

Isabel Maria Aguilar Cabral Andrade Ramalho

CONTRIBUTO DOS MARCADORES DE SÍNTESE E DE ABSORÇÃO DO COLESTEROL NA TERAPÊUTICA HIPOCOLESTEROLEMIANTE

Tese de doutoramento em Ciências da Saúde, ramo das Ciências Biomédicas, orientada pelo Senhor Professor Doutor Fernando Ramos, co-orientada pela Senhora Professora Doutora Lélita Santos e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Dezembro 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**CONTRIBUTO DOS MARCADORES DE SÍNTESE E DE
ABSORÇÃO DO COLESTEROL NA TERAPÊUTICA
HIPOCOLESTEROLEMIANTE**

Isabel Maria Aguilar Cabral Andrade Ramalho

Tese de doutoramento na área científica de Ciências da Saúde, ramo das Ciências Biomédicas, orientada pelo Senhor Professor Doutor Fernando Ramos, co-orientada pela Senhora Professora Doutora Lélita Santos e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Este texto respeita a nova ortografia
para a aplicação do Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa.

Dedico este trabalho à minha filha Mariana, a luz da minha vida.

“O ponto que ontem era invisível é hoje o ponto de chegada. Amanhã será o ponto de partida.”

(Macaulay)

INDICE

INDICE DE ABREVIATURAS	XI
AGRADECIMENTOS	XV
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XIX
<u>CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO</u>	21
1.1 ATEROSCLEROSE E O METABOLISMO LIPÍDICO	23
1.2 REGULAÇÃO DA HOMEOSTASIA DO COLESTEROL	23
1.3 FISIOLOGIA DO COLESTEROL	24
1.3.1 Transporte do colesterol	24
1.3.2 Metabolismo do colesterol	26
1.3.2.1 Síntese do colesterol	26
1.3.2.2 Absorção do colesterol	29
1.3.2.3 Recetores, transportadores, enzimas e lipoproteínas envolvidas no metabolismo do colesterol ao nível do enterócito	30
1.3.2.4 Recetores, transportadores, enzimas e lipoproteínas envolvidas no metabolismo do colesterol ao nível do fígado	31
1.3.2.5 Excreção do colesterol	32
1.4 QUANTIFICAÇÃO DO METABOLISMO DO COLESTEROL	33
1.4.1 Métodos de quantificação da síntese do colesterol	33
1.4.1.1 Balanço do colesterol	34
1.4.1.2 Conversão fracional do esqualeno	34
1.4.1.3 Incorporação de deutério	35
1.4.1.4 Análise da distribuição de massa isotopomérica	35
1.4.1.5 Quantificação de percursos da síntese do colesterol	36
1.4.2 Métodos de quantificação da absorção do colesterol	37
1.4.2.1 Perfusão intestinal	37
1.4.2.2 Balanço do colesterol	37
1.4.2.3 Razão de radioisótopos	38
1.4.2.4 Isótopos estáveis	39
1.4.2.5 Quantificação sérica de fitoesteróis	39

1.4.3 Métodos combinados de quantificação da absorção e da síntese do colesterol	41
1.4.3.1 Métodos analíticos de determinação de esteróis não colesterolémicos	42
1.5 TERAPÊUTICA HIPOCOLESTEROLEMIANTE	44
1.5.1 Abordagem não farmacológica	45
1.5.1.1 Estilos de vida	45
1.5.1.2 Alimentos suplementados com fitoesteróis	51
1.5.1.2.1 Mecanismos de ação hipocolesterolemiante dos fitoesteróis	53
1.5.2 Abordagem farmacológica	56
1.5.2.1 Estatinas	57
1.5.3 Abordagem combinada com estatinas	60
<u>CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS</u>	67
<u>CAPÍTULO 3 – POPULAÇÃO DE ESTUDO E MÉTODOS</u>	69
3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO	71
3.1.1 População de estudo 1	71
3.1.2 População de estudo 2	73
3.2 MÉTODOS	73
3.2.1 ESTUDO 1	73
3.2.2 ESTUDO 2	75
3.2.3 Preparação e análise da amostra	76
<u>CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	83
4.1 ESTUDO 1	85
4.1.1 Caracterização da população de estudo	85
4.1.2 Marcadores séricos do metabolismo do colesterol e perfil lipídico em função do sexo ..	89
4.1.3 Marcadores séricos do metabolismo do colesterol e perfil lipídico em função da idade.	91
4.1.4 Marcadores séricos do metabolismo do colesterol e perfil lipídico em função de fatores de risco cardiovascular	92

