagem consiste em uma das várias modalidades de exames de imagem que permitem a avaliação não invasiva da anatomia e função vascular da carótida (76,77).

O uso desta técnica de ultrassom permite a medida de uma variedade de parâmetros, incluindo espessura mediointimal (EMIC), diâmetro arterial, presença de placas, fluxo sanguíneo e medições de velocidade de fluxo (76,77).

A avaliação da EMIC possibilita avaliar a espessura entre a camada íntima e média, o que por sua vez representa o desenvolvimento de hipertrofia na parede vascular, bem como hiperplasia intimal e o desenvolvimento de placas ateroscleróticas (75).

Foi demonstrado que o EMIC da carótida e a presença de placa predizem eventos cardiovasculares (76,78–80). Além disso, em indivíduos de baixo risco de evento

cardiovascular a triagem pela avaliação da EMIC e a presença de placas ateroscleróticas carotídeas fornecem informações relevantes para a detecção de aterosclerose subclínica (76,81,82).

São fundamentais para a prevenção do aparecimento e/ou progressão da aterosclerose a identificação precoce dos fatores de risco para DCV (62,83). Os fatores de risco para estenose na artéria carótida, bem como a presença de placa carotídea são semelhantes aos de outras doenças vasculares e sua relação com dislipidemia são bem conhecidas. Foram encontrados em estudos prévios evidências de que a progressão da aterosclerose na artéria carótida está associada a uma concentração elevada de colesterol total, LDL-C ou a uma diminuição de HDL-C, ao aumento de fibrinogênio, pressão arterial sistólica e presença de tabagismo na idade adulta. Estes fatores se mostraram independentes para o desenvolvimento da estenose (73,82).

As doenças das artérias carótidas se desenvolvem de forma significativa com a progressão da idade, podendo ser causadas por calcificações vasculares na região da cabeça e do pescoço que resultam em diminuição da luz dos vasos, bem como da ocorrência da formação de placas ateroscleróticas e seus desfechos resultantes da ruptura (82,84).

A EMIC e as placas carotídeas são marcadores de imagem conhecidos bem estabelecidos na literatura como preditores de eventos coronarianos, e são usados para capturar diferentes estágios do processo de doença aterosclerótica (82).

1.5 Relação dos marcadores de síntese e absorção de colesterol e a aterosclerose

Na aterosclerose o sistema imune desempenha um papel importante para sua iniciação e progressão, tendo como causa crucial a desregulação da homeostase do colesterol, devido à elevação de colesterol plasmático que têm sido um alvo primário na prevenção e tratamento da DCV (30). Entretanto, a integridade endotelial é um fator chave que pode favorecer ou não a migração das lipoproteínas para o espaço subendotelial.

Ensaio clínico de prevenção cardiovascular primária e secundária demonstraram claramente que a inibição da síntese de colesterol com tratamentos hipolipemiantes; como com estatinas, por exemplo, afetam a homeostase de colesterol celular: a inibição da HMG-CoA redutase induz um aumento na expressão dos receptores de LDL, o que reduz suas concentrações plasmáticas e, conseqüentemente, o risco de eventos e mortalidade por doenças cardiovasculares decorrentes da aterosclerose (17,47).

O uso de alimentos enriquecidos por fitoesteróis, como margarinas e óleos vegetais (cerca de 2g/dia), consiste em uma estratégia não farmacológica para auxiliar na

redução das concentrações de LDL-C através da redução na absorção intestinal de colesterol (48,85). Estes alimentos tem sido estudados ao longo do tempo, e esta redução pode ser mediada por alguns mecanismos como a competição com o colesterol pela solubilização nas micelas no lúmen intestinal, diminuindo a quantidade de colesterol disponível para absorção (48).

O estudo Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) demonstrou uma associação modesta entre a absorção de colesterol elevada, medida por concentrações plasmáticas de campesterol, e a síntese endógena de colesterol diminuída, medida pelas concentrações plasmáticas de latosterol, com um aumento da gravidade da doença arterial coronariana demonstrando um potencial papel aterogênico dos esteróis vegetais, devido ao excesso no organismo e sua deposição em tecido cardiovascular, entretanto, consideraram improvável em indivíduos sem sitosterolemia (86–88).

No estudo prospectivo EPIC-Norfolk foram observadas evidências de que os fitoesteróis circulantes não estão relacionados ao risco de doença cardiovascular, sugerindo que sitosterol plasmático moderadamente elevado, mas não campesterol, pode sinalizar indivíduos com risco reduzido de DCV (50).

Adicionalmente, a síntese elevada de colesterol e absorção reduzida foram observadas em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2, doença arterial coronariana e hiperglicemia; ainda, esta relação entre síntese e absorção de colesterol foi associada à resistência à insulina. Entretanto, o valor prognóstico dos marcadores da homeostase do colesterol em doenças cardiovasculares ainda é inconsistente (36).

A existência de uma relação recíproca entre a síntese e absorção de colesterol e sugere que não só as concentrações totais de colesterol sérico, mas também as diferenças na homeostase do colesterol, como aumento da absorção com diminuição da síntese ou vice-versa podem estar associadas ao desenvolvimento da aterosclerose (89).

Entretanto, é importante ressaltar que há uma grande variabilidade nas concentrações destes marcadores de síntese e absorção, uma vez que diversos fatores podem modificá-los e também diferenças significativas podem ocorrer a partir dos métodos de análise destes marcadores (52).

Ainda existem lacunas acerca da compreensão da relação entre as concentrações dos marcadores de síntese e absorção de colesterol e o risco cardiovascular. Apesar disso, a quantificação dos biomarcadores circulantes para a homeostase do colesterol é, relevante, pois pode medir com precisão o colesterol livre como um componente biologicamente ativo a fim de estabelecer sua contribuição como fator de risco de doenças cardiovasculares (DCV). Estas

medidas também permitem detectar alterações em várias vias metabólicas que controlam a homeostase do colesterol, por meio da análise quantitativa do colesterol e seus precursores metabólitos, bem como os fitoesteróis dietéticos (45).

Desta maneira, é necessário definir o quanto os marcadores de síntese e absorção refletem alterações na homeostase com potencial aterogênico em indivíduos saudáveis.

2 OBJETIVOS

Frente ao exposto, os objetivos deste trabalho foram:

- i) Avaliar se componentes do balanço corpóreo de colesterol tais como latosterol e desmosterol, marcadores de síntese corpórea e β -sitosterol e campesterol, marcadores de absorção intestinal estão associados à aterosclerose subclínica, medida como espessura mediointimal das artérias carótidas e a presença de placas ateroscleróticas carotídeas em indivíduos saudáveis.
- ii) Avaliar se fatores de risco clássicos para doenças cardiovasculares, clínico-antropométricos (idade, sexo, índice de massa corpórea, pressão arterial) e/ou metabólicos, tais como componentes do perfil lipídico (colesterol total, NHDL-C, HDL-C, NHDL-C, LDL-C, VLDL-C, triglicérides), proteína C reativa e perfil glicometabólico (glicose sérica, insulina e HOMA-IR) se associam aos marcadores de síntese e absorção de colesterol.
- iii) Analisar quais fatores clínico-antropométricos e/ou metabólicos modificam estas possíveis associações.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População do estudo

A população do estudo foi composta por 270 indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 19 e 75 anos, que foram recrutados para a participação no Projeto Temático FAPESP n°2006/60585-9 “Relação da concentração de HDL-C com o metabolismo de colesterol em monócitos e no plasma humano” (aprovação CEP 038/2011) (anexo I). Como a presente proposta é de um estudo retrospectivo, foi solicitada a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (CEP/FCM) (anexo II). Este trabalho foi aprovado sob o parecer n. 2.617.807/2018, disposto no anexo III.

Estes indivíduos foram selecionados a partir de um convênio estabelecido com a Secretaria Municipal de Saúde (SMS) de Campinas (SP) em 2008 (anexo IV), figura 12. Neste, ficou estabelecido o acesso dos resultados do perfil lipídico de jejum (colesterol total, LDL-C, HDL-C, NHDL-C (colesterol não HDL) e triglicérides) de indivíduos que espontaneamente buscaram atendimento nos Unidades Básicas de Saúde da referida cidade.

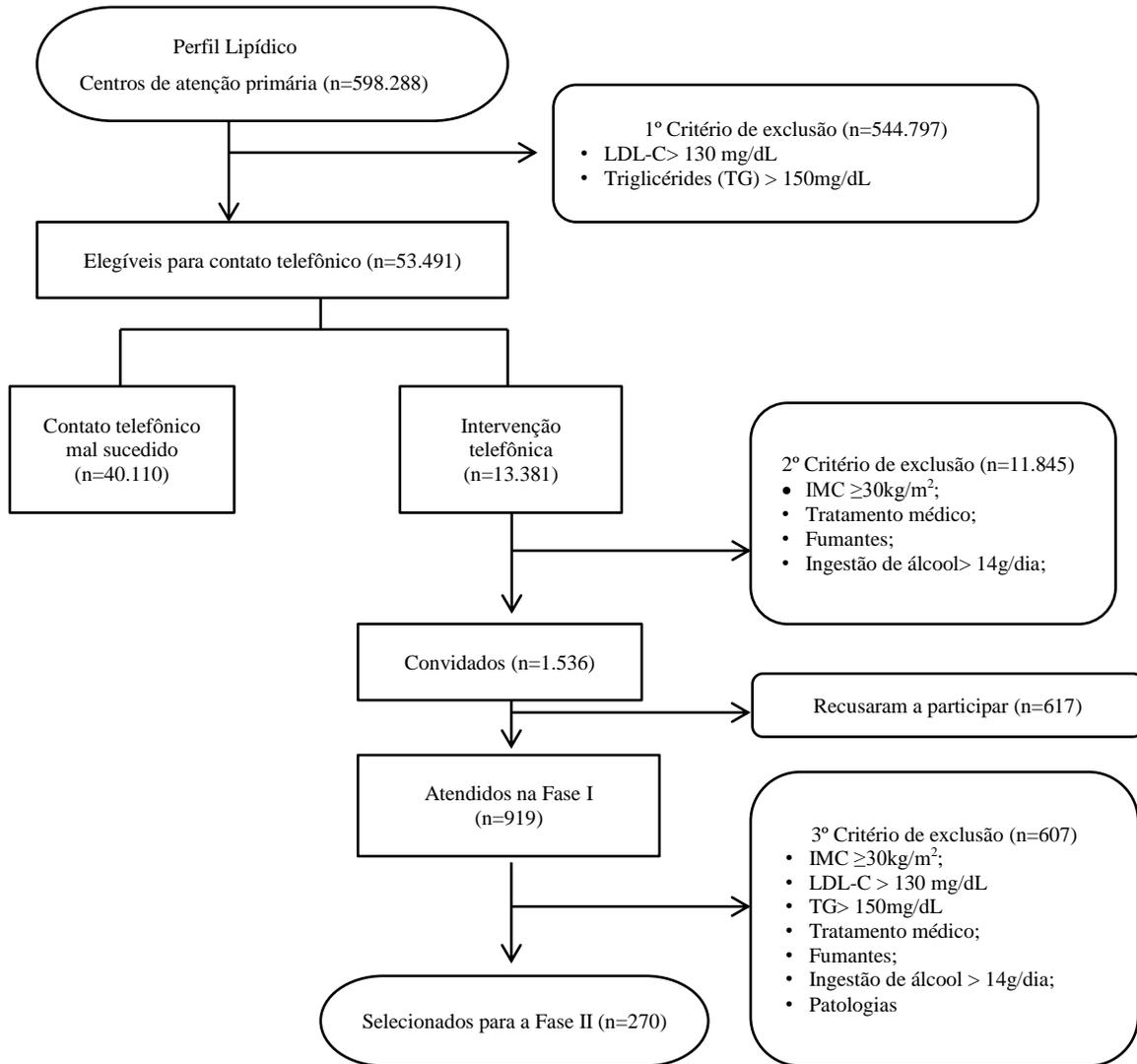


Figura 12: Cronograma do estudo. Fonte: Adaptado de (90).

Os critérios de seleção foram extensivamente descritos por Parra e colaboradores (90). Em resumo, a partir do banco de dados bruto enviado pela SMS nos anos de 2008 a 2013, um total de 598.288 perfis lipídicos foram avaliados. A partir destes dados, foi aplicado um primeiro critério de exclusão, no qual indivíduos que apresentavam LDL-C superior a 130 mg/dL, triglicérides maiores que 150mg/dL e idade menor que 18 anos e maior que 79 anos foram excluídos, restando 53.491 perfis lipídicos (90).

A partir dos dados de pacientes elegíveis, foi realizada a tentativa de contato telefônico. A partir deste, foi aplicado um questionário, realizado com 13.381 indivíduos. Nesta etapa, foi aplicado um segundo critério de exclusão, no qual os indivíduos que relataram $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$, comorbidades (como hipertensão, diabetes mellitus, obesidade), realizavam tratamento farmacológico que reconhecidamente afetaria o perfil lipídico, tabagistas e os que faziam uma ingestão de álcool superior a 14g/dia foram excluídos (90).

O consumo de etanol foi determinado pela quantidade consumida da bebida em gramas calculada a partir do volume ingerido em mililitros (mL) e o percentual alcoólico do tipo da bebida consumida (%). Corrigiu-se o volume ingerido (mL) multiplicando-se o valor estimado por 0,8g/mL, da densidade do álcool, conforme a fórmula: (mL x % de etanol x 0,8). (91).

Foram convidados a participar do projeto de pesquisa no Hospital de Clínicas da UNICAMP 1.536 voluntários com idade entre 19 e 75 anos, sem relato de uso regular de medicamentos e sem quaisquer patologias que pudessem interferir no metabolismo lipídico, tais como doenças infecciosas, endócrinas, renais, hepáticas ou cardiovasculares. Concordaram em participar da pesquisa 919 indivíduos que compareceram à admissão (chamada visita 1), processo que consistiu na explicação dos termos da pesquisa e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, além da realização das avaliações clínicas e antropométricas e laboratoriais. Sangue venoso periférico em jejum para as análises laboratoriais iniciais incluindo colesterol total, NHDL-C, HDL-C, LDL-C, VLDL-C, triglicérides, apo A-I e apoB-100), Lp (a), proteína C reativa ultrasensível (PCR-us), glicose sérica, insulina, função renal (ureia, creatinina, ácido úrico), função tireoidiana (TSH, hormônio estimulante da tireoide), função hepática (alanina aminotransferase [ALT], aspartato aminotransferase [AST], fosfatase alcalina [FAL] e gama-glutamil transferase [GGT]).

O exame clínico, peso corporal, altura, circunferência de cintura, quadril e aferição da pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) em tempos pré-determinados consistiram na avaliação clínica e antropométrica dos participantes.

A partir dos resultados clínicos e laboratoriais obtidos na visita 1 foram selecionados para a chamada visita 2 apenas os voluntários que não divergiram das informações fornecidas durante o questionário telefônico inicial, com índice de massa corpórea (IMC) igual ou inferior a 30 kg/m^2 , sem uso regular de medicamentos que reconhecidamente interferem no metabolismo lipídico (como estatinas, contraceptivos e terapias de reposição hormonal), e exames clínico/laboratoriais que porventura evidenciassem diabetes mellitus, disfunção tireoidiana, dislipidemias, doenças renais, hepáticas ou cardiovasculares. Ainda, foram excluídos todos os indivíduos com hipertensão arterial sistêmica, síndrome metabólica e histórico de tabagismo recente e/ou etilismo, totalizando 270 indivíduos.

Estes voluntários foram convidados para a visita 2 quando foram submetidos a nova coleta de sangue venoso periférico, dos quais soro e plasma EDTA foram armazenados

em freezer à -80°C para a realização das análises descritas a seguir. Ainda, estes voluntários foram elegíveis para a avaliação da espessura íntimo medial (EIM) das artérias carótidas.

3.2 Análises laboratoriais

O sangue venoso periférico foi coletado após jejum calórico de 12 horas para a separação de soro e plasma EDTA por centrifugação (4°C, 1000 g, 10 minutos). Parte do soro foi analisada imediatamente na Seção de Bioquímica Clínica e Fisiologia Clínica do Hospital de Clínicas/Unicamp e parte do soro e do plasma EDTA foram armazenados à -80°C até as demais análises.

As medidas das concentrações de colesterol total, triglicérides, HDL-C, NHDL-C, LDL-C, VLDL-C, apo A-I e apoB-100), glicose sérica, função renal (ureia, creatinina, ácido úrico), função hepática (alanina aminotransferase [ALT], aspartato aminotransferase [AST], fosfatase alcalina [FAL] e gama-glutamil transferase [GGT] (métodos cinéticos) foram determinadas por métodos enzimáticos colorimétricos ou cinéticos em sistema automatizado modular® Analytics Evo (Roche Diagnostics, Burgess Hill, West Sussex, UK) utilizando reagentes Roche Diagnostics® (Mannheim, Germany) comercialmente disponíveis. As dosagens de TSH (hormônio estimulante da tireóide) e T4 livre (tiroxina livre) foram realizadas por quimioluminescência.

O LDL-C foi calculado pela equação de Friedwald e VLDL-C estimado pela fórmula triglicérides/5 e o NHDL-C também utilizado como parâmetro para avaliação de dislipidemias obtido subtraindo-se o valor do colesterol do HDL do valor do colesterol total: $\text{NHDL-C} = \text{colesterol total} - \text{HDL-C}$ (17,91).

Apolipoproteínas A-I, B-100 e lipoproteína (a) (Lp(a)) foram quantificadas por nefelometria em sistema automatizado (BNII/Marburg, Alemanha) usando reagentes comerciais Dade-Behring® (Mannheim, Alemanha).

A concentração de insulina foi determinada usando o ensaio comercial Human Insulin ELISA (Millipore, Billerica, MA, USA). Além disso, foi calculado através da Homeostasis Model Assessment (HOMA) Calculator versão 2.2.2 (University of Oxford, UK) a resistência à insulina (HOMA-IR) cujo cálculo é uma estimativa baseada nas concentrações de glicose e insulina em jejum calórico (92). A proteína C reativa ultra sensível (PCR-us) foi avaliada por imunoturbidimetria utilizando o ensaio ultrasensível Tina-quant® CRP (Roche Diagnostics®, Mannheim, Germany).

3.3 Determinação dos marcadores de síntese e absorção de colesterol

Os marcadores plasmáticos de absorção intestinal de colesterol (campesterol e β -sitosterol) e de síntese de colesterol (desmosterol e latosterol) foram medidos por cromatografia gasosa (GC) acoplada a um espectrofotômetro de massa (MS) (marca Shimadzu GCMS-QP2010 plus, Kioto, Japão) utilizando a versão 2.5 do *software GCMS solution*. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Lípidos (LIM10) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de São Paulo em colaboração com as Dra. Edna Nakandakare e Dra. Valeria Sutti Nunes.

Resumidamente, às amostras de plasma (200 μ L) foi adicionado 5 α -colestano (1 μ g) como padrão interno, hidrolisado com KOH em etanol (1mol/L, 1 mL) a 60°C (1h) e extraído com hexana. Após secagem sob fluxo de nitrogênio, os esteróis foram derivatizados com uma solução silanizante composta por 100 μ L de piridina e BSTFA (N, O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida) + 1% TMCS (trimetilclorosilane) (1:1, v/v) (Supelco 33155-U) e incubada durante 1 h a 60°C.

Um microlitro da amostra derivatizada foi injetado no cromatógrafo pelo injetor automático em modo de injeção de split 1:3 e a temperatura do injetor foi mantida a 280°C. A separação eficiente de esterol foi alcançada em uma coluna capilar Restek (100% dimethyl polysiloxane - Rxi13323) 1ms, 30 metros de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm, por 30 minutos, usando hélio como gás de arraste e velocidade linear constante de 45,8 cm/s e a temperatura foi mantida em 280°C. O espectrômetro de massa operou em modo de elétron de impacto a uma voltagem de ionização de 70eV com a temperatura da fonte de íons e da interface a 300°C (93–96).

A análise foi realizada com o monitoramento de íons selecionados (SIM-selected ion monitoring), usando um alvo e dois íons qualificadores. Os íons selecionados foram o primeiro o íon alvo marcador e todos os outros são íons qualificadores, utilizados na identificação de esteróis foram: 217, 149 e 109 m/z (*mass-to-charge ratio*) para 5 α -colestano; 119, 351 e 253 m/z para desmosterol, 255, 213 e 458 m/z para latosterol; e 129, 382 e 343 m/z para campesterol e 129, 486 e 357 m/z para β -sitosterol.

A quantificação por foi baseada nas razões da área de pico dos íons alvo do analito em relação ao padrão interno (5 α -colestano) e comparada às concentrações dos padrões de calibração correspondentes (94–96).

As concentrações de marcadores de esteróis no plasma foram apresentadas como valores relativos, após correção pela concentração de colesterol total no plasma dos indivíduos (97).

3.4 Avaliação da espessura mediointimal das artérias carótidas (EMic)

Os voluntários que atenderam aos critérios de inclusão descritos acima foram convidados para medidas de EMic e detecção de placa aterosclerótica carotídea, cujas determinações foram realizadas por um único radiologista treinado, cego para os voluntários do estudo, realizado no setor de Radiologia do Hospital das Clínicas na UNICAMP.

O ultrassom carotídeo de modo B foi realizado usando o sistema de ultrassom (ATL HDI 1500 e 3500 Ultrasound System, Advanced Technology Laboratories Ultrasound, Bothell, USA), e um transdutor linear de alta frequência (6-9 MHz). A medida da EMic da carótida foi obtida das artérias carótidas comuns direita e esquerda na parede distal e a 1 cm da bifurcação; no procedimento os indivíduos foram avaliados em decúbito dorsal, com a cabeça elevada cerca de 20 graus e rotação de aproximadamente 45 graus (98,99).

A imagem foi obtida inicialmente avaliando a artéria carótida comum com insonação ântero-oblíqua acima da clavícula e ao longo do bulbo e artéria carótida interna, conforme descrito anteriormente (75,98). Os resultados correspondem à média aritmética das espessuras (em milímetros) das carótidas direita e esquerda (98,99).

Os valores da EMic acima do percentil 75 são considerados altos e indicativos de risco aumentado de DCV (98). Outros estudos apontam que esta relação se dá a partir do percentil 90, critério adotado pelo presente estudo dada as características do grupo de voluntários (75,98). Assim, valores de EMic superiores a 0,9 mm foram considerados espessamento carotídeo.

Além disso, foi relatada a presença de placas ateroscleróticas quando presentes ao longo do bulbo carotídeo ou quando a EMic era maior que 50% do valor da espessura da EMic adjacente, e uma estrutura focal estendendo-se no mínimo 0,5 mm para a luz do vaso, ou quando a EMic era maior que 1,5mm (75,79).

3.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o SAS System for Windows 9.1.3 (Statistical Analysis System/SAS Institute Inc., 2002-2003, NC, EUA) e o SPSS 22.0

(SPSS Inc., EUA), com apoio do setor de ioestatística da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

A distribuição de todos os parâmetros foi avaliada pelo teste de normalidade Shapiro Wilk, devido a amostra ser < 2000 ; os dados apresentaram ausência de normalidade. Sendo assim, as variáveis foram expressas como mediana e intervalo interquartil (percentis 25 e 75) e os testes estatísticos aplicados foram não paramétricos.

A população foi estratificada em grupos de acordo com a presença ou ausência de placas ateroscleróticas e os parâmetros comparados pelo teste U Mann Whitney-Wilcoxon com as variáveis respostas transformadas em postos e ajustadas para idade, sexo, IMC, colesterol total e NHDL-C.

O coeficiente de correlação de Spearman (ρ/r) que mede a força e a direção da associação entre duas variáveis, foi utilizado para verificar a correlação entre a EMI com os marcadores de síntese e absorção de colesterol.

Análises de regressão linear univariada e multivariada foram utilizadas para verificar a associação entre a EMI e marcadores de síntese e absorção de colesterol. As análises foram ajustadas para idade, sexo, IMC, colesterol total e NHDL-C. O método *stepwise* foi utilizado para seleção das variáveis na análise multivariada (100). Os resultados foram expressos como coeficientes de determinação (R^2 parcial e R^2 total). (101).

Análises de regressão logística (para variáveis categóricas) foram utilizadas para avaliar os riscos relativos por meio do cálculo do *Odds Ratio* (OR), para a presença de placas ateroscleróticas carotídeas e para (EIMc $\leq 0,9$ vs $> 0,9$ mm). Os modelos foram ajustados para idade, sexo, IMC, colesterol total e NHDL-C. (101)

Os testes foram considerados significativos no valor de probabilidade (p) $\leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Capítulo 1 – Arquivo submetido ao periódico Journal Clinical Biochemistry (Anexo V).

PLASMA CAMPESTEROL IS POSITIVELY ASSOCIATED WITH CAROTID PLAQUES IN ASYMPTOMATIC SUBJECTS

Edite Vieira S. de Campos¹; Valéria S. Nunes³; Edna Nakandakare³; Jamal Baracat⁴; Victor França¹; Érica Ivana L. Gomes¹; Raissa P. Coelho¹; Vanessa Helena. S. Zago²; Eliana C. de Faria¹.

¹Department of Clinical Pathology, Lipid Laboratory and Center for Medicine and Experimental Surgery, Faculty of Medical Sciences (R. Tessália Vieira de Camargo, 126 - Cidade Universitária, Campinas), State University of Campinas, phone (+55 19) 3521-7064 / Fax (+55 19) 3521-9434. Campinas, (zip code 13083-887), São Paulo, Brazil;

²Pontifical Catholic University of Campinas (Av. John Boyd Dunlop, s/n, Jardim Ipaussurama, Campinas) (zip code , 13060-904), São Paulo, Brazil;

³Lipids Laboratory, Faculty of Medical Sciences (Av. Dr. Arnaldo, 455), University of São Paulo. Phone (+55 11) 3061-7263 fax: (+55 11)30621255. São Paulo (zip code 01246-000), São Paulo, Brazil;

⁴Department of Radiology, Hospital of Clinics, Faculty of Medical Sciences, Campinas, SP, Brazil.

ABSTRACT

Background: Increased cholesterol absorption and reduced synthesis are processes that have been associated with cardiovascular disease risk in a controversial way. However, most of the studies in the literature involving markers of cholesterol synthesis and absorption include clinical conditions like obesity, diabetes mellitus, dyslipidemia, which can be confounding factors. The present study aimed at investigating the relationships of plasma cholesterol synthesis and absorption markers with cardiovascular disease (CVD) risk factors, cIMT (carotid intima-media thickness) and the presence of carotid plaques in asymptomatic subjects. **Methods:** A cross-sectional study was carried out at the University Hospital at the University of Campinas, in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. Anthropometrical

parameters such as fasting plasma lipids, glucometabolic profiles, high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), markers of cholesterol synthesis (desmosterol and lathosterol), and absorption, (campesterol and β -sitosterol) were measured in 270 asymptomatic individuals. The cIMT and the presence of atherosclerotic plaques were determined. **Results:** Among the selected subjects aged between 19 and 75 years, 51% were females. Age, body mass index, systolic and diastolic blood pressures, total cholesterol, non-HDL-C, triglycerides, glucose, and lathosterol/ β -sitosterol ratios correlated positively with cIMT ($p \leq 0.05$). Atherosclerotic plaques were present in 19% of the subjects. A direct association of carotid plaques with campesterol, OR=1.71 (95% CI=1.04-2.82, $p \leq 0.05$) and inverse associations with both ratios lathosterol/campesterol, OR=0.29 (CI=0.11-0.80, $p \leq 0.05$) and lathosterol/ β -sitosterol, OR=0.45 (CI=0.22-0.95, $p \leq 0.05$) were observed in univariate logistic regression analysis. **Conclusion:** The findings suggested that campesterol may be associated with atherosclerotic plaques and the lathosterol/campesterol or β -sitosterol ratios suggested an inverse association. And that synthesis and absorption cholesterol are inverse processes, and the absorption marker, campesterol, may reflect changes in body cholesterol homeostasis with atherogenic potential.

KEYWORDS: Carotid atherosclerosis. Intestinal Absorption. Carotid intima-media thickness. Phytosterols.

1 INTRODUCTION

The dynamics of body cholesterol homeostasis involves several pathways and play a key role in atherogenesis. Studies indicate that unbalances between its endogenous synthesis and its intestinal absorption may be associated with the progression of atherosclerotic disease [1,2].

This can be illustrated by the plasma levels of cholesterol synthesis and absorption markers [3,4], since they reciprocal relationship strengthens the data on the regulation of serum cholesterol concentrations, and suggests that not only total serum cholesterol levels, but also differences in cholesterol homeostasis, may be associated with subclinical atherosclerosis [5,6].

A recent meta-analysis provided an overview of the levels of cholesterol absorption and synthesis markers in different metabolic disorders: obesity, type 2 diabetes mellitus (DM2), metabolic syndrome, and familial hypercholesterolaemia (HF). Interestingly,

the study reinforces the reciprocal patterns, and highlight that these metabolic disorders are characterized by higher cholesterol synthesis or higher cholesterol absorption, which could contribute in different ways to atherosclerosis development [2].

Observational and clinical intervention studies established the measurement of carotid intima-media thickness (cIMT) as an important and noninvasive marker for subclinical and asymptomatic atherosclerotic cardiovascular disease. Indeed, cIMT is strongly associated with classical cardiovascular risk factors such as age, gender, race, hypercholesterolemia, hyperglycemia, smoking among other factors [7,8].

An advanced stage of atherosclerosis comprises the formation of atherosclerotic plaques, which is considered to be mainly a process of the intimal layer of arteries. Like cIMT, carotid plaque has also been shown to be associated with cardiovascular risk, studies have shown that carotid plaque could be used as a prognostic marker for future cardiovascular events, however the extent to which the increase in cIMT is related to the future development of the carotid plaque is not entirely clear [9,10].

The relationship between subclinical atherosclerosis determined by cIMT and changes in cholesterol homeostasis was previously explored, but the findings are still controversial [5,11,12].

Clinical trials of primary and secondary cardiovascular prevention have demonstrated that inhibition of cholesterol synthesis with lipid-lowering treatments reduce LDL-C in dyslipidemic patients with high cardiovascular risk [13].

However, a higher concentration of absorption markers associated with decreased synthesis markers in non-diabetic individuals was independently associated with established cardiovascular disease or carotid stenosis [14,15].

In view of the above, it is necessary to define the contribution of factors that directly interfere with cholesterol metabolism [15,16] and evaluate whether the serum markers of cholesterol synthesis and absorption are associated with carotid atherosclerosis in a population of asymptomatic individuals.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Research design

A cross-sectional study was carried out in the city of Campinas, São Paulo, Brazil, from 2008 to 2013 as shown in Figure 1. The study was approved by the local institutional ethical committee of the State University of Campinas (registration number 2.617.807/2018).

All participants provided written and informed consent forms before taking part in the study which was in accordance with the Declaration of Helsinki.

A detailed description can be accessed in [17]. Two hundred and seventy volunteers from both genders were selected through a large sample of individuals who sought government primary care centers (n=598.288) and assessed their lipid profiles; we then excluded those who did not meet our study criteria (Figure 1).

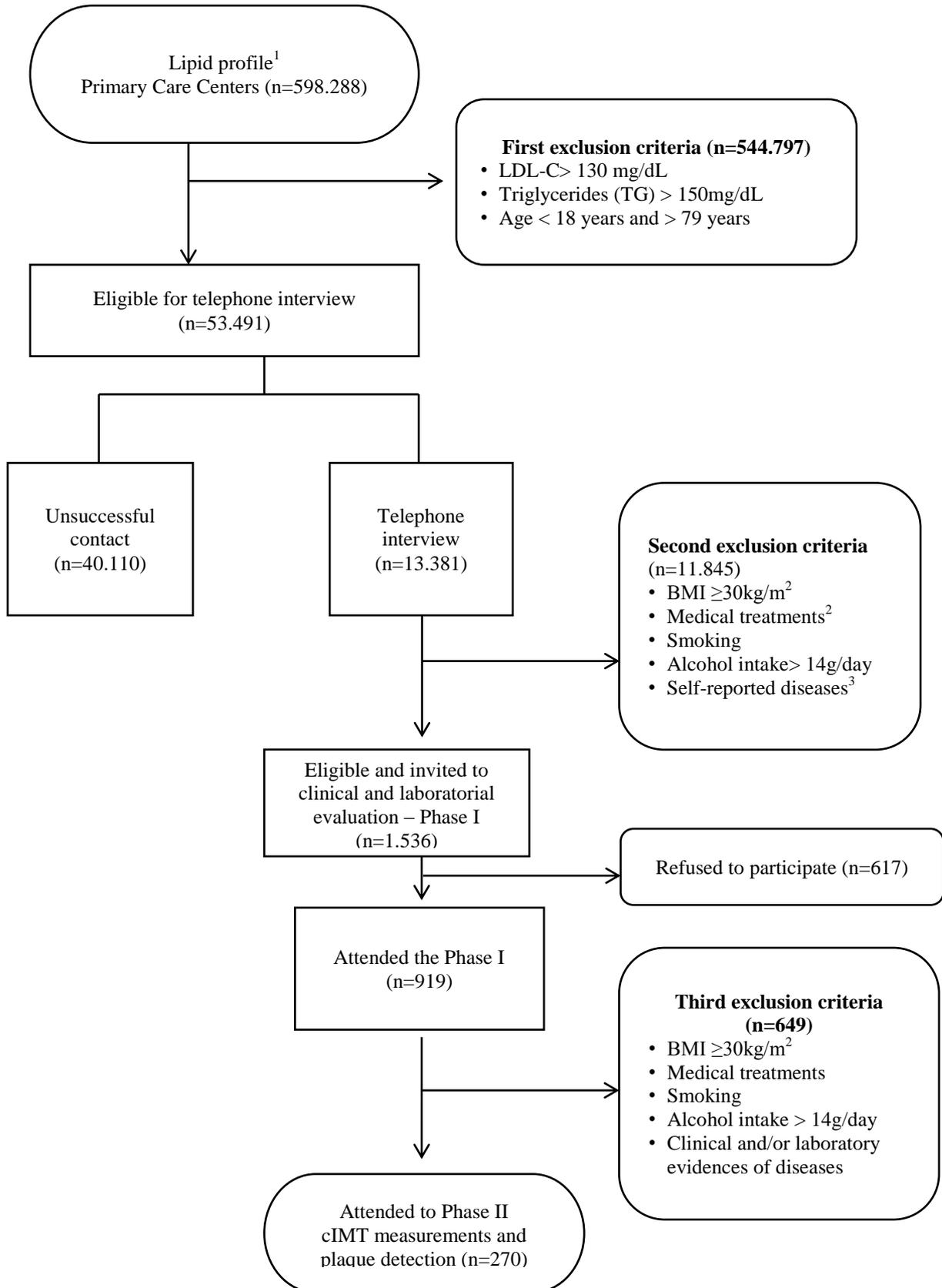


Figure 1: Adapted flow-diagram of the study [17]. 1Lipid profile is characterized by plasma levels of total cholesterol, LDL-C, triglycerides, and HDL-C. 2Medical treatments not eligible were defined as those who interfere with lipids metabolism, as lipid-lowering drugs, thyroid hormones, oral contraceptives, hormonal replace therapy, among others. 3Were excluded individuals with thyroid dysfunction, diabetes mellitus, metabolic syndrome, hypertension, hepatic diseases, kidney diseases, pulmonary diseases, autoimmune and chronic inflammatory diseases, infectious and parasitic disorders. During the process, exclusions were made after Phase I based on the revaluation of the values of BMI, LDL-C, triglycerides, medical treatments, smoking, alcohol intake >14 g/day and evidence (clinical and/or laboratorial) of the presence of diabetes mellitus, hypertension, and other pathologies. In this last stage, 270 subjects were considered eligible and performed the cIMT measurements.

2.2 Clinical Protocol

In the admission (phase I), anthropometric assessment was carried out throughout measurements of weight, height, and body mass index (BMI, kg/m²). Systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP, respectively) was indirectly determined by measurements of the brachial artery, maintaining the same predetermined position and time procedures. Race was self-reported and answered according to the volunteer's will and criteria.

2.3 Biochemical analysis

Blood samples were collected after 12h fasting, separating serum and plasma by centrifugation (4°C, 1000 x g, 10 minutes), and stored at -80°C until analysis.

Fresh samples were analyzed in the Modular Analytics EVO P (Roche, Basel, Switzerland) using Roche (Mannheim, Germany) reagents for total cholesterol (TC), HDL-C (high-density lipoprotein cholesterol) and triglycerides (TG), uric acid (enzymatic methods), urea, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyltransferase (GGT), alkaline phosphatase (AP) and creatinine (kinetic methods).

LDL-C was calculated by the Friedwald equation, and VLDL-C (very low-density lipoprotein cholesterol) was estimated by the formula TG/5, the use of NHDL-C also serves as a parameter for the assessment of dyslipidemia, which can be obtained by subtracting the HDL-C value from the TC value (NHDL-C = TC - HDL-C) [18].

Apolipoproteins A-I, B-100 and lipoprotein (a) (Lp(a)) were quantified by nephelometry in automated system (BNII/Marburg, Germany) using commercial reagents Dade-Behring® (Manheinn, Germany).

High-sensitivity C-reactive protein (hsPCR) was assessed by immunoturbidimetry using the Tina-quant® CRP (Roche Diagnostics®, Mannheim, Germany). Insulin levels was determined using the Human Insulin ELISA commercial assay (Millipore, Billerica, MA, USA), and glucose, using Roche reagents (Mannheim, Germany). In addition, the

Homeostasis Model Assessment (HOMA) index was determined using a Calculator version 2.2.2 (University of Oxford, UK) [19].