4.1.5 Caracterização com base nos perfis de metabolismo do colesterol	97
4.2 ESTUDO 2	100
4.2.1 Caracterização da população de estudo	100
4.2.2 Efeito da intervenção com PS-FM sobre os marcadores do metabolismo do colesterol e o perfil lipídico	101
<u>CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS</u>	113

BIBLIOGRAFIA

ANEXOS

INDICE DE ABREVIATURAS

(Nota: Algumas abreviaturas usadas no corpo do texto foram mantidas na sua versão original em língua inglesa face à sua adoção corrente no nosso léxico técnico-científico, sendo incluídas neste índice de abreviaturas, em inglês e traduzidas para a língua portuguesa)

AB	Ácidos biliares
ABC	ATP binding cassette
ACAT	Acyl CoA: cholesterol acyl transferase/Acil CoA: colesterol acil transferase
ACC	American College of Cardiology
ACEI	Angiotensin-converting enzyme inhibitor/Inibidor da enzima de conversão da angiotensina
ACES	Agrupamento de Centros de Saúde
AHA	American Heart Association
ANOVA	Analysis of variance/Análise de variância
Apo	Apoprotein/Apoproteína
ARB	Angiotensin receptor blocker/Bloqueador do recetor da angiotensina
ARSC	Administração Regional de Saúde do Centro
BSEP	Bile salt export pump/Bomba de exportação de sais biliares
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide/N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
c-HDL	Colesterol das lipoproteínas de alta densidade
c-LDL	Colesterol das lipoproteínas de baixa densidade
CAPPCAE	Comissão de Avaliação de Pedidos de Patrocínio Científico e Autorização de Estudos
CETP	Cholesteryl ester transfer protein/Proteína de transferência dos ésteres de colesterol
CM	Chylomicron
CT	Colesterol total
CYP	Cytochrom P/Citocromo P
DASH	Dietary Approaches to Stop Hypertension

DCV	Doença cardiovascular
DI	Deuterium incorporation/Incorporação de deutério
DIRECT	Dietary Intervention Randomized Controlled Trial
DMM	Dietary mixed micelle/Micela mista
DP	Desvio padrão
DTE	1,4-dithyoerythritol/1,4-ditioeritritol
DYSIS	Dyslipidemia International Study
EC	Ésteres de colesterol
EPIC	European Prospective Investigation into Cancer
FID	Flame ionization detector/Detector de ionização de chama
FM	Fermented milk/Leite fermentado
GC	Gas chromatography/Cromatografia gasosa
HDL	High-density lipoprotein/Lipoproteína de alta densidade
HDL-C	High-density lipoprotein cholesterol
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutharyl-coenzyme A/3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A
HMGR	3-hydroxy-3-methylglutharyl-coenzyme A reductase/3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase
HPLC	High pressure liquid chromatography/Cromatografia líquida de alta pressão
HUC	Hospitais da Universidade de Coimbra
IDL	Intermediate-density lipoprotein/Lipoproteína de densidade intermédia
IMC	Índice de massa corporal
IMPROVE-IT	IMProved Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy Trial
INSIG	Insulin-induced gene/Gene insulino-induzido
IRMS	Isotope ratio mass spectrometry/Espectrometria de massa da razão isotópica
IS	Internal standard/Padrão interno
LC	Liquid chromatography/Cromatografia líquida
LCAT	Lecithin-cholesterol acyltransferase/Lecitina-colesterol-acil-transferase