Intestinal cholesterol absorption (campesterol and β -sitosterol) and synthesis markers (desmosterol and lathosterol) were measured by gas chromatography coupled to a mass spectrophotometer (Shimadzu GCMS-QP 2010 Plus, Kyoto, Japan) with the GC/MS software solution version 2.5 [20–23]. Concentrations of plasma steroid markers were presented as relative values, correcting the total plasma cholesterol concentration [20].

The analysis was performed with selected ion monitoring (SIM) using one target and two qualifier ions. The selected ions, where the first number is the target ion and all others are qualifiers ions, utilized for sterol identification were: 217, 149 and 109m/z for 5α -cholestane; 119, 351 and 253m/z for desmosterol, 255, 213 and 458 m/z for lathosterol, 129, 382 and 343m/z for campesterol and 129, 486 and 357m/z for β -sitosterol. Quantitation by GC–MS/SIM was based on the peak area ratios of the target ions of the analyte to that of the internal standard (5α -cholestane) and compared to concentrations of matched calibration standards [21–23].

2.4 Carotid intima-media thickness measurements and atherosclerotic plaque detection

The volunteers who attended the inclusion criteria described above were invited to cIMT measurements and atherosclerotic plaque detection, whose determinations were performed by a single-trained radiologist, blind to the study subjects.

Determinations were performed by high-resolution B-mode ultrasonography using a 6–9 MHz linear array ultrasound imaging system ATL HDI 3500 Ultrasound System (Advanced Technology Laboratories Ultrasound, Bothell, USA). All participants were examined in dorsal decubitus, with the head elevated about 20° and rotated 45°, and were performed five longitudinal measurements of segments of left and right common carotid arteries at the distal wall and 1 cm from the bifurcation. The imaging was performed initially to evaluate the common carotid artery with antero-oblique insonation above the clavicle and along the bulb and internal carotid artery, as previously described [24–26].

The EMIC values above the 75th percentile are considered to be high and indicative of increased risk of CVD [25], as the study participants fall into asymptomatic individuals, we chose to use the 90th percentile, the reference value of the EMI measure adopted was <0.90 mm, values equal to or greater than 0.90 mm were considered carotid thickening [24,25].

In addition to cIMT, a scan of the extracranial carotid of both sides to plaques investigation was performed. It was considered as atherosclerotic plaque if observed: the focal wall thickening with at least 0.5 mm toward the vessel lumen, focal wall thickening that is at least 50% greater than that of the surrounding vessel wall or focal region with cIMT above 1.5 mm that protrudes into the lumen that is distinct from the adjacent boundary [24,27].

2.5 Statistical analysis

The statistical analyses were performed using SAS System for Windows 9.1.3 (Statistical Analysis System /SAS Institute Inc., 2002-2003, NC, USA) and SPSS 22.0 (SPSS Inc., USA).

The distribution of all parameters was tested with Shapiro-Wilk normality test. Due to the absence of normality, the variables were expressed using median and interquartile ranges (25th and 75th percentiles). Numeric variables transformed in ranks in the absence of normal distribution.

Correlations were made between cIMT with the classic CVD risk parameters and with cholesterol synthesis and absorption markers; and between cholesterol synthesis and absorption markers with clinical and biochemical parameters using Spearman's correlation coefficients (ρ/r), nonparametric test.

The total group was separated according to the presence or absence of atherosclerotic plaques and compared using the Wilcoxon - Mann Whitney nonparametric test; the variables responses were transformed into ranks and adjust for age, sex, BMI, total cholesterol and NHDL-C (non high-density lipoprotein cholesterol).

Univariate and multiple linear regression analysis were used to evaluate the associations between cIMT with classical CVD risk parameters and with cholesterol synthesis and absorption markers, where the models were adjusted for sex, age, BMI, total cholesterol and non-HDL-C. The cholesterol synthesis and absorption markers were associated with anthropometrical and biochemical parameters. Results of multiple linear regression analysis are expressed as coefficients of determination (partial and total R^2). The stepwise criterion method was used for through multiple analyses.

Logistic regression analyzes were used to assess the relative risk, through the calculation of odds ratio (OR) for carotid atherosclerotic plaques, cIMT (≤ 0 , vs $> 0,9$ mm) and other variables. Models were adjusted for age, sex, BMI, total cholesterol and non-HDL-C.

The tests were considered significant at the probability value (p) of 0.05 or less.

3.0 RESULTS

The baseline characteristics of the participants are shown in table 1.

Table 1: Clinical, anthropometrical, and biochemical characteristics of all subjects

Parameters	N	Medians (P25-P75)
Age (years)	270	44 (33-54)
Sex (F/M)	139/131	
Race (White/non-White)	226/44	
Plaques (without/with)	219/51	
BMI (Kg/m ²)	270	23 (21-25)
SBP (mmHg)	270	120 (110-126)
DBP (mmHg)	270	80 (70-80)
Mean cIMT (mm)	270	0.60 (0.50-0.72)
Glucose (mg/dL)	270	83 (78-88)
Insulin (uU/mL)	270	4 (2.4-5.8)
HOMA-IR	270	0.82 (0.46-1.20)
TC (mg/dL)	270	169 (147-194)
HDL-C (mg/dL)	270	58 (37-75)
NHDL-C (mg/dL)	270	114 (94-132)
LDL-C (mg/dL)	270	101 (85-117)
TG (mg/dL)	270	73 (55-96)
VLDL-C (mg/dL)	270	15 (11-19)
hs-CRP (mg/L)	270	0.8 (0.4-1.6)
Cholesterol Synthesis Markers*		
Desmosterol	253	0.32 (0.24-0.41)
Lathosterol	255	0.49 (0.35-0.72)
Cholesterol Absorption Markers*		
Campesterol	253	1.18 (0.85-1.62)
β -Sitosterol	251	1.27 (0.74-2.06)
Synthesis/absorption ratios*		
Desmosterol/Campesterol	253	0.26 (0.16-0.41)
Desmosterol/ β -Sitosterol	251	0.21 (0.14-0.43)
Lathosterol/Campesterol	253	0.41 (0.26-0.68)
Lathosterol/ β -Sitosterol	251	0.38 (0.22-0.77)

N=absolute number; Data are represented as median (interquartile range: 25th percentile 75th percentile); F=Female; M=Male; BMI=Body mass index; SBP= systolic blood pressure; DBP=diastolic blood pressure; cIMT=carotid intima-media thickness; HOMA= homeostasis model assessment; TC = total cholesterol; HDL-C= high-density lipoprotein cholesterol; NHDL-C= non high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C= low-density lipoprotein cholesterol; TG=triglycerides; VLDL-C= very low-density lipoprotein cholesterol; hs-CRP = high-sensitivity C-reactive protein;* 10² ug/mL/cholesterol as mg/dL.

The studied population comprised both sexes (51% female), with median age equal to 44 years old. In addition, the participants were normolipidemic, non-obese (BMI

23 kg/m²), with cholesterol absorption markers (campesterol, β -sitosterol) higher than the synthesis markers (lathosterol, desmosterol).

Regarding cIMT, 12% (n = 34) present values above the cut-off level ≥ 0.9 mm. The presence of carotid plaques was reported for 19% (n= 51) of the study group.

Table 2 shows Spearman's correlation test between mean cIMT, clinical and biochemical parameters related to CVD risk and cholesterol synthesis and absorption markers.

Table 2: Spearman's correlation coefficients of cIMT with classical CVD risk parameters and with cholesterol synthesis and absorption markers

Parameters	R	p- values
Age (years)	0.66	<0.0001
BMI (Kg/m ²)	0.16	0.011
SBP (mmHg)	0.34	<0.0001
DBP (mmHg)	0.19	0.001
Glucose (mg/dL)	0.26	<0.0001
Insulin (uU/mL)	0.00	NS
HOMA-IR	0.06	NS
TC (mg/dL)	0.34	<0.0001
HDL-C (mg/dL)	0.09	NS
NHDL-C (mg/dL)	0.37	<0.0001
LDL-C (mg/dL)	0.36	<0.0001
TG (mg/dL)	0.20	0.001
VLDL-C (mg/dL)	0.20	0.001
hs-CRP (mg/L)	0.17	0.006
Cholesterol Synthesis Markers*		
Desmosterol	-0.01	NS
Lathosterol	0.09	NS
Cholesterol Absorption Markers*		
Campesterol	-0.10	NS
β -Sitosterol	-0.10	NS
Synthesis/absorption ratios*		
Desmosterol/Campesterol	0.06	NS
Desmosterol/ β -Sitosterol	0.07	NS
Lathosterol/Campesterol	0.11	NS
Lathosterol/ β -Sitosterol	0.13	0.041

Number=238-270; r/rho = Spearman's correlation coefficient; p<0,05 significance; all variables transformed into ranks due of the absence of normal distribution; BMI=Body mass index; SBP=systolic blood pressure; DBP=diastolic blood pressure; TC=total cholesterol; HDL-C= high-density lipoprotein cholesterol; NHDL-C= non high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C= low-density lipoprotein cholesterol; TG=triglycerides; VLDL-C= very low-density lipoprotein cholesterol; hs-CRP = high-sensitivity C-reactive protein; ; * 10² ug/mL/cholesterol as mg/dL.

Spearman's correlations analysis found positives correlations, as expected, between cIMT and the following variables: age ($r=0.66 - p<0.001$), BMI ($r=0.16 - p=0.01$), SBP ($r=0.34 - p<0.001$), DBP ($r=0.19 - p=0.001$), glucose ($r=0.25 - p<0.001$), TC ($r=0.34 - p<0.001$), NHDL-C ($r=0.37 - p<0.001$), triglycerides ($r=0.20 - p=0.001$), LDL-C ($r=0.36 - p<0.001$), VLDL-C ($r=0.20 - p=0.001$) and hs-CRP ($r=0.17 - p=0.006$). There was no correlation of cIMT with cholesterol synthesis (lathosterol, desmosterol) and absorption markers (campesterol, β -sitosterol), but a positive however weak correlation was found for the lathosterol/ β -sitosterol ratio ($r=0.13 - p=0.041$).

The table 3 presents relationships of cholesterol synthesis and absorption markers with classical CVD risk factors, using univariate and multivariate linear regression analysis.

Table 3: Relationships of markers of cholesterol synthesis and absorption with classical CVD risk factors

Independent Variables	Univariate		Multivariate			
	B	p-values	β	p-values	partial R ²	Total R ²
Desmosterol (n= 241)						
Sex (F/M)	32.50 >M	0.001				
TG (mg/dL)	0.47	0.004				0.03
hs-CRP (mg/L)	-2.27	0.03	-4.29	0.004	0.03	
Lathosterol (n=241)						
Sex (F/M)	24.18 >M	0.01				
BMI (Kg/m ²)	8.95	<0.0001	5.88	0.002	0.04	0.04
TG (mg/dL)	0.70	<0.0001				
Campesterol (n= 240)						
Age (years)	-0.85	0.019	-1.31	0.001	0.03	
BMI (Kg/m ²)	-6.71	0.0003				0.09
TG (mg/dL)	-0.74	<0.0001				
hs-CRP (mg/L)	-3.00	0.006	-5.15	0.01	0.06	
β-Sitosterol (n=240)						
Age (years)	-0.71	0.05				
BMI (Kg/m ²)	-7.57	<0.0001	-5.26	0.01	0.04	0.06
TG (mg/dL)	-0.57	0.0003				
hs-CRP (mg/L)	-2.12	0.05	-3.22	0.02	0.02	
Desmosterol/Campesterol (n=240)						
Age (years)			1.03	0.01	0.02	
BMI (Kg/m ²)	4.10	0.03				0.02
TG (mg/dL)	0.80	<0.0001				
Desmosterol/β-Sitosterol (n=241)						
BMI (Kg/m ²)	5.32	0.004				
TG (mg/dL)	0.71	<.0001				

Lathosterol/Campesterol (n=240)						
BMI (Kg/m ²)	10.31	<0.0001	7.07	0.001	0.06	
TG (mg/dL)	0.91	<0.0001				0.08
hs-CRP (mg/L)			2.82	0.04	0.02	
Lathosterol/β-Sitosterol (n=238)						
BMI (Kg/m ²)	10.55	<0.0001	7.6	0.0001	0.09	
TG (mg/dL)	0.75	<0.0001				0.09

n=number; β =estimated parameter; Linear Regression univariate and multivariate; $p \leq 0,05$ significance; all variables transformed into ranks due of the absence of normal distribution; F=female; M= male; TG=triglycerides; BMI=Body mass index; hs-CRP = high-sensitive C-reactive protein.

For the synthesis markers, the desmosterol, was directly associated with triglycerides and with hs-CRP the association was inverse and higher values were found in males, in the multiple analysis hs-CRP inversely associated to desmosterol, relationship explained in 3% (percent). The lathosterol were directly associated with BMI, triglycerides and higher values were found in males, in the multiple analysis the there was a direct association with BMI a relationship explained in 4%.

For the absorption markers, campesterol there was inversely associated with age, BMI, triglycerides and hs-CRP. In the multivariate analysis the set that best explains plasma campesterol concentrations were age and hs-CRP inversely, explain at 9%. The β -sitosterol was inversely associated with age, BMI, triglycerides and hs-PCR, in the multivariate analysis, the group that best explains the plasma concentrations of β -sitosterol were inversely associated BMI and hs-CRP, explaining in 6%.

The desmosterol/campesterol ratio was directly associated BMI and triglycerides, the variable explain that best relates age (direct) in 2%; desmosterol/ β -sitosterol was directly associated BMI and triglycerides, no variables were selected for multivariate analysis; lathosterol/campesterol was directly associated with BMI, triglycerides and hs-CRP the variables explain that best relate directly is BMI and hs-CRP in 8%; lathosterol/ β -sitosterol was directly associated BMI and triglycerides, in multivariate the relationship is direct with BMI in 9%.

The percentages of these relationships in the multiple analysis were low because the variables presented low relation.

The univariate and multivariate linear regression analyses were performed to investigate the associations between cIMT and the cholesterol synthesis and absorption markers. The analysis was adjusted for age, sex, BMI, total cholesterol and NHDL-cholesterol and no significant associations were found.

The subjects were stratified according to the presence or absence of atherosclerotic plaques. The comparison data are presented according to their clinical, anthropometrical and biochemical characteristics, as shown in Table 4.

Table 4: Comparative analyses of clinical, anthropometrical, and biochemical characteristics of subjects according to the presence or absence of atherosclerotic plaques

Group	Without Plaques	With Plaques	p[^]
Sex (n, F/M)	115/104	24/27	0.510
Parameters	Medians (P25-P75)	Medians (P25-P75)	p[^]
Age (years)	41 (30-50)	55 (49-62)	0.0001
BMI (Kg/m ²)	23 (22-25)	23 (21-25)	NS
SBP (mmHg)	120(110-120)	130 (120-140)	0.0001
DBP (mmHg)	80(70-80)	80 (80-90)	0.001
Mean cIMT (mm)	0.6 (0.5-0.7)	0.9 (0.7-1.2)	0.0001
Glucose (mg/dL)	83 (78-88)	86 (81-91)	0.020
TC (mg/dL)	166 (144-192)	183 (167-206)	0.0001
HDL-C (mg/dL)	55 (37-75)	66 (39-74)	NS
NHDL-C (mg/dL)	111 (92-128)	128 (116-140)	0.0001
LDL-C (mg/dL)	99 (82-114)	113 (100-122)	0.0001
TG (mg/dL)	71 (53-91)	84 (65-102)	0.010
VLDL-C (mg/dL)	14 (11-18)	17 (13-20)	0.001
hs-CRP (mg/L)	0.8 (0.4-1.4)	1.2 (0.7-2.5)	0.002
Cholesterol Synthesis Markers*			
Desmosterol	0.32 (0.23-0.41)	0.36 (0.28-0.43)	NS
Lathosterol	0.50 (0.35-0.75)	0.48 (0.33-0.64)	NS
Cholesterol Absorption Markers*			
Campesterol	1.15 (0.83-1.58)	1.38 (0.93-1.76)	NS
β -Sitosterol	1.22 (0.73-2.01)	1.50 (0.89-2.17)	NS
Synthesis/absorption ratios*			
Desmosterol/Campesterol	0.26 (0.16-0.42)	0.26 (0.15-0.37)	NS
Desmosterol/ β -Sitosterol	0.22 (0.14-0.44)	0.19 (0.15-0.42)	NS
Lathosterol/Campesterol	0.43 (0.28-0.75)	0.35 (0.23-0.49)	0.030
Lathosterol/ β -Sitosterol	0.39 (0.22-0.81)	0.29 (0.21-0.55)	NS

Data are represented as median (interquartile range 25-75th percentiles); Number (n) of subjects: without plaques 203-219; with plaques 48-51; F=Female; M=Male; BMI=Body mass index; SBP= systolic blood pressure; DBP=diastolic blood pressure; cIMT = carotid intima-media thickness; TC=total cholesterol; HDL-C= high-density lipoprotein cholesterol; NHDL-C= non high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C= low-density lipoprotein cholesterol; TG=triglycerides; VLDL-C= very low-density lipoprotein cholesterol; hs-CRP = high-sensitivity C-reactive; [^] Chi-square test (X^2); [^] Mann-Whitney Wilcoxon W test, p-values $\leq 0,05$ significance; NS=non-significance; * 10^2 ug/mL/cholesterol as mg/dL.

Among the 270 individuals who underwent carotid ultrasound, 19% had atherosclerotic plaques (N = 51), and the median age was 55 years; there was no difference between sexes in the groups. Mean cIMT among those with plaque was 0.9 mm (0.7-1.2 mm), and the mean cIMT was 39% higher in subjects with plaque.

Age, blood pressure, atherogenic lipoproteins, glucose and hs-CRP presented significantly higher values in the group with plaques, but the alterations presented were among the reference values cited in the literature. Subjects with plaque showed higher absorption markers, but the data presented were not significant. There was a 20% reduction in the lathosterol/campesterol ratio. Such proportion provides an overall assessment of cholesterol homeostasis, as they consider the relative contributions of cholesterol synthesis and absorption [28].

Table 5 shows univariate logistic regression analysis for the presence of plaques and cholesterol synthesis and absorption markers.

Table 5: Univariate logistic regression analyses for the presence of plaques.

Variables	Unit	OR	CI 95% (OR)	p-values
Desmosterol*	1.0	5.39	(0.71-41.03)	NS
Lathosterol*	1.0	0.36	(0.10-1.28)	NS
Campesterol*	1.0	1.71	(1.04-2.82)	0.04
β -Sitosterol*	1.0	1.26	(0.93-1.71)	NS
Desmosterol/campesterol	1.0	0.46	(0.09-2.36)	NS
Desmosterol/ β -Sitosterol	1.0	0.70	(0.21-2.35)	NS
Lathosterol/campesterol	1.0	0.29	(0.11-0.80)	0.02
Lathosterol/ β -Sitosterol	1.0	0.45	(0.22-0.95)	0.04

OR=Odds Ratio; CI= confidence interval; $p \leq 0,05$; NS=non-significance

Logistic Regression Analysis (univariate model) adjusted by: age, gender, BMI (Body mass index), Total Cholesterol and NHDL-C= non high-density lipoprotein cholesterol; * 10^2 ug/mL /cholesterol as mg/dL.