LDL	Low-density lipoprotein/Lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	Low-density lipoprotein cholesterol
LDLR	Low-density lipoprotein receptor/Recetor da lipoproteína de baixa densidade
Lp(a)	Lipoprotein (a)/Lipoproteína (a)
LPL	Lipoprotein lipase/Lipoproteína lipase
LRP1	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1/Proteína 1 relacionada com o recetor da LDL
LSWgroup	Lifestyle work group/Grupo de trabalho em estilos de vida
LXR	Liver X receptor/Recetor X hepático
MagMIPS	Magnetic molecular imprinted polymers/Nanopolímeros magnéticos
MIDA	Mass isotopomer distribution analysis/Análise de distribuição de massa isotopomérica
MS	Mass spectrometry/Espectrometria de massa
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide/ N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida
MTBSTFA	N-Methyl-N-tert-butyldimethylsilyltrifluoroacetamide/N-metil-N-(tert-butildimetilsilil) trifluoroacetamida
MTP	Microsomal triglyceride transfer protein/Proteína microsomal de transferência de triglicerídeos
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate/Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina
NCEP-ATP III	National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III
NCS	Noncholesterol sterols/Esteróis não colesterolémicos
NIH-AARP	National Institutes of Health-American Association of Retired Persons
NPC1L1	Niemann-Pick C1 Like 1
PCSK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9/Pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9
PL	Phospholipids/Fosfolípidos
PP	Pirofosfato
PPAR	Peroxisome-proliferated activated receptor/Recetor activado por proliferadores de peroxissoma

PREDIMED	Prevención con Dieta Mediterránea
PS	Plant sterols (or phytosterols)/Fitoesteróis
PSE	Plant sterol esters/Ésteres de fitoesteróis
PS-FM	Phytosterol enriched fermented milk/Leite fermentado suplementado com PS
RCT	Randomized clinical trials/Ensaio clínico randomizado
RCV	Risco cardiovascular
Qm	Quilomicra
SB	Sais biliares
SCAP	SREBP cleavage-activating protein/Proteína de activação da clivagem da SREBP
SCORE	Systematic Coronary Risk Evaluation
SI	Sistema Internacional
SIM	Selective ion monitoring/Monitorização seletiva de iões
SR-B1	Scavenger receptor class B type 1/Recetor scavenger classe B tipo 1
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein/Proteína ligante do elemento regulador de esteróis
TG	Triglyceride/Triglicerídeos
TICE	Transintestinal cholesterol excretion/Excreção trans-intestinal do colesterol
TMCS	Trimethylchlorosilane/Trimetilclorosilano
TMIS	Trimethyliodosilane/Trimetiliodosilano
TRC	Transporte reverso do colesterol
UNESCO	United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization
USDA	United States Department of Agriculture
USF	Unidade de Saúde Familiar
VLDL	Very low-density lipoprotein/Lipoproteína de muito baixa densidade

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Fernando Ramos agradeço por me ter acolhido no seu laboratório, me ter proposto fazer parte deste interessante projeto e proporcionado as condições essenciais ao desenvolvimento do trabalho de investigação, bem como por todo o apoio prestado ao longo destes anos.

À minha coorientadora, Professora Doutora Lèlita Santos, a minha gratidão pela disponibilidade sempre demonstrada para o debate de ideias, acompanhamento e amizade ao longo deste processo.

À Professora Doutora Catarina Resende de Oliveira, agradeço a tutoria deste projeto e expresso a minha gratidão e reconhecimento pela disponibilidade e amizade sempre demonstradas em todo este percurso.

A todos os meus colegas de trabalho e de doutoramento que contribuíram de formas diferentes, mas essenciais, para que este trabalho chegasse a bom porto. Sob pena de ser injusta, agradeço em especial aos colegas amigos Anabela Correia Martins, Ana Filipa Cardoso, Ana Valado, Telmo Pereira, João Paulo Figueiredo, Armando Caseiro, Clara Rocha, Célia Alcobia e Ana Paula Fonseca que estiveram sempre presentes e com quem sempre pude contar.