Significant associations were found in the univariate logistic regression analyses, but none in the multivariate analyses.

There was an increase of 71% (OR 1.71), $p=0.04$, in the chance of plaques occurring for the increase of 1 unit of campesterol, and a reduction of 71% (OR = 0.29), $p=0.02$, in the chance of plaques occurring with the increase of 1 unit of the lathosterol/campesterol ratio. There was a 55% reduction (OR 0.45), $p=0.04$ in the chance of plaques occurring to increase one unit of the lathosterol/ β -sitosterol ratio.

4.0 DISCUSSION

This work showed important evidence that the increase in plasma concentrations of campesterol was directly and individually associated with the odds ratio for the occurrence of atherosclerotic plaques and changes in cholesterol homeostasis, explained by the reasons for synthesis/absorption of cholesterol (lathosterol/campesterol and lathosterol/ β -sitosterol), were inversely associated with the odds ratio for the occurrence of atherosclerotic plaques, suggesting that cholesterol homeostasis imbalances are related to subclinical atherosclerosis and subsequent cardiovascular disease in asymptomatic individuals and not the measure of cIMT (30).

In the population of this study we did not find associations between cIMT and the synthesis markers (desmosterol and lathosterol) and absorption (campesterol and β -sitosterol) cholesterol, similar results were observed in a population of young Finnish men in their usual diet where they were not observed associations or correlations between cholesterol synthesis and absorption with a vascular structure, measured by cIMT (102)..

Of the individuals studied, 12% had carotid thickening and 19% of individuals had carotid plaque, a meta-analysis published in 2019, gathered information from world populations and estimated a frequency of 28% for EMI and 21% of carotid plaques, however this frequency was estimated in populations that brought together some risk factors such as hypertension, diabetes mellitus and old age (103).

When we evaluated other studies with individuals at high cardiovascular risk, that is, with a diagnosis of established CVD and carotid stenosis associated with cholesterol homeostasis, we observed high concentrations of absorption markers and decreased synthesis, suggesting that absorption markers can be highly independent predictors significant CVD (104), another study published in 2010 involving a population of 583 individuals hospital employees aged 25-60 years with no prevalent cardiovascular disease, found a correlation between cholesterol synthesis markers with cIMT, while cholesterol absorption markers showed a weakly negative correlation (89).

When assessing classic risk factors with cIMT in asymptomatic individuals, we found a positive association with age, sex, blood pressure, these results have often been observed in studies involving metabolic syndrome, hypertension, diabetes mellitus or cardiovascular disease (78,104).

Elevated levels of cholesterol synthesis markers (lathosterol) and ratios lathosterol/campesterol and lathosterol/ β -sitosterol) ratios were positively associated with

BMI, in this study. It has been observed in other studies with overweight or obese individuals, suggesting that increased endogenous cholesterol (lathosterol) is associated with increased resistance to insulin, increased inflammatory activity and, consequently, obesity, being considered an indicative of high cardiovascular risk, however, these associations are reversed after diet-induced weight loss(36,105,106). Cholesterol metabolism in patients with metabolic syndrome, insulin resistance, abdominal obesity and diabetes mellitus generally exhibits a reduced absorption pattern and high cholesterol synthesis (107).

The cholesterol absorption and synthesis markers showed expected inverse associations, reflecting an apparent compensatory change in cholesterol metabolism for the reasons of synthesis markers for absorption markers (lathosterol/campesterol and lathosterol/ β -sitosterol) reflecting the hemostasis of body cholesterol (4,30).

Individuals without atherosclerotic plaque showed higher concentrations of the synthesis/absorption ratio (lathosterol/campesterol), which could explain a compensatory mechanism of cholesterol body homeostasis, there is an inverse relationship between endogenous synthesis and the intake of dietary cholesterol, since the change in one results in a compensatory and opposite change in the other, keeping the cholesterol content in the entire body regulated (4,107).

Imbalances in cholesterol homeostasis, as seen in individuals with plaque, may entail concentrations of phytosterols in the serum and oxidation metabolites of absorption markers. The accumulation of such factors in atherosclerotic plaques increases inflammatory reactions and causes cell death, which is believed to promote the formation of the necrotic plaque nucleus as well as the destabilization of plaques (33,108,109). In a previous study (110), high levels of plant sterols were associated with increased cardiovascular risk due to sterol deposition on the cardiovascular tissue, which when compared to cholesterol concentration, oxidized phytosterols can be pro-atherogenic mediators of cardiovascular risk(88,111).

Cholesterol absorption (campesterol) appears to be associated with cardiovascular risk, as measured by the occurrence of carotid plaques. A study published by Luister et al, evaluated 104 patients with severe aortic stenosis and underwent replacement of the aortic valve, this valve was analyzed showing that the concentrations of plant sterols in the tissue of the aortic valve correlate with the extent of coronary disease (88).

Vegetable sterols in atheromatous tissues are entirely of dietary origin, transported mainly with LDL-C and HDL-C in the circulation(112), including arterial wall without injury or with atherosclerosis, therefore, the greater the efficiency of intestinal absorption of plant

sterols the greater its serum level, suggesting that the content of plant sterols in atheromatous tissues will also be elevated (110).

Since cholesterol was a factor responsible for the formation of atheroma, the increase in plant sterols first in the serum followed by an increase in arterial walls may have contributed to the development of atherosclerotic plaque (109).

It is well known that dietary supplementation with plant sterol is associated with clinically relevant reductions in LDL-C concentrations, and its use in foods is approved by health professionals as a therapeutic option to control hypercholesterolemia, however, it has been suggested that the use long-term phytosterols in order to provide cardiovascular protection remains a knowledge gap (48,51,113).

This work had some limitations. First, being a cross-sectional study, the cardiovascular risk of individuals in the long term was not evaluated; such limitation could be solved by a prospective observation study of the research participants, considering the eating habits that were not controlled before the enrollment in the study. Therefore, we cannot exclude the possibility that dietary variations have substantially influenced the amount of plant sterols ingested.

Hence, considering the results presented, it is suggested that cholesterol synthesis and absorption are interrelated and play an important role in regulating homeostasis and the cholesterol absorption marker, campesterol, may have reflected changes in body cholesterol homeostasis with atherogenic potential.

CONCLUSION

In summary, the study suggested a direct association of campesterol with carotid atherosclerotic plaques and an inverse association with rates of synthesis/absorption, thus reflecting changes in body cholesterol balance, and a possible increase in absorption and decreased synthesis may be associated with carotid atherosclerosis.

FUNDING

This work was funded by research grants from the Coordination for the Improvement of higher education personnel - Brazil (CAPES), in State University of Campinas (UNICAMP) (001).

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the Municipal Health Department of Campinas for furnishing the data and authorization of their use.

We thank Dr. Jamal Baraccat from the Department of Radiology at the School of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), for performing the carotid measurements.

We thank the Statistics Department, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP for the statistical assistance.

DECLARATION OF COMPETING INTEREST

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

REFERENCES

- [1]T. Gojkovic, S. Vladimirov, V. Spasojevic-kalimanovska, A. Zeljkovic, J. Vekic, D. Kalimanovska-ostric, I. Djuricic, S. Sobajic, Can non-cholesterol sterols and lipoprotein subclasses distribution predict different patterns of cholesterol metabolism and statin therapy response?, *Clin Chem Lab Med.* 55 (2017) 447–457. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0505>.
- [2]S. Mashnafi, J. Plat, R.P. Mensink, S. Baumgartner, Non-Cholesterol Sterol Concentrations as Biomarkers for Cholesterol Absorption and Synthesis in Different Metabolic Disorders: A Systematic Review, *Nutrients.* 11 (2019) 124. <https://doi.org/10.3390/nu11010124>.
- [3]V.M. Olkkonen, H. Gylling, E. Ikonen, Plant sterols, cholesterol precursors and oxysterols: Minute concentrations—Major physiological effects, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 169 (2017) 4–9. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.12.026>.
- [4]T.A. Miettinen, H. Gylling, J. Viikari, T. Lehtim, O.T. Raitakari, Synthesis and absorption of cholesterol in Finnish boys by serum non-cholesterol sterols The cardiovascular risk in young Finns study, *Atherosclerosis.* 200 (2008) 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.11.028>.
- [5]O. Weingärtner, T. Pinsdorf, K.S. Rogacev, L. Blömer, Y. Grenner, S. Gräber, C. Ulrich, M. Girndt, M. Böhm, D. Fliser, U. Laufs, D. Lütjohann, G.H. Heine, The relationships of markers of cholesterol homeostasis with carotid intima-media thickness, *PLoS One.* 5 (2010) 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013467>.
- [6]N.R. Matthan, M. Pencina, J.M. LaRocque, P.F. Jacques, R.B. D’Agostino, E.J. Schaefer, A.H. Lichtenstein, Alterations in cholesterol absorption/synthesis markers characterize Framingham Offspring Study participants with CHD, *J. Lipid Res.* 50 (2009) 1927–1935. <https://doi.org/10.1194/jlr.p900039-jlr200>.
- [7]E.H.S. Santos, P.J. Dos Santos Neto, I.D.S. Santos, Carotid intima-media thickness in the brazilian longitudinal study of adult health (ELSA-brasil): A narrative review, *Sao Paulo Med. J.* 136 (2018) 64–72. <https://doi.org/10.1590/1516-3180.2017.0272141017>.
- [8]Q. Hou, S. Li, Y. Gao, H. Tian, Relations of lipid parameters, other variables with carotid intima-media thickness and plaque in the general Chinese adults: An observational study, *Lipids Health Dis.* 17 (2018) 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0758-9>.
- [9]T.Z. Naqvi, M.-S. Lee, Carotid Intima-Media Thickness and Plaque in Cardiovascular Risk Assessment, *JACC Cardiovasc. IMAGING.* 7 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2013.11.014>.

- [10]L. Tschiderer, P. Willeit, Carotid intima-media thickness predicts carotid plaque development : Meta-analysis of seven studies involving 9341 participants, (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1111/eci.13217>.
- [11]T.A. Miettinen, H. Gylling, M. Hallikainen, M. Juonala, L. Räsänen, J. Viikari, O.T. Raitakari, Relation of non-cholesterol sterols to coronary risk factors and carotid intima-media thickness: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study, *Atherosclerosis*. 209 (2010) 592–597. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.10.013>.
- [12]S. Nunes, I.M. Bensenor, P.A. Lotufo, M. Passarelli, E.R. Nakandakare, E. Carlos, R. Quint, The coronary artery calcium score is linked to plasma cholesterol synthesis and absorption markers : Brazilian Longitudinal Study of Adult Health, 0 (2020) 1–12.
- [13]H. Gylling, J. Plat, S. Turley, H.N. Ginsberg, L. Ellegård, W. Jessup, P.J. Jones, D. Lütjohann, W. Maerz, L. Masana, G. Silbernagel, B. Staels, J. Borén, A.L. Catapano, G. De Backer, J. Deanfield, O.S. Descamps, P.T. Kovanen, G. Riccardi, L. Tokgözoğlu, M.J. Chapman, Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease, *Atherosclerosis*. 232 (2014) 346–360. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.11.043>.
- [14]O. Weingärtner, D. Lütjohann, T. Vanmierlo, S. Müller, L. Günther, W. Herrmann, M. Böhm, U. Laufs, M. Herrmann, Markers of enhanced cholesterol absorption are a strong predictor for cardiovascular diseases in patients without diabetes mellitus, *Chem. Phys. Lipids*. 164 (2011) 451–456. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.03.008>.
- [15]G. Silbernagel, G. Fauler, W. Renner, E.M. Landl, M.M. Hoffmann, B.R. Winkelmann, B.O. Boehm, W. März, The relationships of cholesterol metabolism and plasma plant sterols with the severity of coronary artery disease, *J. Lipid Res*. 50 (2008) 334–341. <https://doi.org/10.1194/jlr.p800013-jlr200>.
- [16]I. Andrade, L. Santos, F. Ramos, Cholesterol absorption and synthesis markers in Portuguese hypercholesterolemic adults: A cross-sectional study, *Eur. J. Intern. Med*. 28 (2016) 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2015.10.022>.
- [17]E.S. Parra, V.H. de S. Zago, N.B. Panzoldo, F. Alexandre, F. Vendrame, V.W. de M. Virginio, I.C. Vieira, M.S.D. Rodrigues, A. de S. Cassol, F. D’Alexandri, V.S. Castanho, R. Nakamura, J. Baracat, M.R.G. Danelon, R.C.S. Pozeti, A.C.C. Facin, H.M. da S. Honorio, S. de C.D. Mesquita, M.J. da Silva, M.C.F. Lot, V.S. Nunes, C.C. Leança, E.R. Nakandakare, E.C.R. Quintão, E.C. de Faria, Development of a clinical laboratory data base of hyper and hypo alpha lipoproteins in Campinas-SP and neighboring region, *J. Bras. Patol. e Med. Lab*. 49 (2013) 26–33. <https://doi.org/10.1590/s1676-24442013000100004>.
- [18]A. Faludi, I. MCO, S. JFK, C. APM, B. HT, A.N. A, B. A, P. AC, L. AMP, S.F.W. Sposito AC, Chagas ACP, Casella-Filho A, Simão AF, Alencar Filho AC, Caramelli B, Magalhães CC, Magnoni D, Negrão CE, Ferreira CES, Scherr C, Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose – 2017, *Arq Bras Cardiol*. 109 (2017).
- [19]S.E. Stern, K. Williams, E. Ferrannini, R.A. DeFronzo, C. Bogardus, M.P. Stern, Identification of individuals with insulin resistance using routine clinical measurements, *Diabetes mellitus*. 54 (2005) 333–339. <https://doi.org/10.2337/diabetes mellitus.54.2.333>.
- [20]T.A. Miettinen, Gas-liquid chromatographic determination of fecal neutral sterols using a capillary column, *Clin Chim Acta*. 124(2) (1982) 245–8.
- [21]K.M. Phillips, D.M. Ruggio, J.A. Bailey, Precise quantitative determination of phytosterols, stanols, and cholesterol metabolites in human serum by capillary gas-liquid chromatography, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 732(1) (1999) 17–29.
- [22]H.S.M. Ahmida, P. Bertucci, L. Franz, R. Massoud, C. Cortese, A. Lala, G. Federici, Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography – mass spectrometry (GC – MS) with selective ion monitoring (SIM), *J. Chromatogr. B*. 842 (2006) 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.05.024>.
- [23]V.S. Nunes, C.C. Leança, N.B. Panzoldo, E. Parra, P.M. Cazita, E.R. Nakandakare, E.C. De Faria, E.C.R. Quintão, HDL-C concentration is related to markers of absorption and of cholesterol synthesis : Study in subjects with low vs . high HDL-C, *Clin. Chim. Acta*. 412 (2011) 176–180. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.09.039>.
- [24]J.H. Stein, C.E. Korcarz, R.T. Hurst, E. Lonn, C.B. Kendall, E.R. Mohler, S.S. Najjar, C.M. Rembold, W.S. Post, Use of Carotid Ultrasound to Identify Subclinical Vascular Disease and Evaluate

- Cardiovascular Disease Risk: A Consensus Statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force Endorsed by the Society for Vascular Medicine, *Circulation*. 118(12) (2008) 2574–2582. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.182847>.
- [25] C.M.V. Freire, M.L. De Alcantara, S. Nascimento, S. Israel, O. Veloso, C. Lucia, L. Porto, M. Vinícius, L. Barros, A.C. Lopes, A. Cláudia, G. Pereira, F.S. Barros, J. Aldo, R. Teodoro, A. Luiz, J.C. Moreira, A. Rabischoffsky, Recomendação para a Quantificação pelo Ultrassom da Doença Aterosclerótica das Artérias Carótidas e Vertebrais: Grupo de Trabalho do Departamento de Imagem Cardiovascular da Sociedade, *Arq Bras Cardiol*. 28 (2015) e1-64. <https://doi.org/10.5935/2318-8219.20150018>.
- [26] M.W. Lorenz, S. von Kegler, H. Steinmetz, H.S. Markus, M. Sitzer, Carotid Intima-Media Thickening Indicates a Higher Vascular Risk Across a Wide Age Range, *Stroke*. 37 (2005) 87–92. <https://doi.org/10.1161/01.str.0000196964.24024.ea>.
- [27] P.C. Simons, Common carotid intima-media thickness and arterial stiffness: indicators of cardiovascular risk in high-risk patients. The SMART Study (Second Manifestations of ARterial disease), *Circulation*. 100(9) (1999) 951–77.
- [28] M.J. Nissinen, H. Gylling, T.A. Miettinen, Responses of surrogate markers of cholesterol absorption and synthesis to changes in cholesterol metabolism during various amounts of fat and cholesterol feeding among healthy men, *Br. J. Nutr.* 99 (2008) 370–378. <https://doi.org/10.1017/S0007114507811998>.
- [29] I.M.A.C.A. Ramalho, Contributo dos marcadores de síntese e de absorção do colesterol na terapêutica hipocolesterolemizante, (2014).
- [30] P. Song, Z. Fang, H. Wang, Y. Cai, K. Rahimi, Y. Zhu, F.G.R. Fowkes, F.J.I. Fowkes, I. Rudan, Global and regional prevalence, burden, and risk factors for carotid atherosclerosis: a systematic review, meta-analysis, and modelling study, *Lancet Glob. Heal.* 8 (2020) e721–e729. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30117-0](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30117-0).
- [31] T. Słomka, A. Drelich-zbroja, M. Jarzabek, Intima – media complex thickness and carotid atherosclerotic plaque formation in Lublin ’ s population in the context of selected comorbidities, *J Ultrason*. 18 (2018) 133–139. <https://doi.org/10.15557/JoU.2018.0019>.
- [32] G. Lupattelli, M. Pirro, M.R. Mannarino, D. Siepi, A.R. Roscini, G. Schillaci, E. Mannarino, Visceral fat positively correlates with cholesterol synthesis in dyslipidaemic patients, *Eur. J. Clin. Invest.* 42 (2012) 164–170. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2011.02572.x>.
- [33] S. de Vuono, M.A. Ricci, D. Siepi, M. Boni, A. Gentili, M. Scavizzi, G. Daviddi, P. Labate, A.R. Roscini, Laparoscopic sleeve gastrectomy modifies cholesterol synthesis but not cholesterol absorption, *Obes. Res. Clin. Pract.* 11 (2017) 118–122. <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2016.12.004>.
- [34] G. Lupattelli, S. De Vuono, E. Mannarino, Patterns of cholesterol metabolism: Pathophysiological and therapeutic implications for dyslipidemias and the metabolic syndrome, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 21 (2011) 620–627. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2011.04.010>.
- [35] M.S. Afonso, R.M. Machado, M.S. Lavrador, E. Carlos, R. Quintao, K.J. Moore, A.M. Lottenberg, Molecular Pathways Underlying Cholesterol Homeostasis, *Nutrients*. 10 (2018) 1–18. <https://doi.org/10.3390/nu10060760>.
- [36] P.A.S. Alphonse, P.J.H. Jones, Revisiting Human Cholesterol Synthesis and Absorption: The Reciprocity Paradigm and its Key Regulators, *Lipids*. 51 (2016) 519–536. <https://doi.org/10.1007/s11745-015-4096-7>.
- [37] E. Hovenkamp, I. Demonty, J. Plat, D. Lütjohann, R.P. Mensink, E.A. Trautwein, Biological effects of oxidized phytosterols: A review of the current knowledge, *Prog. Lipid Res.* 47 (2008) 37–49. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2007.10.001>.
- [38] T.A. Miettinen, M. Railo, M. Lepäntalo, H. Gylling, Plant sterols in serum and in atherosclerotic plaques of patients undergoing carotid endarterectomy, *J. Am. Coll. Cardiol.* 45 (2005) 1794–1801. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.02.063>.
- [39] O. Weingärtner, I. Bogeski, C. Kummerow, S.H. Schirmer, C. Husche, T. Vanmierlo, G. Wagenpfeil, M. Hoth, M. Böhm, D. Lütjohann, U. Laufs, Plant sterol ester diet supplementation increases serum plant sterols and markers of cholesterol synthesis, but has no effect on total cholesterol levels, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 169 (2017) 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.07.016>.

- [40]A. Luister, H.F. Schött, C. Husche, H.J. Schäfers, M. Böhm, J. Plat, S. Gräber, D. Lütjohann, U. Laufs, O. Weingärtner, Increased plant sterol deposition in vascular tissue characterizes patients with severe aortic stenosis and concomitant coronary artery disease, *Steroids*. 99 (2015) 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.03.011>.
- [41]C.E. Cabral, M.R.S.T. Klein, Phytosterols in the Treatment of Hypercholesterolemia and Prevention of Cardiovascular Diseases, *Arq. Bras. Cardiol.* (2017) 475–482. <https://doi.org/10.5935/abc.20170158>.
- [42]S. AbuMweis, C.P.F. Marinangeli, J. Frohlich, P. J.H.Jones, Implementing Phytosterols Into Medical Practice as a Cholesterol-Lowering Strategy: Overview of Efficacy, Effectiveness, and Safety, *Can. J. Cardiol.* 30 (2014) 1225–1232. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cjca.2014.04.022>.

5 CONCLUSÃO

A aterosclerose subclínica é um indicador precoce da doença aterosclerótica e seu reconhecimento oportuno pode retardar ou prevenir a progressão para a doença cardiovascular estabelecida.

Mostramos neste estudo evidências sugestivas de associações da aterosclerose subclínica carotídea com marcadores séricos de síntese e absorção do colesterol em indivíduos saudáveis.

As análises de regressão logística univariada apontaram para uma relação direta do campesterol (fitoesterol marcador de absorção intestinal de colesterol) com a razão de chance de ocorrência de placas ateroscleróticas carotídeas, sugerindo um potencial papel aterogênico aos esteróis vegetais.

A mesma análise univariada foi realizada para duas razões da medida de síntese/absorção de colesterol ou precursor metabólito/fitoesterol: a latosterol/campesterol e a latosterol/ β -sitosterol. Ambas se associaram inversamente com a razão de chance de ocorrência de placas carotídeas, sugerindo um possível papel ateroprotetor.

A presença desta relação recíproca dos processos metabólicos entre síntese e absorção de colesterol em indivíduos saudáveis, indica que não só as concentrações de colesterol sérico, mas também as diferenças na homeostase do colesterol, como o aumento da absorção com diminuição da síntese ou vice-versa podem estar associadas ao desenvolvimento da aterosclerose.

A homeostase do colesterol corpóreo se dá pelo balanço entre a via exógena, caracterizada pelos processos de absorção, transporte e metabolização do colesterol proveniente da dieta, a via endógena caracterizada pela síntese *de novo* predominantemente hepática e a excreção fecal. Esteróis vegetais são de origem dietética, transportados no plasma principalmente através de lipoproteínas ricas em colesterol. Quanto maior a eficiência da absorção intestinal dos esteróis vegetais maior seu nível sérico.

Não foram encontradas associações entre a aterosclerose subclínica medida como espessamento mediointimal de carótidas e os marcadores de síntese e absorção de colesterol na regressão multivariada e na regressão logística, mas houve uma correlação positiva embora fraca, com a razão latosterol/ β -Sitosterol.

Ao avaliarmos a relação entre a aterosclerose subclínica e os fatores de risco cardiovasculares clássicos encontramos correlações positivas com idade, pressão arterial, índice de massa corpórea, glicose, colesterol total, LDL-Colesterol, NHDL-Colesterol,

VLDL-Colesterol, triglicérides e proteína C reativa, reiterando a presença de associações pró-aterogênicas.

Mostramos também que os marcadores de síntese e absorção de colesterol foram determinados por vários fatores de risco cardiovasculares na análise de regressão linear multivariada, a saber: idade, índice de massa corpórea, triglicérides e proteína C reativa, sugerindo a presença de possíveis outras associações pró-aterogênicas dos marcadores.

Os 270 voluntários do estudo foram selecionados como normolipidêmicos e normoglicêmicos, 19% apresentaram placas ateroscleróticas e 12% apresentaram aumento da espessura intimomedial de carótidas. A concentração de marcadores de absorção em relação aos de síntese foi cerca de 3 vezes maior.

As principais contribuições deste estudo são as sugestões de que a aterosclerose carotídea se associa diretamente à absorção intestinal de colesterol e inversamente ao balanço síntese/absorção de colesterol.

Ressaltamos como fatores limitantes do estudo o fato de que os indivíduos foram selecionados de forma rigorosa o que reduziu o tamanho da amostra e a variabilidade e amplitude dos resultados observados.

Também pelo fato de que os participantes não terem sido seguidos prospectivamente não foram avaliados o risco cardiovascular em longo prazo.

Além disso os hábitos alimentares não foram controlados antes do ingresso no estudo, portanto não podemos excluir a possibilidade de que as variações dietéticas tenham influenciado a quantidade de esteróis vegetais ingeridos.

Sugerimos que novos estudos sejam realizados para melhor caracterizar o processo aterosclerótico associado às variações séricas de marcadores de síntese e absorção do colesterol em indivíduos saudáveis e sua prospecção.

6 REFERÊNCIAS

1. Quintão EC, Nakandakare E, Passarelli M. Lipids - Do metabolismo à aterosclerose. 2011.
2. Nelson DL, Cox MM. Lehninger's principles of biochemistry. Vol. 53, Journal of Chemical Information and Modeling. 2013. 1689–1699 p.
3. Poian A Da, Foguel D, Dansa-Petretski M, Machado OT. Bioquímica I. Vol. 3. 2005.
4. Afonso MS, Machado RM, Lavrador MS, Carlos E, Quintao R, Moore KJ, et al. Molecular Pathways Underling Cholesterol Homeostasis. *Nutrients*. 2018;10:1–18.
5. Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2008;9(2):125–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18216769>
6. Smith C, Marks AD, Lieberman M. Bioquímica Médica Básica de Marks - uma abordagem clínica. Livro. 2007. 634–636 p.
7. Netto T, Valente S. Metabolismo de Lipídios. 2017;1–38.
8. Harvey RA, Ferrier DR. Bioquímica Ilustrada [Internet]. 6^a. Artmed, editor. 2014. p. 520. Available from: <https://schoolbag.info/chemistry/biochemistr/18.html>
9. Sung-Woo Park. Intestinal and Hepatic Niemann-Pick C1-Like 1. *Diabetes Metabol*. 2013;23–5.
10. Altmann SW, Davis HR, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 Protein Is C1. Altmann SW, Davis HR, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 Protein Is Critical for Intestinal Cholesterol Absorption. *Science* (80-). 2004;303(5661):1201–4.ritical for Intestine. *Science* (80-). 2004;303(5661):1201–4.
11. Tzavella E, Hatzimichael E, Kostara C, Bairaktari E, Elisaf M, Tsimihodimos V. Sitosterolemia: A multifaceted metabolic disorder with important clinical consequences. *J Clin Lipidol* [Internet]. 2017;11(4):1095–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacl.2017.04.116>
12. Sirwi A, Hussain MM. Lipid transfer proteins in the assembly of apoB-containing lipoproteins. *J Lipid Res*. 2018;59(7):1094–102.
13. Iqbal J, Hussain MM. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2009;296(6).
14. Olofsson S-O, Stillemark-Billton P, Asp L. Intracellular Assembly of VLDL, two major steps in separate cell compartments. *TCM Vol10 No 8*. 2000;
15. Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica. 2011. 12^a Edição.
16. King MW. The medical biochemistry page: Cholesterol- Synthesis, Metabolism, and Regulation [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 6]. Available from: <http://themedicalbiochemistrypage.org/cholesterol-synthesis-metabolism-and-regulation/>
17. Faludi A, MCO I, JFK S, APM C, HT B, A AN, et al. Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose – 2017. *Arq Bras Cardiol*. 2017;109.
18. Prêcoma DB, Oliveira GMM de, Simão AF, Dutra OP, Coelho OR, Izar MC de O, et al. Atualização Atualização da Diretriz de Prevenção Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia – 2019 Atualização. 2019;1–105.
19. Goldstein JL, Brown MS. History of Discovery: The LDL Receptor. *Arterioscler Thromb* [Internet]. 2010;29(4):431–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2740366&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
20. Santos RD, Mata P, Stoll M. Hipercolesterolemia familiar Lipoproteínas. Vol. 8. 2015. 1–146 p.

21. ZAGO VHDS. Estudo molecular dos genes ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8 E SCARB1 em amostra populacional brasileira assintomática [Internet]. Vol. 53, Universidade Estadual de Campinas. 2015. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2016.03.027><http://dx.doi.org/10.1016/j.mri.2013.04.010>http://dx.doi.org/10.1162/jocn_a_00409http://www.mitpressjournals.org/doi/abs/10.1162/jocn_a_00409http://www.med-info.nl/Afwijking_OOGHEELKUNDE
22. Nguyen TM, Sawyer JK, Kelley KL, Davis MA, Rudel LL. Cholesterol esterification by ACAT2 is essential for efficient intestinal cholesterol absorption: evidence from thoracic lymph duct cannulation. *J Lipid Res.* 2012;53(1):95–104.
23. Phillips MC. Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem.* 2014;289(35):24020–9.
24. Lima ES, Couto RD. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. *J Bras Patol e Med Lab.* 2006;42(3):169–78.
25. Chiesa ST, Charakida M. High-Density Lipoprotein Function and Dysfunction in Health and Disease. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2019;33(2):207–19.
26. Atmeh RF, Issa AEO. Small high density lipoprotein subclasses: Some of their physico-chemical properties and stability in solution. *Acta Biochim Pol.* 2005;52(2):515–25.
27. Oram JF. ABCA1 as a new therapeutic target for treating cardiovascular disease. *Drug News Perspect.* 2005;15(1):24.
28. Carmo R, Castro-Ferreira I, Oliveira JP. Lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency: a review for clinical nephrologists. *Port J Nephrol Hypertens.* 2017;31(4):286–92.
29. Ossoli A, Pavanello C, Calabresi L. High-Density Lipoprotein, Lecithin: Cholesterol Acyltransferase, and Atherosclerosis. *Endocrinol Metab.* 2016;31(2):223.
30. Ramalho IMACA. Contributo dos marcadores de síntese e de absorção do colesterol na terapêutica hipocolesterolemizante. 2014;
31. Blesso CN. Dietary Cholesterol , Serum Lipids , and Heart Disease : Are Eggs Working for or Against You ? 2018;
32. MacKay D, Jones PJH. Evaluation of methods for the determination of cholesterol absorption and synthesis in humans. *Atherosclerosis.* 2011;218(2):253–62.
33. Olkkonen VM, Gylling H, Ikonen E. Plant sterols, cholesterol precursors and oxysterols: Minute concentrations—Major physiological effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2017;169:4–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.12.026>
34. Mitsche MA, McDonald JG, Hobbs HH, Cohen JC. Flux analysis of cholesterol biosynthesis in vivo reveals multiple tissue and cell-type specific pathways. *Elife.* 2015;4(JUNE 2015):1–21.
35. Brown AJ, Ikonen E, Olkkonen VM. Cholesterol precursors: more than mere markers of biosynthesis. *Curr Opin Lipidol.* 2014;25(2):133–9.
36. Mashnafi S, Plat J, Mensink RP, Baumgartner S. Non-Cholesterol Sterol Concentrations as Biomarkers for Cholesterol Absorption and Synthesis in Different Metabolic Disorders: A Systematic Review. *Nutrients.* 2019;11(1):124.
37. Mori K, Ishida T, Tsuda S, Oshita T, Shinohara M, Hara T. Enhanced Impact of Cholesterol Absorption Marker on New Atherosclerotic Lesion Progression After Coronary Intervention During Statin Therapy. *J Atheroscler Thromb.* 2017;123–32.
38. Nissinen MJ, Gylling H, Miettinen TA. Responses of surrogate markers of cholesterol absorption and synthesis to changes in cholesterol metabolism during various amounts of fat and cholesterol feeding among healthy men. *Br J Nutr.* 2008;99(2):370–8.

39. Escolà-Gil JC, Quesada H, Julve J, Martín-Campos JM, Cedó L, Blanco-Vaca F. Sitosterolemia: Diagnosis, investigation, and management. *Curr Atheroscler Rep.* 2014;16(7).
40. Miettinen TA, Tilvis RS, Kesäniemi YA. Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am J Epidemiol.* 1990;131:20–31.
41. H. Gylling, M. Hallikainen, R.A. Rajaratnam, P. Simonen, J. Pihlajamäki, M. Laakso, T.A. Miettinen. The metabolism of plant sterols is disturbed in postmenopausal women with coronary artery disease. *Metabolism.* 2009;58:401–7.
42. H.J. Kempen, P. de Knijff, D.I. Boomsma, H.A. van der Voort, J.A. Gevers Leuven LH. Plasma levels of lathosterol and phytosterols in relation to age, sex, anthropometric parameters, plasma lipids, and apolipoprotein E phenotype, in 160 Dutch families. *Metabolism.* 1991;40:604–11.
43. Luu W, Sharpe LJ, Gelissen IC, Brown AJ. The role of signalling in cellular cholesterol homeostasis. *IUBMB Life.* 2013;65(8):675–84.
44. Luo J, Yang H, Song BL. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2020;21(4):225–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-019-0190-7>
45. Seo HS, Choi MH. Cholesterol homeostasis in cardiovascular disease and recent advances in measuring cholesterol signatures. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2015;153:72–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.04.014>
46. Lee SD, Tontonoz P. Liver X receptors at the intersection of lipid metabolism and atherogenesis. *Atherosclerosis.* 2015;242(1):29–36.
47. Andrade I, Santos L, Ramos F. Cholesterol absorption and synthesis markers in Portuguese hypercholesterolemic adults: A cross-sectional study. *Eur J Intern Med* [Internet]. 2016;28:85–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2015.10.022>
48. Cabral CE, Klein MRST. Phytosterols in the Treatment of Hypercholesterolemia and Prevention of Cardiovascular Diseases. *Arq Bras Cardiol.* 2017;475–82.
49. Cofán M, Escurriol V, García-Otín AL, Moreno-Iribas C, Larrañaga N, Sánchez MJ, et al. Association of plasma markers of cholesterol homeostasis with metabolic syndrome components. A cross-sectional study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011;21(9):651–7.
50. Escurriol V, Cofán M, Moreno-Iribas C, Larrañaga N, Martínez C, Navarro C, et al. Phytosterol plasma concentrations and coronary heart disease in the prospective Spanish EPIC cohort. *J Lipid Res.* 2010;51(3):618–24.
51. Gylling H, Plat J, Turley S, Ginsberg HN, Ellegård L, Jessup W, et al. Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2014;232(2):346–60.
52. Miettinen TA, Gylling H, Nissinen MJ. The role of serum non-cholesterol sterols as surrogate markers of absolute cholesterol synthesis and absorption. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* [Internet]. 2011;21(10):765–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2011.05.005>
53. Plat J, Baumgartner S, Vanmierlo T, Lütjohann D, Calkins KL, Burrin DG, et al. Plant-based sterols and stanols in health & disease: “Consequences of human development in a plant-based environment?” *Prog Lipid Res.* 2019;74(February):87–102.
54. Strandberg TE, Gylling H, Tilvis RS, Miettinen TA. Serum plant and other noncholesterol sterols, cholesterol metabolism and 22-year mortality among middle-aged men. *Atherosclerosis* [Internet]. 2010;210(1):282–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.11.007>
55. Miettinen TA, Gylling H, Viikari J, Lehtim T, Raitakari OT. Synthesis and absorption

- of cholesterol in Finnish boys by serum non-cholesterol sterols The cardiovascular risk in young Finns study. *Atherosclerosis*. 2008;200:177–83.
56. Racette SB, Lin X, Lefevre M, Spearie CA, Most MM, Ma L, et al. Dose effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism: A controlled feeding study. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(1):32–8.
 57. Sanclemente T, Marques-Lopes I, Fajó-Pascual M, Cofán M, Jarauta E, Ros E, et al. Naturally-occurring phytosterols in the usual diet influence cholesterol metabolism in healthy subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012;22(10):849–55.
 58. OPAS. Doenças Cardiovasculares [Internet]. BRASIL-Organização Pan-Americana da Saúde. 2017. Available from: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096
 59. SBC. Cardiômetro [Internet]. Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2020. Available from: <http://www.cardiometro.com.br>
 60. Mansur A de P, Favarato D. Trends in Mortality Rate from Cardiovascular Disease in Brazil, 1980-2012. *Arq Bras Cardiol*. 2016;21–6.
 61. Bäck M, Jr AY, Tabas I, Öörni K, Kovanen PT. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cardiol*. 2020;176(1):139–48.
 62. Bonotto GM, Mendoza-Sassi RA, Susin LRO. Conhecimento dos fatores de risco modificáveis para doença cardiovascular entre mulheres e seus fatores associados: um estudo de base populacional. *Cien Saude Colet*. 2016;21(1):293–302.
 63. Xavier H, Izar M, Faria Neto J, Asaad M, Rocha V, Sposito A, et al. V Diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. *Arq Bras Cardiol*. 2013;101(4):1–22.
 64. Gottlieb MG, Bonardi G, Moriguchi E. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. *Sci med*. 2005;203–7.
 65. Mitchell RN, Schoen FJ, Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Patologia: Bases patológicas das doenças; Vasos Sanguíneos*. 8ª. Elsevier S, editor. 2010. 495–514 p.
 66. Elias L de S. Efeito da melatonina associada à sinvastatina no tratamento de ratos induzidos à hiperlipidemia. 2017.
 67. Quillard T, Libby P. Molecular imaging of atherosclerosis for improving diagnostic and therapeutic development. *Circ Res*. 2012;111(2):231–44.
 68. Marco, Gomes M, Mac NC, Ara IG. Interleucina-6, Moléculas de Adesão Intercelular-1 e Microalbuminúria na Avaliação da Lesão Endotelial: Revisão de Literatura. *Rev SOCERJ*. 2009;22(6):398–403.
 69. Levitan I, Volkov S, Subbaiah P V. Oxidized LDL: Diversity, Patterns of Recognition, and Pathophysiology. 2010;13(1).
 70. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. 2017;38(32):2459–72.
 71. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473(7347):317–25.
 72. Rodrigues C da SA. Placa de aterosclerose em carótidas como marcador de risco para reestenose de stent em coronárias. 2016.
 73. Oikonomou E, Latsios G, Vogiatzi G, Tousoulis D. Atherosclerotic plaque [Internet]. *Coronary Artery Disease: From Biology to Clinical Practice*. Elsevier Inc.; 2017. 31–41 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811908-2.00003-9>
 74. Bertoluci MC, Moreira RO, Faludi A, Izar MC, Schaan BD, Valerio CM, et al.