À Presidência da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, agradeço por me terem apoiado no desenvolvimento deste trabalho de investigação.

Muitas são as instituições a quem ficarei eternamente grata pois tornaram possível a concretização deste trabalho. Agradeço em especial aos idosos da Casa do Povo da Abrunheira (com o apoio da Enfermeira Mónica Nobre), da Casa dos Pobres de Coimbra (com o apoio da Enfermeira Rosário) e da Santa Casa da Misericórdia de Montemor-o-Velho (com o apoio da Enfermeira Joana Catarina Martins); aos utentes do Centro de Saúde de Eiras e das Unidades de Saúde Familiar Briosa, CelaSaúde e Mondego (com o apoio dos seus diretores); aos discentes, docentes e não docentes da Escola Superior de Enfermagem de Coimbra e da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra; à CoimbraConnect e Instituto Pedro Nunes; ao CoimbraLAB-Laboratório de Análises Clínicas; ao Núcleo da Região Centro da Fundação Portuguesa de Cardiologia; à Unilever-Jerónimo Martins Lda. (na pessoa da Dra. Helena Cid) e ao laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

À minha família, o grande suporte da minha vida. Ao meu pai, que já perdi, e à minha mãe que foi inextinguível no apoio e ânimo nos momentos difíceis, a ambos agradeço, porque o vosso orgulho em mim foi um motor importante nesta caminhada. Aos meus irmãos por me fazerem acreditar em mim e por estarem sempre do meu lado.

É também por todos que procuro triunfar.

Muito obrigada a todos.

RESUMO

As concentrações séricas de colesterol circulante são o produto do balanço entre o *input* da absorção exógena por via da alimentação, da síntese endógena das vias hepática e extra-hepáticas e da excreção. A disrupção desse equilíbrio pode causar a desregulação da homeostasia do metabolismo do colesterol, com reflexo na patogênese e progressão da doença cardiovascular aterosclerótica.

Cada vez é maior o número de indivíduos com terapêutica hipocolesterolemiantes, mas nem todos atingem o alvo terapêutico recomendado. Na variação do benefício da terapêutica (farmacológica ou dietética) estará certamente implícita a intervariabilidade do metabolismo do colesterol.

Para o estudo do metabolismo do colesterol pode recorrer-se a métodos absolutos e/ou relativos. Face ao carácter invasivo, complexo e moroso dos métodos absolutos, são cada vez mais utilizados os precursores da biossíntese do colesterol e os fitoesteróis como marcadores relativos da eficiência da síntese e da absorção do colesterol, respetivamente, tanto mais que esta abordagem permite uma aplicação a larga escala e em estudos epidemiológicos.

Porém ainda não existe um método analítico de referência, o que dificulta a comparabilidade de resultados entre estudos e a utilização em análises de rotina, estando contudo validada a determinação desses marcadores em amostras séricas humanas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa ou a deteção por ionização de chama.

No nosso estudo do metabolismo do colesterol recorreu-se à cromatografia gasosa-espectrometria de massa (com monitorização seletiva de iões) para a determinação dos principais marcadores da síntese (latosterol e desmosterol) e da absorção (sitosterol, campesterol e o colestanol).

Por recrutamento ao nível dos cuidados de saúde primários (região Centro), 212 indivíduos adultos (30-65 anos) hipercolesterolémicos (CT \geq 200 mg/dL e/ou c-LDL \geq 100 mg/dL), sem terapêutica hipocolesterolemiantes, foram incluídos no nosso estudo pioneiro de caracterização do metabolismo do colesterol, através da determinação dos referidos marcadores séricos das vias da síntese e da absorção, complementado com a análise da ficha lipídica e a caracterização sociodemográfica, clínica e de estilos de vida.

Foram observadas diferenças significativas em termos dos marcadores do metabolismo do colesterol e do perfil lipídico, em função do sexo, apresentando as mulheres, concentrações

mais baixas dos marcadores de síntese do colesterol e dos parâmetros lipídicos tradicionais (à exceção do c-HDL) do que os homens.

Verificou-se uma associação positiva significativa entre a idade e os marcadores da absorção do colesterol.

A categorização em perfis de metabolismo do colesterol revelou diferenças significativas em função do sexo e da idade, com os indivíduos do sexo masculino a evidenciar tendência para um perfil de absorção baixa/síntese elevada, o qual está associado a maior prevalência de obesidade, diabetes e síndrome metabólica, caracterizado por valores elevados de índice de massa corporal e de lípidos aterogénicos (e concentrações baixas de c-HDL).

Mais ainda, o contributo dos marcadores do metabolismo do colesterol na terapêutica hipocolesterolemizante foi avaliado em idosos hipercolesterolémicos (c-LDL ≤ 130 mg/dL) tratados com estatinas, através do estudo do efeito aditivo da toma de um leite fermentado suplementado com fitoesteróis (2 g/dia). A redução máxima do c-LDL ocorreu ao fim do segundo período de três semanas da intervenção dietética. Observou-se um aumento dos níveis séricos dos fitoesteróis campesterol e sitosterol. A supressão da absorção do colesterol pelos fitoesteróis traduziu-se por uma diminuição dos níveis de colestanol e por um aumento recíproco da taxa de síntese de colesterol.

Indivíduos idosos tratados regularmente com o agente inibidor da síntese do colesterol, as estatinas, ainda têm benefício clínico através de intervenção dietética hipocolesterolemizante sobre a via da absorção do colesterol, um leite fermentado magro suplementado com fitoesteróis.

Este estudo pioneiro no nosso país, de caracterização do metabolismo do colesterol veio disponibilizar gamas de concentrações de esteróis não colesterolémicos usados como marcadores relativos da síntese e da absorção do colesterol, típicas da população portuguesa, e assim contribuir para a futura definição de intervalos de referência, em complementaridade das classes de risco existentes para o perfil lipídico.

A categorização em perfis de metabolismo do colesterol permite a identificação dos indivíduos com uma taxa elevada, intermédia ou baixa de absorção (ou a inversa taxa de síntese) de colesterol, podendo ser útil na optimização individual da terapêutica hipocolesterolemizante.

ABSTRACT

Serum cholesterol concentrations reflect the balance between exogenous cholesterol derived from absorption of dietary cholesterol, endogenous cholesterol from hepatic and extra-hepatic synthesis, and excretion. The disruption of this equilibrium may lead to the dysregulation of cholesterol homeostasis, which plays a crucial role in the pathogenesis and progression of the atherogenic cardiovascular diseases.

There are a growing number of individuals treated for hypercholesterolemia, but most still fail to attain the therapeutic LDL-C goal. The benefit resulting from a lifestyle/drug lipid-lowering therapy certainly reflects the broad range of variability of the cholesterol metabolism.

Absolute and/or relative methods can be used for measuring human cholesterol metabolism. However, absolute measurement is invasive, methodologically complicated and time consuming. Therefore, the measurement of cholesterol biosynthesis precursors and of plant sterols, as surrogate markers of cholesterol synthesis and absorption, respectively, is increasingly being used, particularly because this approach is the only one that can be used for large-scale trials or population based studies.

But there is still no reference method, which hampers the comparison of results between studies and their widespread use in routine measurements, although analysis by gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-flame ionization detector has been reported to be completely validated in human serum samples.

In our study of the cholesterol metabolism, gas chromatography-mass spectrometry (with selective ion monitoring) was used for the determination of the surrogate markers of cholesterol synthesis (lathosterol and desmosterol) and absorption (sitosterol, campesterol and cholesterol).

After recruitment at primary health care units (Central region of Portugal), 212 adults (30-65 years old) with hypercholesterolemia (TC \geq 200 mg/dL and/or LDL-C \geq 100 mg/dL), none of whom were on any lipid-lowering therapy, were enrolled in our pioneering study for the characterization of the cholesterol metabolism, through the quantification of serum cholesterol absorption and synthesis surrogate markers and classical lipid parameters. The participants were also evaluated for socio-demographic, clinical and lifestyle characterization.