- Brazilian guidelines on prevention of cardiovascular disease in patients with diabetes: A position statement from the Brazilian Diabetes Society (SBD), the Brazilian Cardiology Society (SBC) and the Brazilian Endocrinology and Metabolism Society (SBEM). *Diabetol Metab Syndr*. 2017;9(1):1–36.
75. Freire CMV, Alcantara ML De, Nascimento S, Israel S, Veloso O, Lucia C, et al. Recomendação para a Quantificação pelo Ultrassom da Doença Aterosclerótica das Artérias Carótidas e Vertebrais: Grupo de Trabalho do Departamento de Imagem Cardiovascular da Sociedade. *Arq Bras Cardiol*. 2015;28:e1-64.
 76. Kim GH, Youn HJ. Is carotid artery ultrasound still useful method for evaluation of atherosclerosis? *Korean Circ J*. 2017;47(1):1–8.
 77. Mitchell C, Korcarz CE, Gepner AD, Kaufman JD, Post W, Tracy R, et al. Ultrasound carotid plaque features, cardiovascular disease risk factors and events: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2018;276.
 78. Słomka T, Drelich-zbroja A, Jarzabek M. Intima – media complex thickness and carotid atherosclerotic plaque formation in Lublin’s population in the context of selected comorbidities. *J Ultrason*. 2018;18:133–9.
 79. Naqvi TZ, Lee M-S. Carotid Intima-Media Thickness and Plaque in Cardiovascular Risk Assessment. *JACC Cardiovasc IMAGING*. 2014;7(10).
 80. Sibal L, Neely R, Bartlett K, Home P. Endothelial function and carotid intima-media thickness are associated with non-cholesterol sterols in young people with Type 1 diabetes. *Diabetic Medicine [Internet]*. 2011;28(SUPPL. 1):79. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed13&NEWS=N&AN=70631102>
 81. Nasu K, Terashima M, Habara M, Ko E, Ito T, Yokota D, et al. Impact of cholesterol metabolism on coronary plaque vulnerability of target vessels: A combined analysis of virtual histology intravascular ultrasound and optical coherence tomography. *JACC Cardiovasc Interv*. 2013;6(7):746–55.
 82. Tschiderer L, Willeit P. Carotid intima-media thickness predicts carotid plaque development: Meta-analysis of seven studies involving 9341 participants. 2020;(February):1–11.
 83. Martins IN de S. Avaliação dos fatores de risco para Doenças Cardiovasculares em adolescentes e adultos jovens. 2013.
 84. Amato M, Veglia F, de Faire U, Giral P, Rauramaa R, Smit AJ, et al. Carotid plaque-thickness and common carotid IMT show additive value in cardiovascular risk prediction and reclassification. *Atherosclerosis*. 2017;263:412–9.
 85. AbuMweis S, Marinangeli CPF, Frohlich J, J.H.Jones P. Implementing Phytosterols Into Medical Practice as a Cholesterol-Lowering Strategy: Overview of Efficacy, Effectiveness, and Safety. *Can J Cardiol*. 2014;30(10):1225–32.
 86. Silbernagel G, Fauler G, Renner W, Landl EM, Hoffmann MM, Winkelmann BR, et al. The relationships of cholesterol metabolism and plasma plant sterols with the severity of coronary artery disease. *J Lipid Res*. 2008;50(2):334–41.
 87. Wang W, Jiang L, Chen P-P, Wu Y, Su P-Y, Wang L-Y. A case of sitosterolemia misdiagnosed as familial hypercholesterolemia: A 4-year follow-up. *J Clin Lipidol [Internet]*. 2018 Jan 1 [cited 2019 Jun 4];12(1):236–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1933287417304683?via%3Dihub>
 88. Luister A, Schött HF, Husche C, Schäfers HJ, Böhm M, Plat J, et al. Increased plant sterol deposition in vascular tissue characterizes patients with severe aortic stenosis and concomitant coronary artery disease. *Steroids [Internet]*. 2015;99(PB):272–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2015.03.011>
 89. Weingärtner O, Pinsdorf T, Rogacev KS, Blömer L, Grenner Y, Gräber S, et al. The

- relationships of markers of cholesterol homeostasis with carotid intima-media thickness. *PLoS One*. 2010;5(10):1–8.
90. Parra ES, Zago VH de S, Panzoldo NB, Alexandre F, Vendrame F, Virginio VW de M, et al. Development of a clinical laboratory data base of hyper and hypo alpha lipoproteins in Campinas-SP and neighboring region. *J Bras Patol e Med Lab*. 2013;49(1):26–33.
 91. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18(6):499–502.
 92. Stern SE, Williams K, Ferrannini E, DeFronzo RA, Bogardus C, Stern MP. Identification of individuals with insulin resistance using routine clinical measurements. *Diabetes*. 2005;54(2):333–9.
 93. Miettinen TA. Gas-liquid chromatographic determination of fecal neutral sterols using a capillary column. *Clin Chim Acta*. 1982;124(2):245–8.
 94. Phillips KM, Ruggio DM, J.A. Bailey. Precise quantitative determination of phytosterols, stanols, and cholesterol metabolites in human serum by capillary gas-liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999;732(1):17–29.
 95. Ahmida HSM, Bertucci P, Franz L, Massoud R, Cortese C, Lala A, et al. Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography – mass spectrometry (GC – MS) with selective ion monitoring (SIM). *J Chromatogr B*. 2006;842:43–7.
 96. Nunes VS, Leança CC, Panzoldo NB, Parra E, Cazita PM, Nakandakare ER, et al. HDL-C concentration is related to markers of absorption and of cholesterol synthesis : Study in subjects with low vs . high HDL-C. *Clin Chim Acta [Internet]*. 2011;412(1–2):176–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2010.09.039>
 97. Ketomäki A, Gylling H, Siimes MA, Vuorio A, Miettinen TA. Squalene and noncholesterol sterols in serum and lipoproteins of children with and without familial hypercholesterolemia. *Pediatr Res*. 2003;53(4):648–53.
 98. Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, Lonn E, Kendall CB, Mohler ER, et al. Use of Carotid Ultrasound to Identify Subclinical Vascular Disease and Evaluate Cardiovascular Disease Risk : A Consensus Statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force Endorsed by the Society for Vascula. 2008;53792(Mc 3248):93–111.
 99. Lorenz MW, von Kegler S, Steinmetz H, Markus HS, Sitzer M. Carotid Intima-Media Thickening Indicates a Higher Vascular Risk Across a Wide Age Range. *Stroke*. 2005;37(1):87–92.
 100. Conover WJ, Iman RL. Rank Transformations as a Bridge Between Parametric and Nonparametric Statistics. *Am Stat*. 1981;35(3):124–9.
 101. Stevens J. *Applied Multivariate Statistics for the Social*. 2^a ed. Associates. LE, editor. New Jersey.; 1992.
 102. Miettinen TA, Gylling H, Hallikainen M, Juonala M, Räsänen L, Viikari J, et al. Relation of non-cholesterol sterols to coronary risk factors and carotid intima-media thickness: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Atherosclerosis*. 2010;209(2):592–7.
 103. Song P, Fang Z, Wang H, Cai Y, Rahimi K, Zhu Y, et al. Global and regional prevalence, burden, and risk factors for carotid atherosclerosis: a systematic review, meta-analysis, and modelling study. *Lancet Glob Heal [Internet]*. 2020;8(5):e721–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30117-0](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30117-0)
 104. Matthan NR, Pencina M, LaRocque JM, Jacques PF, D’Agostino RB, Schaefer EJ, et al. Alterations in cholesterol absorption/synthesis markers characterize Framingham

- Offspring Study participants with CHD. *J Lipid Res.* 2009;50(9):1927–35.
105. Lupattelli G, Pirro M, Mannarino MR, Siepi D, Roscini AR, Schillaci G, et al. Visceral fat positively correlates with cholesterol synthesis in dyslipidaemic patients. *Eur J Clin Invest.* 2012;42(2):164–70.
 106. Vuono S de, Ricci MA, Siepi D, Boni M, Gentili A, Scavizzi M, et al. Laparoscopic sleeve gastrectomy modifies cholesterol synthesis but not cholesterol absorption. *Obes Res Clin Pract.* 2017;11(1):118–22.
 107. Lupattelli G, De Vuono S, Mannarino E. Patterns of cholesterol metabolism: Pathophysiological and therapeutic implications for dyslipidemias and the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* [Internet]. 2011;21(9):620–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2011.04.010>
 108. Alphonse PAS, Jones PJH. Revisiting Human Cholesterol Synthesis and Absorption: The Reciprocity Paradigm and its Key Regulators. *Lipids.* 2016;51(5):519–36.
 109. Hovenkamp E, Demonty I, Plat J, Lütjohann D, Mensink RP, Trautwein EA. Biological effects of oxidized phytosterols: A review of the current knowledge. *Prog Lipid Res.* 2008;47(1):37–49.
 110. Miettinen TA, Railo M, Lepäntalo M, Gylling H. Plant sterols in serum and in atherosclerotic plaques of patients undergoing carotid endarterectomy. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2005;45(11):1794–801. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2005.02.063>
 111. Weingärtner O, Bogeski I, Kummerow C, Schirmer SH, Husche C, Vanmierlo T, et al. Plant sterol ester diet supplementation increases serum plant sterols and markers of cholesterol synthesis, but has no effect on total cholesterol levels. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2017;169:219–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.07.016>
 112. Gojkovic T, Vladimirov S, Spasojevic-kalimanovska V, Zeljkovic A, Vekic J, Kalimanovska-ostric D, et al. Can non-cholesterol sterols and lipoprotein subclasses distribution predict different patterns of cholesterol metabolism and statin therapy response? *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(3):447–57.
 113. AbuMweis SS, Marinangeli CPF, Frohlich J, Jones PJH. Implementing phytosterols into medical practice as a cholesterol-lowering strategy: Overview of efficacy, effectiveness, and safety. *Can J Cardiol* [Internet]. 2014;30(10):1225–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cjca.2014.04.022>

7. ANEXOS

7.1 Aprovação CEP/FCM - Projeto Temático FAPESP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 18/07/11
(Grupo III)

2ª VIA

PARECER PROJETO: N° 120/2007 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0087.0.146.000-07

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HDL-COLESTEROL COM O METABOLISMO DE COLESTEROL EM MONÓCITOS E NO PLASMA HUMANO”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Eliana Cotta de Faria

INSTITUIÇÃO: HC/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 06/03/2007

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 27/03/08 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar a mútua interferência da concentração da HDL e suas frações sobre o metabolismo do colesterol corpóreo via procedimentos *in vivo* e *in vitro* e relacionar os parâmetros metabólicos estudados à medida da espessura da camada íntima-média de carótides.

III - SUMÁRIO

Serão medidos os parâmetros que regulam metabolismo do colesterol em linfo-monócitos frescos do sangue e os esteróides plasmáticos marcadores de síntese (latotesrol/desmoterol) e de absorção intestinal, que serão relacionados com o grau de arterosclerose medido por ultrassonografia de carótidas por eco-doppler.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Estudo bastante interessante, tem orçamento, cronograma e está bem dimensionado. Foi informado o número de sujeitos e a forma de recrutamento. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi readequado, estando de acordo com as normas do CNS/MS.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na III Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de março de 2007.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

<http://www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa/comite-de-etica-em-pesquisa>

CEP, 28/05/13.
(PARECER CEP: N° 120/2007)

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HDL-COLESTEROL COM O METABOLISMO DE COLESTEROL EM MONÓCITOS E NO PLASMA HUMANO".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Eliana Cotta de Faria

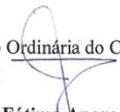
II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprova o Regulamento do Biorrepositório de acordo com as diretrizes da Resolução CNS/MS 441/11 de 12/05/11, que regulamenta o armazenamento e utilização de material biológico humano no âmbito de projetos de pesquisa, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de maio de 2013.


Prof. Dra. Fátima Aparecida Böttcher Luiz
COORDENADORA do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

7.2 Solicitação de Dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Ao

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP

Solicitação de dispensa – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Solicito a dispensa do uso do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para o projeto “**Influência dos marcadores séricos de síntese e absorção de colesterol sobre a aterosclerose subclínica de carótidas em adultos assintomáticos**”. Este pedido se justifica pelo fato do estudo ser caracterizado por uma análise retrospectiva de dados obtidos durante o Projeto Temático FAPESP nº2006/60585-9 “Relação da concentração de HDL-C com o metabolismo de colesterol em monócitos e no plasma humano” (aprovação CEP 038/2011) realizado entre os anos de 2008 e 2013 na cidade de Campinas - SP.

O material biológico que será analisado foi obtido durante a vigência do projeto destacado, sendo autorizada a sua utilização em pesquisas associadas pelos termos definidos no TCLE.

Sendo assim, solicito a dispensa de uso do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O Laboratório de Lípidos da FCM/UNICAMP e o setor de Bioquímica Clínica da Divisão de Patologia Clínica estão cientes e adequados a Resolução nº 347/2005 sobre o armazenamento de material biológico, e toda nova pesquisa a ser feita com necessidade de coleta de material biológico será submetida à aprovação do CEP da instituição e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP.

Atenciosamente,

Campinas, _____ de _____ de 2017.

EDITE VIEIRA SILVA DE CAMPOS

7.3 Parecer do comitê de ética em pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DOS MARCADORES SÉRICOS DE SÍNTESE E ABSORÇÃO DE COLESTEROL SOBRE A ATEROSCLEROSE SUBCLÍNICA DE CARÓTIDAS EM ADULTOS ASSINTOMÁTICOS

Pesquisador: Edite Vieira Silva de Campos

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 80613917.7.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.617.807

Apresentação do Projeto:

1. INTRODUÇÃO 1.1 Epidemiologia das doenças cardiovasculares (DCV) Estimase que a cada ano sejam registrados 17,1 milhões de óbitos no mundo decorrentes de doenças cardiovasculares (DCV) [1, 2]. No Brasil, a aterosclerose é a principal responsável pela ocorrência de DCV, e segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) 349.938 de mortes em decorrência destas doenças foram estimadas no ano de 2016 [3]. Apesar de os últimos anos apresentarem uma tendência à diminuição da mortalidade, elevações relativamente rápidas e substanciais têm ocorrido em países em desenvolvimento como o Brasil, no qual as DCV são responsáveis por aproximadamente 29% de todas as mortes [3-6]. As principais manifestações clínicas da doença aterosclerótica que podem se caracterizar por eventos de alta morbimortalidade, compreendem a síndrome coronariana aguda (angina instável e/ou infarto agudo do miocárdio), o acidente vascular cerebral, o aneurisma da aorta e a doença vascular periférica [7, 8]. A manifestação clínica destas doenças é resultante da interação de fatores de risco cardiovasculares genéticos (idade, sexo, história familiar de DCV) e/ou modificáveis (dislipidemias, tabagismo, hipertensão arterial, diabetes melito) que podem estar presentes em idade precoce, tendendo a progredir com o avançar desta e exibindo intensidade diretamente proporcional ao número e gravidade dos fatores de risco apresentados pelo indivíduo [9]. A aterosclerose acarreta alto custo para o sistema de saúde e da previdência social e leva à perdas para a economia, visto que as doenças cardiovasculares figuram

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.617.807

como importante elemento no cenário das causas de hospitalização, incapacitação física e consequente afastamento das atividades de trabalho [5, 10]. As síndromes coronarianas agudas podem levar a eventos de alta morbimortalidade como o infarto do miocárdio, o acidente vascular cerebral, os aneurismas da aorta e a doença vascular periférica, que em muitos casos correspondem às principais consequências da aterosclerose [8].