Overall, sex-specific significant differences were observed in the cholesterol metabolism markers and lipid profiles; women had lower cholesterol synthesis marker concentrations and

lipid parameters (except for HDL-C concentrations). Age-related significant differences were also found, including higher concentrations of cholesterol absorption markers in association with increasing age.

When categorized into cholesterol metabolism profiles, our study showed sex and age-specific significant differences. Men had a higher tendency to be included in the low cholesterol absorption/high cholesterol synthesis trait, which is associated with a higher prevalence of obesity, diabetes and metabolic syndrome, as evidenced by their higher BMI, higher atherogenic lipid concentrations and lower HDL-C.

In addition, these surrogate cholesterol markers were also assessed in elderly statin-treated patients (LDL-C \leq 130 mg/dL) to study the “add-on” effect of 2g/day plant sterol enriched-fermented milk. Higher LDL-C reduction was obtained after the second 3-week period of intervention. Serum plant sterols levels of campesterol and sitosterol increased from baseline. Suppression in cholesterol absorption by plant sterols resulted in lower circulating cholesterol concentrations and in a reciprocal rise of the synthesis rate.

Elderly patients treated regularly with statins, an inhibitor of the cholesterol biosynthesis, still show clinical benefit through non-pharmacological lipid-lowering intervention on the intestinal absorption, such as the association of a plant sterol enriched-low fat fermented milk.

This is the first study conducted in our country for the characterization of cholesterol metabolism on the basis of non-cholesterol sterols used as surrogate markers of cholesterol synthesis and absorption, thus, rendering available ranges of concentrations typical of the Portuguese population, and also contributing for future definition of reference ranges, complementing the existing risk classes of the classical lipid parameters.

The categorization into profiles of cholesterol metabolism allows the identification of individuals as having high, intermediate or low rates of gastrointestinal cholesterol absorption (and the inverse rates of hepatic synthesis), and extends the basis for phenotype-driven clinical assessments to guide lipid-lowering therapy.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1.1 ATEROSCLEROSE E O METABOLISMO LIPÍDICO

A aterosclerose é uma das principais manifestações da doença cardiovascular (DCV) e a DCV aterosclerótica continua a ser a causa *major* de morte e incapacidade. Na sua patogênese estão identificados como componentes-chave, a inflamação da parede vascular e a desregulação do metabolismo dos lípidos (Libby *et al.*, 2009). Nos estádios precoces da aterogênese, a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL, *low-density lipoprotein*) e o desequilíbrio do balanço das lipoproteínas despoletam a expressão de citocinas pró-inflamatórias, tendo como consequências a disfunção e o dano do endotélio arterial. Por sua vez, a disfunção endotelial leva à acumulação sub-endotelial de lipoproteínas aterogênicas e à adesão leucocitária no endotélio (den Dekker *et al.*, 2010). O dano endotelial promove a formação de placas ateromatosas associadas à deposição de colesterol e de outros produtos de excreção celular. A acumulação de metabolitos de natureza lipídica em tecidos não adiposos induz um estado inflamatório crônico e promove a infiltração e a ativação de macrófagos (Prieur *et al.*, 2010). Através da modulação da função macrofagocitária, os compostos lipídicos, como por exemplo lipoproteínas oxidadas, ácidos gordos livres e o colesterol, entre outros, propiciam a instabilidade da placa ateromatosa na parede arterial e contribuem para o desenvolvimento da doença inflamatória hepática, renal e muscular.

Na interface entre o metabolismo lipídico e a inflamação pode ainda destacar-se o papel de recetores nucleares, tais como o recetor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR, *peroxisome-proliferated activated receptor*) e o recetor X hepático (LXR, *liver X receptor*) que desempenham a função de sensores lipídicos (Prieur *et al.*, 2010).