1.2 Fisiopatologia da aterosclerose

O processo subjacente a grande parte das manifestações cardiovasculares é a aterosclerose. A aterosclerose é uma doença inflamatória crônico-proliferativa, degenerativa, progressiva e de base multifatorial, decorrente de uma desordem do metabolismo e da deposição lipídica, acometendo a parede das artérias e causando disfunção endotelial vascular com formação de placas de ateroma. A presença e a gravidade destas lesões correlacionam-se positiva e significativamente com os fatores de risco cardiovascular e é a causa primária da doença aterosclerótica coronariana (DAC) e do acidente vascular cerebral (AVC) [8, 11]. A aterosclerose é caracterizada por uma longa fase assintomática, podendo ter início no estágio intrauterino ou na infância. Os locais acometidos geralmente são artérias de grande e médio calibre, em regiões de bifurcação onde ocorre variabilidade no cisalhamento laminar, conhecido como shear stress [12]. O endotélio vascular de uma artéria é constituído por três camadas distintas, dentre as quais a túnica interna (ou íntima) forra o vaso internamente. Entre a túnica interna e a média, existe uma membrana chamada limitante elástica interna; a túnica média é formada basicamente por células musculares lisas, envoltas por colágeno e elastina. Entre a túnica média e a externa (adventícia) existe a membrana limitante elástica externa; na túnica adventícia há grande quantidade de fibras colágenas e elásticas, que penetram no tecido conjuntivo adjacente, tornando o limite externo do vaso não muito definido [2, 7, 13]. O início da aterogênese ocorre muitos anos antes das manifestações estruturais e clínicas da doença, verificandose, portanto, a existência de um longo período assintomático. Este pode ser atribuído a dois fenômenos que geralmente ocorrem simultaneamente: a disfunção endotelial somada ao acúmulo de lipoproteínas ricas em colesterol esterificado no espaço subendotelial. Estas partículas são representadas especialmente pela lipoproteína de baixa densidade, ou LDL-C que quando retida é suscetível a modificações em sua estrutura, principalmente quando há presença de fatores de risco que favorecem o estresse oxidativo e consequentemente a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio. Sendo assim, o LDL-C pode passar por modificações estruturais determinantes, como a oxidação, permitindo que este seja reconhecido e internalizado por macrófagos residentes via receptores do tipo scavenger [14]. O início do processo inflamatório é marcado pela intensa produção de mediadores pelos macrófagos, como citocinas, quimiocinas e proteinases. Desta forma, ocorre a

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.617.807

sinalização para o aumento da expressão de moléculas de adesão endoteliais, como ICAM-1 (do inglês intercellular adhesion molecule 1, VCAM-1 (do inglês vascular cell adhesion molecule 1) e selectinas (P e E). Estas moléculas favorecem a diapedese, isto é, a migração de monócitos (que foram atraídos pelas quimiocinas) até a camada íntima arterial, local onde se diferenciam a macrófagos e amplificam o processo [15]. O acúmulo de lípidos no interior dos macrófagos permite que estes adquiram aspecto de células espumosas (foam cells) que continuamente liberam citocinas pró-inflamatórias. De fato, as células efectoras do sistema imune se proliferam ativamente no local da lesão e secretam citocinas e enzimas que degradam o colágeno e outros componentes teciduais, contribuindo para o desenvolvimento do processo inflamatório global. Em consequência há o aumento de células espumosas, formando as estrias gordurosas, que configuram as lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose [16]. Fatores de crescimento como o PDGF (do inglês, platelet-derived growth factor), FGF (do inglês, fibroblast growth factor) e IGF (do inglês, insulin-like growth factor) estimulam a proliferação e migração das células da musculatura lisa para o local da lesão, onde passam a produzir citocinas, fatores de crescimento e matriz extracelular cuja composição em tecido conjuntivo denso, proteoglicanos, fibras colágenas e células musculares lisas constituem a capa fibrosa das placas ateroscleróticas. Na placa estabelecida é comum a presença de um núcleo lipídico necrótico, principalmente devido a apoptose e necrose das células espumosas e das células musculares lisas [16, 17]. As placas ateroscleróticas aumentam a espessura da camada íntima e o processo fibrótico torna as artérias enrijecidas e resistentes em muitos casos. Inclusive, com o tempo pode ocorrer a precipitação de sais de cálcio na placa, levando a calcificações pétreas ocasionando o endurecimento das artérias e distensibilidade devido às áreas degenerativas na parede arterial que facilmente podem se romper, levando a formação de coágulos, com resultante formação de trombos ou êmbolos onde ocorre um bloqueio súbito do fluxo de sangue para a artéria [7, 8, 18]. Sendo assim, a estabilidade da capa fibrosa que protege o núcleo necrótico é crítica para a manutenção da integridade da lesão. As placas vulneráveis são instáveis e apresentam uma diminuição na quantidade de células musculares lisas e de colágeno na matriz extracelular, formando assim uma fina capa fibrosa sobre um grande núcleo necrótico com atividade inflamatória local significativa. Estas características levam a ruptura da capa fibrosa e estão presentes em até 75% de casos de morte súbita [19]. Outros fatores contribuem para o rompimento da capa fibrosa; entre eles, o enfraquecimento mecânico é um passo importante que precede a ruptura da placa e os eventos trombóticos secundários. As mudanças estruturais na capa fibrosa são caracterizadas pela intensa ação de metaloproteinases que degradam a matriz extracelular e estão diretamente correlacionadas à instabilidade da placa e risco de eventos

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.617.807

coronarianos agudos [20]. Outro fator que pode contribuir para o enfraquecimento da placa é o processo de neovascularização, que geralmente resulta em hemorragias e formação de trombos dentro da placa [21, 22]. Os eventos agudos coronarianos são em sua maioria causados pela formação de trombos, em consequência à ruptura da placa ou por hemorragias locais. A magnitude da resposta ao trombo é variável, dependendo principalmente da trombogeneidade do material exposto, das forças hemodinâmicas locais e da propensão sistêmica a eventos trombóticos [23]. Estudos epidemiológicos realizados nos últimos anos revelaram numerosos fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose; entre eles, destacam-se fatores comportamentais como o tabagismo, a inatividade física, a dieta inadequada rica em sódio e gorduras e o consumo abusivo de bebidas alcoólicas, entre outros. Além disso, a idade, o sexo e o histórico familiar positivo de DAC prematura são considerados fatores clássicos e independentes na predição clínica e subclínica de risco cardiovascular [24, 25]. Parte do risco aterosclerótico está diretamente ligado à pandemia mundial de doenças metabólicas, como a hipertensão arterial sistêmica, o diabetes mellitus tipo 2 e a síndrome metabólica, condições intimamente ligadas ao sobrepeso e obesidade [24]. A obesidade, independentemente do sexo, figura entre os principais fatores de risco para DAC, tendo especial importância devido a sua alta prevalência em diferentes populações. Segundo Ferreira 2016, há evidências de que a elevação da pressão arterial está fortemente associada à adiposidade central e/ou resistência à insulina, representando um fator de risco independente para o desenvolvimento clínico desfavorável da síndrome metabólica (SM). Além disso, o excesso de gordura corporal não só conduz às alterações metabólicas do tecido adiposo e à indução de resistência insulínica, mas também à disfunção endotelial, por meio de efeitos pró-inflamatórios e pró-trombóticos decorrentes da ação das citocinas inflamatórias e adipocinas [26]. Muitos destes estados fisiológicos são associados a alterações lipídicas, ou dislipidemias, caracterizadas pelo aumento ou redução das concentrações de colesterol circulante na forma de lipoproteínas. As dislipidemias, de fato, são proeminentes fatores de risco, sendo que o papel do colesterol plasmático na iniciação da lesão foi sugerido em 1913 por Nikolai Anitschkow [27]. Posteriormente, os conceitos foram refinados com a descoberta da prevalência da lipoproteína de baixa densidade, rica em colesterol, nas lesões e condições relacionadas.

1.3 Marcadores subclínicos de aterosclerose A idade de início e a taxa de progressão da doença aterosclerótica varia acentuadamente entre os indivíduos, o que se torna complicada a sua predição. Um evento coronário agudo é a primeira manifestação da doença aterosclerótica em pelo menos metade dos indivíduos que apresentam esta complicação. Desta forma, a identificação dos indivíduos assintomáticos que estão mais predispostos é crucial para a prevenção efetiva, com a

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.617.807

correta definição das metas terapêuticas individuais [9]. A associação da aterosclerose com inflamação nos leva a procurar um marcador que pode refletir a fisiopatologia subjacente à doença, podendo ser uma substância encontrada em uma amostra biológica disponível, tal como o sangue ou a urina, ou pode ser detectado na imagem tecidual, bem como indicar a presença da afecção ou danos a um órgão [28, 29]. Os modelos tradicionais de determinação de risco são bastante efetivos em algumas populações. A estimativa do risco de doença aterosclerótica resulta da somatória do risco associado a cada um dos fatores de risco mais a potenciação causada por sinergismos entre alguns destes fatores. Diante da complexidade destas interações, a atribuição intuitiva do risco frequentemente resulta em sub ou superestimação dos casos de maior ou menor risco, respectivamente. Para contornar esta dificuldade, diversos algoritmos têm sido criados, baseados em análises de regressão de estudos populacionais, por meio dos quais a identificação do risco é substancialmente aprimorada. Dentre os diversos algoritmos existentes, a V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose [30] recomenda a utilização do Escore de Risco Global (ERG). Para atender os pacientes sujeitos a variações indesejáveis na avaliação do risco podem ser utilizados outros recursos dos quais destacam-se técnicas de imagem como o índice tornozelo-braquial (ITB), o score de cálcio coronariano, a dilatação fluxo mediada (FMD, do inglês flow mediated dilatation) e a espessura íntimo-medial de artérias carótidas (cIMT, do inglês carotid intima-media thickness) que têm sido utilizadas para reclassificar estes pacientes com sucesso [31]. A avaliação do cIMT é feita por meio de uma técnica não invasiva de ultrassonografia, na qual é possível avaliar a espessura entre a camada íntima e média - o que por sua vez representa o desenvolvimento de hipertrofia na parede vascular, bem como hiperplasia íntima e o desenvolvimento de placas ateroscleróticas [32]. A medida auxilia na estratificação de valores preditivos a futuros eventos cardiovasculares em uma ampla faixa etária, de modo confiável, a um baixo custo, identificando os estágios iniciais da aterosclerose subclínica e monitorando a progressão da doença [28, 33-35]. As doenças das artérias carótidas desenvolvem-se frequentemente em pacientes com idade mais avançada, causadas por calcificações vasculares e formação de placas ateroscleróticas, a calcificação do sistema vascular na região da cabeça e do pescoço reduz a distensão dos vasos sanguíneos, resultando em diminuição da luz dos vasos e, conseqüentemente, podendo originar a uma doença cardíaca congestiva, insuficiência coronariana e morte, aproximadamente 20% dos acidentes vasculares cerebrais (AVC) isquêmicos são resultantes do desprendimento ou ruptura de uma placa aterosclerótica presente na região carotídea [1, 36]. A medida de cIMT e avaliação da presença de placas separadamente é útil para avaliar os efeitos de diferentes fatores de risco ateroscleróticos na parede arterial. O cIMT é

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.617.807

comumente maior nos homens, apresenta pouca diferença entre grupos étnicos diversos, está associado a vários fatores de risco cardiovasculares, prevalência e incidência de doença cardiovascular e grau de aterosclerose em diferentes sítios arteriais, há evidências de maior prevalência de gravidade de aterosclerose subclínica na população com Hipercolesterolemia Familiar [35, 37- 39].

1.4 Metabolismo corpóreo de colesterol

Os lipídeos são substâncias orgânicas insolúveis no meio aquoso sendo representados principalmente pelos ácidos graxos livres (AG), triglicérides (TG), fosfolípidos (FL), colesterol livre (CL) e colesterol esterificado (CE) [30, 40]. Dentre estes o colesterol é uma molécula que tem funções biológicas variadas e fundamentais para o funcionamento do organismo. Além de ser um componente das membranas celulares, é essencial para a síntese de hormônios esteroides e vitamina D, para o metabolismo dos ácidos biliares e formação de estruturas como os lipid rafts [41]. Devido a esta variedade de funções essenciais, as concentrações celulares de colesterol precisam ser finamente reguladas. Isto ocorre graças a uma maquinaria homeostática complexa que envolve diferentes níveis de controle. De forma simplificada, é possível afirmar que os principais componentes da economia corpórea de colesterol se referem à absorção intestinal, síntese hepática de novo, transporte de colesterol de e para tecidos e excreção [42]. A maior parte do colesterol do organismo origina-se da biossíntese (via endógena), enquanto aproximadamente 25% são fornecidos pela dieta (via exógena). Entretanto, na prática, o balanço entre a síntese hepática de novo e a via exógena varia de acordo com aspectos genéticos e com a quantidade de colesterol consumido da dieta [43].

Resumidamente, a biossíntese do colesterol ocorre principalmente no fígado e intestino a partir do sua molécula precursora, a acetil-CoA; ainda, o agente redutor é o mesmo da síntese de ácidos graxos, ou seja, NADPH. As enzimas que catalisam a reação localizam-se no citosol e retículo endoplasmático e o processo corresponde a uma série de reações complexas de polimerização e ciclização que originam o colesterol. A regulação da biossíntese é feita principalmente pela enzima HMG-CoA redutase (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase) [7, 44]. É importante estabelecer que durante a via endógena estão presentes uma série de mecanismos regulatórios, entre os quais os transcricionais são os mais bem caracterizados. Por exemplo, quando as concentrações intracelulares de colesterol são insuficientes para a manutenção das funções normais o fator de transcrição SREBP (do inglês, sterolregulatory element-binding protein) atua na indução da transcrição de genes envolvidos na síntese, como o HMGCR, e na captação de colesterol, como o LDLR. Por outro lado, quando o conteúdo celular de colesterol é elevado os fatores de transcrição LXR (do inglês, liver X receptors) atuam na regulação de transportadores de membrana, como ABCA1 e ABCG1 (do inglês, ATP-binding cassette transporters A1 e G1,

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.617.807

respectivamente)[41]. Já o colesterol obtido a partir da dieta é transportado do intestino ao fígado, meio pelo qual é distribuído aos tecidos periféricos. O transporte do colesterol e de fosfolípidos do lúmen intestinal para o meio intracelular é facilitado pelo transportador Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1), que está localizado na membrana apical dos enterócitos com o conjunto de semi transportadores do tipo ABC G5/G8 (ABCG5 e ABCG8), que promovem o efluxo de colesterol e de fosfolípidos não esterificados de volta para o lúmen, assim como facilitam a secreção de colesterol de origem biliar [30, 40]. No contexto da economia corpórea de colesterol o transporte via lipoproteínas exerce um papel importante, uma vez que as moléculas são transportadas no plasma como ésteres de colesterol ou colesterol livre associados a estas partículas. As lipoproteínas carregam lípidos na circulação linfática, interstício celular e variam de acordo com sua composição, densidade, carga elétrica, conformação e tamanho. Didaticamente o processo de transporte pode ser dividido na via intestinal, ou seja, a partir do aporte lipídico proveniente da dieta, e hepática [45]. Na via intestinal, após o transporte para o interior dos enterócitos, os lípidos são esterificados por meio da atividade da enzima ACAT2 (Acilcolesterol Acil Transferase 2) no retículo endoplasmático [46]. Somado a isso, a proteína de transferência microsomal (MTP) transfere triglicérides e fosfolípidos para o interior do retículo, promovendo a conjugação destes ao colesterol esterificado e apolipoproteínas B-48 (apo B-48) [47]. Estas estruturas formadas são transportadas ao aparelho de Golgi como quilomícrons (QM), que são secretados na linfa e circulação sanguínea via ducto torácico. Nos capilares extra-hepáticos são convertidos a partículas remanescentes (QMr) por meio da lipólise promovida pela lipoproteína lipase (LPL). Os quilomícrons remanescentes são removidos da circulação pelos hepatócitos via LDLR, cujo mecanismo regulatório foi exemplificado anteriormente. Este processo depende do enriquecimento das partículas remanescentes em apolipoproteína E [42, 48]. Dado o aumento significativo do conteúdo de colesterol nos hepatócitos há uma sinalização para a formação de VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade), iniciando a via hepática. Assim como acontece nos enterócitos, triglicérides, colesterol livre e fosfolípidos são conjugados a uma apolipoproteína (apo B-100), com auxílio da MTP [49]. A VLDL produzida no fígado é secretada na circulação periférica, onde as moléculas de triglicérides de sua constituição são substrato para a LPL, enzima primariamente estimulada pela presença de apolipoproteína C-II (apo C-II) e inibida pela apolipoproteína C-III (apo C-III) [50, 51]. Os ácidos graxos advindos da lipólise de VLDL são redistribuídos para os tecidos, onde podem ser armazenados (no caso do tecido adiposo) ou utilizados (principalmente no músculo esquelético); ainda, as partículas de VLDL depletadas em triglicérides trocam apo C-II e apo E com as partículas de HDL da circulação, sendo então formada

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.617.807

a lipoproteína de densidade intermediária, IDL. As partículas de IDL também são substrato para a atividade da LPL e da lipase hepática (LH), formando a LDL (lipoproteína de baixa densidade) [52]. As partículas de LDL circulantes são as principais responsáveis pelo fornecimento de colesterol aos tecidos periféricos. Entretanto, quase 80% são removidas pelos hepatócitos via LDLR [53]. Após a interação entre a partícula de LDL e o LDLR, a clatrina reveste a vesícula endocítica formada, conferindo estabilidade até a formação do complexo endossomal tardio. O colesterol esterificado presente na LDL é hidrolisado pela enzima colesterol-éster hidrolase ácida [54]. Há um trânsito contínuo de colesterol para as diversas organelas intracelulares e para a membrana plasmática, incluindo domínios específicos como as cavéolas [55]. No meio intracelular, o colesterol livre é convertido a colesterol esterificado pela ação da ACAT (Acilcolesterol Acil Transferase), favorecendo seu armazenamento no citosol sob a forma de gotículas; assim, a ACAT previne a distribuição irregular de colesterol livre nas membranas intracelulares, que consiste em um importante fator citotóxico [46]. Adicionalmente, parte do colesterol livre pode ser oxidado, levando a formação dos óxidos de colesterol, moléculas que se ligam preferencialmente a receptores nucleares que controlam a transcrição de genes envolvidos no metabolismo celular e plasmático de lipídeos [56]. A partícula de HDL (lipoproteína de alta densidade) também atua na homeostase corpórea de colesterol, atuando principalmente no transporte do excesso de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, meio pelo qual é excretado. A HDL é produzida principalmente pelo fígado e intestino a partir da secreção de apolipoproteína A-I pobre ou livre de lipídeos. Por ser altamente instável, a apo A-I interage inicialmente com transportadores ABCA1, meio pelo qual acontece o efluxo de fosfolípidos e de colesterol celular. Conforme adquire lipídeos, a enzima LCAT (lecitina colesterol acil transferase) associada a apo A-I realiza a esterificação das moléculas de colesterol; neste momento a partícula de HDL nascente discoide passa a ter formato esférico (HDL3) graças as características hidrofóbicas dos ésteres de colesterol [57-59]. Conforme adquire lipídeos via ABCA1, ABCG1 ou a HDL apresenta um aumento de diâmetro significativo, formando a HDL2. Neste momento o seu metabolismo envolve a interação com receptores SR-BI (do inglês, Scavenger Receptor Type B, Class I) localizados nos hepatócitos, favorecendo o transporte de colesterol esterificado da partícula para o fígado e formação de partículas de HDL3. Ainda, a HDL2 pode ser convertida a HDL3 por diferentes vias, mas principalmente pela atividade da proteína CETP (do inglês, cholesteryl ester transfer protein) e hidrólise do núcleo lipídico promovido pelas lipases hepática (LH) e endotelial (LE). Quando a CETP promove a troca equimolar entre triglicérides das lipoproteínas que contém apo B (VLDL e LDL) e o colesterol esterificado da HDL são formadas as HDLs ricas em triglicérides, que são substrato para a lipase hepática,

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.617.807

formando partículas menores. A ação conjunta entre CETP e lipase hepática promove a redução do diâmetro da HDL e a formação de partículas pobre em lípidos, que por sua vez podem interagir com o ABCA1, caracterizando um novo ciclo de formação de HDL madura [60]. O efluxo de colesterol, etapa primordial do transporte reverso de colesterol é o processo responsável pela proteção celular contra o acúmulo de colesterol e seus efeitos deletérios. Inclusive, a HDL atua no espaço subendotelial removendo o excesso de colesterol de macrófagos, reduzindo a predisposição e a formação de células espumosas e protegendo contra a aterosclerose [9, 13, 61]. O colesterol associado à partícula que é removido pelo fígado por meio dos receptores SR-BI é secretado na bile para excreção fecal [62, 63]. Para tanto, o colesterol esterificado derivado da HDL é hidrolisado no meio intracelular pela enzima colesterol esterificado hidrolase [64]; já o colesterol livre produzido é utilizado na síntese dos ácidos biliares ou secretado diretamente na bile, em processos regulados pelos transportadores ABCG1, ABCG5/ABCG8, ABCB11 e ABCB4 (do inglês, ATP binding cassette transporter B11 e B4) [62]. De fato, parte do balanço corpóreo de colesterol envolve a excreção sob a forma de esteróis neutros (colesterol e metabolitos resultantes da degradação bacteriana intestinal) ou sais biliares, principalmente por via fecal [13]. O transporte reverso do colesterol (TRC), neste contexto, é considerado como uma via de eliminação do colesterol [9].

1.5 Marcadores de síntese e absorção de colesterol

O metabolismo corpóreo de colesterol pode ser avaliado por meio técnica conhecida como stero balance. Este método, considerado padrão ouro, foi desenvolvido há várias décadas e envolve a utilização de tracers ou marcadores orais/intravenosos ligados ao colesterol. Neste processo é necessário determinar a quantidade de colesterol ingerida na dieta somada a quantidade excretada nas fezes para avaliação dos esteróis neutros e ácidos biliares. Sendo assim, é possível determinar a taxa de síntese, o que muitas vezes indica que esta é maior frente a quantidade consumida na dieta [65]. A metodologia envolve etapas laboriosas, o que dificulta significativamente a sua aplicação em grandes amostras populacionais. A combinação da determinação da síntese junto a avaliação do percentual de absorção de colesterol da dieta (razão D-colesterol/D-sitosterol) contribuiu significativamente para melhorar as informações sobre o metabolismo de colesterol corpóreo como um todo, possibilitando a determinação da absorção absoluta, biliar, da dieta ou endógena [66]. Frente a complexidade e dificuldades metodológicas dos métodos de avaliação tradicionais foram desenvolvidas novas abordagens de determinação do balanço corpóreo de colesterol: entre elas destaca-se a medida de esteróis (não colesterol) plasmáticos. A partir da medida de precursores e fitoesteróis plasmáticos por cromatografia gasosa foram encontradas relações positivas com a síntese e absorção do colesterol, respectivamente [67]. Além disso, um grande

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.617.807

número de estudos aceitam que estes esteróis refletem a síntese e absorção de colesterol absoluta, relacionando-se estreitamente com as medidas destes processos em várias condições metabólicas [68]. Atualmente a determinação destes marcadores é realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC/MS) e geralmente o esqualeno, latosterol e desmosterol são considerados marcadores de síntese, uma vez que atuam como precursores de colesterol. Ainda, o colestanol (um metabólito parcialmente sintetizado no corpo, também presente na dieta), sitosterol e campesterol (conhecidos como fitoesteróis) são moléculas que refletem a absorção do colesterol [67]. Os valores destes esteróis são expressos em razão frente a concentração de colesterol total para eliminar diferenças causadas pelo conteúdo variável das lipoproteínas plasmáticas [69]. Os precursores de colesterol têm sido usados como marcadores relativos da eficiência da síntese do colesterol e flutuam em função dos padrões de síntese. Estes sofrem influência do ritmo circadiano e de fatores de risco como obesidade visceral, pressão arterial elevada, concentrações elevadas de glicose e de triglicérides, além da concentração baixa de HDL-C [61]. Já os marcadores de absorção, como sitosterol e campesterol, estão presentes em sementes e óleos vegetais e estão relacionados estruturalmente ao colesterol, não são sintetizados no organismo animal. Desta maneira, os fitoesteróis refletem a ingestão da dieta, uma vez que interagem com os enterócitos via NPC1L1. Nestes locais são esterificados pela ACAT2, embora em menor extensão quando comparados ao colesterol. Apenas 1-5% dos fitoesteróis consumidos diariamente entram de fato na circulação; o restante é secretado de volta ao lúmen intestinal ou trato biliar por meio dos transportadores ABCG5/G8, presentes tanto nos enterócitos quanto hepatócitos [68, 70]. A utilização de fitoesteróis na dieta tem como objetivo diminuir o LDL-C no plasma. Graças a sua alta hidrofobicidade possuem grande afinidade físico-química pelas micelas na luz intestinal, interferindo na solubilização do colesterol livre nessa estrutura e favorecendo a maior permanência em seu interior em detrimento do colesterol. Com isso, é possível deslocar as moléculas de colesterol para fora da estrutura e aumentar sua excreção nas fezes [70, 71].

1.6 Significado clínico dos marcadores de síntese e absorção do colesterol

Ensaaios clínicos de prevenção primária e secundária demonstraram claramente que a inibição da síntese de colesterol com tratamento hipolipemiante reduz o risco de eventos cardiovasculares e mortalidade [72]. A relação recíproca da síntese de colesterol e os marcadores de absorção de colesterol fortalecem ainda mais os dados e sugere que não só os níveis totais de colesterol sérico, mas também as diferenças na homeostase do colesterol podem estar associadas ao desenvolvimento da aterosclerose [70]. Entretanto, é necessário estabelecer que grande número de fatores que interferem diretamente no metabolismo de colesterol, como idade, sexo, índice de massa corpórea

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.617.807

(IMC), tipo de dieta, comorbidades, uso de medicações e background genético. Desta maneira é esperada uma grande variabilidade nos marcadores de síntese e absorção, uma vez que estes fatores podem estar presentes e que existem diferenças sensíveis nos métodos de análise destes marcadores [68]. Por exemplo, diversos estudos tem avaliado o balanço de colesterol corpóreo na síndrome metabólica e em alguns tipos específicos de dislipidemias, especialmente nas de fundo genético [73]. Ainda, vários trabalhos se concentraram no impacto do uso de estatinas e do diabetes melitus [68]. A relação entre a homeostase de colesterol e o risco cardiovascular é um assunto amplamente estudado mas que ainda está em discussão. O primeiro estudo a avaliar esta relação foi o 4S, seguido alguns anos depois pelo Framingham Offspring Study (Cycle 6) que demonstrou em pacientes com doença cardiovascular estabelecida ou estenose carotídea (>50%) uma maior concentração de marcadores de absorção associada a diminuição dos marcadores de síntese em relação aos controles, em um padrão independentemente associado à DCV [74, 75]. Ainda, no estudo LURIC a razão de elevada absorção e baixa síntese associou-se a gravidade da DCV, além de se mostrar como um preditor de mortalidade. Por outro lado, em outras populações não foram observadas associações ou correlações com marcadores de doença aterosclerótica, como o cIMT [76-78]. Embora a maior parte dos achados forneça evidências de que o padrão de absorção de colesterol elevada somada a síntese reduzida possa ser uma condição pró-aterogênica, ainda existem algumas barreiras importantes nesta compreensão considerando condições metabólicas individuais, inclusive aquelas que culminam no incremento do risco cardiovascular (como o diabetes melitus e síndrome metabólica). De fato, recentemente, Lin et al observou em 86 adultos não diabéticos que a excreção do colesterol endógeno é independentemente e negativamente associado ao cIMT [79].

Hipótese: Vários estudos reforçam a hipótese de que a dinâmica da homeostase de colesterol corpóreo e do desenvolvimento da aterosclerose é complexa e sujeita a grande variabilidade. Neste projeto, propomos avaliar a relação entre os marcadores de síntese e absorção de colesterol e a aterosclerose subclínica (cIMT) em indivíduos assintomáticos; antecipamos interferências nesta associação em função de características individuais, como sexo, idade e antropometria. Entretanto, a exploração destas variáveis em indivíduos assintomáticos poderá contribuir significativamente para a elucidação dos processos envolvidos na aterogênese, com potencial para quantificar o valor preditivo das características individuais e metabólicas sobre estes marcadores de homeostase.

Metodologia Proposta: Estes indivíduos foram selecionados a partir de um convênio estabelecido com Secretaria Municipal de Saúde (SMS) de Campinas (SP) em 2008 (anexo III). Neste, ficou estabelecido o acesso dos resultados do perfil lipídico de jejum (colesterol total, LDL-colesterol,

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.617.807

HDLsubjugantes colesterol, não HDL-colesterol e triglicérides) de indivíduos que espontaneamente buscaram atendimento nos Unidades Básicas de Saúde da referida cidade. As concentrações de colesterol total, HDL e LDL-colesterol, triglicérides, ácido úrico, uréia, creatinina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, gama-glutamyltransferase, fosfatase alcalina foram determinados em sistema automatizado Modular® Analytics Evo (Roche Diagnostics, Burgess Hill, West Sussex, UK) utilizando reagentes Roche Diagnostics® (Mannheim, Germany) comercialmente disponíveis. O hormônio estimulante da tireoide e a tiroxina livre foram mensurados por eletroquimioluminescência em sistema automatizado (Elecys 2010/Roche, Basel, Switzerland) usando reagentes Roche Diagnostics® (Mannheim, Germany). O LDL-colesterol foi calculado pela equação de Friedwald e VLDL-colesterol estimado pela fórmula triglicérides/5. As apolipoproteínas A-I, B e lipoproteína (a) foram quantificadas por nefelometria em sistema automatizado BN II (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany) usando reagentes comercialmente disponíveis (Dade-Boehringer®, Deerfield, Illinois, USA). A concentração de insulina foi determinada usando o ensaio comercial Human Insulin ELISA (Millipore, Billerica, MA, USA). Além disso, foi calculado através da Homeostasis Model Assessment (HOMA) Calculator versão 2.2.2 (University of Oxford, UK) a sensibilidade à insulina (HOMA-S%) e a função das células (HOMA-%), cujo cálculo é baseado nas concentrações de glicose e insulina em jejum calórico. A proteína C reativa (PCR) foi avaliada por imunoturbidimetria utilizando o ensaio ultrasensível Tina-quant® CRP (Roche Diagnostics®, Mannheim, Germany) [82]. O diâmetro da partícula de HDL foi mensurado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (Nanotrac Particle Size Analyzer, Microtrac) após o isolamento da subfração de HDL por meio da precipitação das lipoproteínas que contém apo B (VLDL-C e LDL-C) com polietilenoglicol 8000 (PEG 8000) (Sigma-Aldrich, St. Louis USA). A atividade da paraoxonase (PON1) foi determinada por método enzimático cinético, baseado na hidrólise do substrato (paraoxon, diethyl-p-nitrophenylphosphate, Sigma, St. Louis, MO, USA) pela PON1 e formação de para-nitrofenol, cuja leitura é efetuada a 405nm em espectrofotômetro. As atividades da proteína de transferência de colesterol éster (CETP) e da proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) foram determinadas por meio de ensaios radiométricos exógenos. Já a massa da PLTP foi quantificada por método de ELISA (do inglês, enzyme-linked immunosorbent assay) [84]. As atividades das enzimas lipase hepática e lipoproteína lipase foram mensuradas por meio de ensaio radiométrico exógeno em plasma pósheparina (100U heparina/kg peso), cujo princípio se baseia na liberação de ácidos graxos livres a partir de uma emulsão artificial de trioleína marcada isotopicamente. A atividade endógena da LCAT foi determinada por meio do cálculo da taxa de esterificação de colesterol, enquanto a atividade exógena da LCAT (resultados

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.617.807

expressos em nmol/mL/h) foi determinada usando-se HDL recombinante como substrato. Os marcadores de absorção intestinal de colesterol serão determinados por cromatografia gasosa (GC) acoplada a espectrômetro de massas (MS) (Shimadzu GCMSQP2010 Plus, Kyoto, Japan). A determinação da espessura média da camada íntimo-medial das artérias carótidas foi realizada por um único médico radiologista do Hospital de Clínicas/Unicamp. No procedimento, os indivíduos foram avaliados em decúbito dorsal, com a cabeça elevada em cerca de 20 graus e rotação de aproximadamente 45 graus, usando um sistema de transdutores lineares de 6-9 MHz.

Critério de Inclusão: Nesta proposta serão incluídos indivíduos com idade entre 20 e 75 anos, assintomáticos, com índice de massa corpórea (IMC) igual ou inferior a 30 kg/m², sem uso regular de medicamentos que reconhecidamente interferem no metabolismo lipídico (como estatinas, contraceptivos e terapias de reposição hormonal, por exemplo) e exames clínico/laboratoriais que porventura evidenciassem patologias como o diabetes melito, disfunção tireoidiana, dislipidemias, doenças renais, hepáticas ou cardiovasculares.

Critério de Exclusão: Ainda, foram excluídos todos os indivíduos com hipertensão arterial sistêmica, síndrome metabólica e histórico de tabagismo recente e/ou uso abusivo de álcool.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar se os marcadores séricos da síntese (latosterol e desmosterol) e absorção (sitosterol e campesterol) de colesterol se associam à aterosclerose subclínica, medida como espessura íntimo-medial de artérias carótidas em indivíduos assintomáticos categorizados por sexo, idade e vários marcadores antropométricos (peso corporal, altura, medidas da circunferência da cintura e do quadril e sua relação e índice de adiposidade).

Objetivo Secundário: Analisar quais fatores bioquímicos e/ou metabólicos modificam esta possível associação, incluindo as enzimas e proteínas reguladoras do metabolismo lipídico (lipoproteína lipase, lipase hepática, proteína de transferência de colesterol ester, proteína de transferência de fosfolípidos, lecitina colesterol acil-transferase).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a autora são considerados riscos: Este protocolo de pesquisa não envolve riscos aos indivíduos, uma vez que consiste em uma análise de dados e as análises laboratoriais serão executadas com material previamente coletado.

Segundo a autora, são considerados benefícios: Os benefícios da pesquisa se traduzem em resultados com possível aplicabilidade nas políticas de avaliação de risco cardiovascular.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.617.807

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este protocolo se refere ao Projeto de Pesquisa intitulado "INFLUÊNCIA DOS MARCADORES SÉRICOS DE SÍNTESE E ABSORÇÃO DE COLESTEROL SOBRE A ATEROSCLEROSE SUBCLÍNICA DE CARÓTIDAS EM ADULTOS ASSINTOMÁTICOS", o qual compõe o projeto de especialização de Edite Vieira Silva de Campos, cuja orientadora é a Profa Dra Eliana Cotta de Faria, Professora do Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, com orientação da Dra. Vanessa Helena de Souza Zago, Pesquisadora colaboradora da UNICAMP e Professora da Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC). A Instituição Proponente é FCM/UNICAMP. A pesquisa informa orçamento estimado em R\$ 2518,65. O cronograma apresenta início em Abril de 2018 e final previsto para Dezembro de 2019. Serão analisadas amostras oriundas de 306 participantes, sendo estes aqueles que voluntariamente participaram de protocolo de pesquisa anterior (Temático FAPESP n°2006/60585-9).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Análise dos documentos de apresentação obrigatória:

- 1) Informações Básicas do Projeto - PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1025332.pdf de 03/04/2018. Adequado.
- 2) Cronograma - Cronograma.pdf de 03/04/2018. Pendência atendida.
- 3) Projeto Detalhado / Brochura Investigador - Projeto_para_CEP.pdf de 03/04/2018. Pendência atendida.
- 4) TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência - TCLE.pdf de 14/11/2017. Propõe dispensa de TCLE. Adequado.
- 5) Folha de Rosto – datada e assinada - folhaderostopdf.pdf de 14/11/2017
- 6) Outros
 - 6.1) AutorizacaodaPrefeitura.pdf de 07/11/2017. Adequado.
 - 6.2) ProrrogaçaoAutorizacaoPrefeitura2012.pdf de 07/11/2017 – documento corrompido, mas existe uma versão adequada no projeto detalhado.
 - 6.3) Anexo1_Relatorio_Final.pdf de 03/04/2018 . Adequado.
 - 6.4) Carta_Resposta.pdf de 03/04/2018
 - 6.5) DOCCarteirinhadeidentificacao.pdf de 14/11/2017

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Observações

1. Quanto ao Orçamento:

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126	
Bairro: Barão Geraldo	CEP: 13.083-887
UF: SP	Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187
	E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.617.807

1.1 Pendência atendida.

2. Quanto ao cronograma.

2.1 Pendência atendida.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.617.807

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1025332.pdf	03/04/2018 12:39:02		Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	03/04/2018 12:35:33	Edite Vieira Silva de Campos	Aceito
Outros	Anexo1_Relatorio_Final.pdf	03/04/2018 12:34:55	Edite Vieira Silva de Campos	Aceito
Outros	Carta_Resposta.pdf	03/04/2018 12:28:26	Edite Vieira Silva de Campos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_para_CEP.pdf	03/04/2018 12:26:24	Edite Vieira Silva de Campos	Aceito
Outros	DOCcarteirinhadeidentificacao.pdf	14/11/2017 14:29:28	Edite Vieira Silva de Campos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	14/11/2017 14:29:06	Edite Vieira Silva de Campos	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostopdf.pdf	14/11/2017 14:27:38	Edite Vieira Silva de Campos	Aceito
Outros	AutorizacaodaPrefeitura.pdf	07/11/2017 13:16:58	Edite Vieira Silva de Campos	Aceito
Outros	ProrrogaocAutorizacaoPrefeitura2012.pdf	07/11/2017 13:15:54	Edite Vieira Silva de Campos	Aceito
Outros	ElianaCFariaResumido.pdf	07/11/2017 13:15:03	Edite Vieira Silva de Campos	Aceito
Outros	VANESSARESUMIDO.pdf	07/11/2017 13:14:22	Edite Vieira Silva de Campos	Aceito
Outros	EDITECurr.pdf	07/11/2017	Edite Vieira Silva de Campos	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.617.807

Outros	EDITECurr.pdf	13:13:47	Campos	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_2007.pdf	07/11/2017 13:08:21	Edite Vieira Silva de Campos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 24 de Abril de 2018

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
 (Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

7.4 Autorização Prefeitura de Campinas



PREFEITURA MUNICIPAL DE CAMPINAS
Secretaria Municipal de Saúde



AUTORIZAÇÃO

Autorizo a realização da Pesquisa, intitulada “**RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HDL-COLESTEROL COM O METABOLISMO DE COLESTEROL EM MONÓCITOS É NO PLASMA HUMANO**”, já aprovada no Comitê de Ética da Universidade Estadual de Campinas e que conta com apoio da FAPESP.

Declaro estar ciente que a pesquisa será desenvolvida por pesquisadores do Departamento de Patologia Clínica da UNICAMP, coordenados pela Professora Doutora Eliana Cotta de Faria, junto a usuários do Sistema Único de Saúde, a partir da avaliação mensal dos resultados dos perfis lipídicos da população atendida nos serviços da Secretaria Municipal de Saúde, tomando como referência os exames realizados no Laboratório Municipal e que a coordenação do mesmo está de acordo com a parceria para a realização da pesquisa.

Campinas, 23 de julho de 2008

Dr. JOSÉ FRANCISCO KERR SARAIVA
Secretário Municipal de Saúde.

7.5 Comprovante de submissão à revista Clinical Biochemistry

----- Forwarded message -----

De: **Clinical Biochemistry** <cm@editorialmanager.com>

Date: sáb., 8 de ago. de 2020 às 18:33

Subject: Confirming submission to Clinical Biochemistry

To: Vanessa Helena de Souza Zago <vanessasouzazago@gmail.com>

This is an automated message.

PLASMA CAMPESTEROL IS POSITIVELY ASSOCIATED WITH
CAROTID PLAQUES IN ASYMPTOMATIC SUBJECTS

Dear Mrs Zago,

We have received the above referenced manuscript you submitted to
Clinical Biochemistry.

To track the status of your manuscript, please log in as an author
at <https://www.editorialmanager.com/club/>, and navigate to the
"Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Clinical Biochemistry

More information and support

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's
Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>