Em suma, a aterosclerose é reconhecida como uma doença inflamatória, onde o sistema imune desempenha um papel crucial na sua iniciação e progressão, tendo na sua patogênese a desregulação da homeostasia dos lípidos, pelo que os níveis circulantes de colesterol plasmático têm sido um alvo primário da terapêutica na prevenção e tratamento da DCV aterosclerótica (Liu *et al.*, 2006; Libby *et al.*, 2009).

1.2 REGULAÇÃO DA HOMEOSTASIA DO COLESTEROL

A homeostasia do colesterol corresponde a um processo no qual os níveis de colesterol são regulados de forma controlada, por diversos fatores endógenos e exógenos. Para garantir a homeostasia, o organismo tem de integrar a síntese *de novo* do colesterol, a captação

(mediada por recetores) do colesterol da circulação, a incorporação do colesterol nas membranas biológicas e a secreção nas lipoproteínas, assim como a acumulação intracelular de ésteres de colesterol (EC) e o metabolismo dos oxisteróis, sais biliares (SB) e hormonas esteróides (Rezen *et al.*, 2011).

Numa primeira instância, a regulação do conteúdo intracelular de colesterol livre é feita através da modificação covalente de enzimas, por exemplo por reações de fosforilação/desfosforilação, sendo, se necessário, posteriormente coadjuvada pela regulação de longo prazo, que pode envolver a transcrição de enzimas, a degradação e a captação do colesterol pelos recetores da LDL (LDLR). Se o conteúdo em colesterol no fígado for baixo (inferior a 5% do total ao nível do retículo endoplasmático) ocorre a modulação da expressão génica, resultando em aumento da captação do colesterol circulante, redução do efluxo para o plasma, elevação da síntese de colesterol, diminuição da síntese de SB e exportação do colesterol esterificado armazenado. Em situação de abundância de colesterol (acima de 5%) diminui a biossíntese de colesterol, aumenta o efluxo de colesterol para a circulação, assim como a síntese de SB e a esterificação (Radhakrishnan *et al.*, 2008). Estes processos são regulados maioritariamente por dois fatores de transcrição, a proteína ligante do elemento regulador de esteróis 2 (SREBP2, *sterol regulatory element-binding protein 2*) e o LXR que funcionam como sensores lipídicos em resposta aos níveis celulares de esteróis (Rezen *et al.*, 2011). Estas proteínas envolvidas nesta regulação cíclica por retroalimentação são codificadas por diversos genes, nomeadamente os genes insulino-induzidos INSIG 1 e 2, o gene da proteína de ativação da clivagem (proteolítica) da SREBP (SCAP, *SREBP cleavage-activating protein*) e os genes das proteases dos SREBPs do sítio 1 e 2 (S1P e S2P) (Fink *et al.*, 2005).

Para além desta regulação, a síntese do colesterol está ainda sob o controlo do ritmo circadiano (Acimovic *et al.*, 2009).

1.3 FISILOGIA DO COLESTEROL

1.3.1 Transporte do colesterol

O colesterol é uma molécula lipofílica e é transportado na corrente sanguínea através de lipoproteínas, partículas complexas, constituídas por moléculas proteicas, as apoproteínas, e lipídicas (a fração lipídica é formada por fosfolípidos (PL), triglicerídeos (TG) e colesterol).

A nomenclatura das apoproteínas baseia-se na classificação proposta por Alaupovic (1971), resumindo-se na Tabela 1.1 as principais apoproteínas, a sua função primordial e o respetivo peso molecular.

Tabela 1.1 - Características das principais apoproteínas (adaptado de Olson, 2000)

Apoproteína	Peso molecular (kDa)	Função
A-I	29	Estrutural nas HDL; Ativação da LCAT
A-II	17,5	Proteína estrutural nas HDL
B-100	549	Ligando do recetor das LDL; Proteína estrutural das VLDL, IDL e LDL
B-48	264	Proteína estrutural das Qm
C-I	6,6	Ativação/Cofator da LCAT
C-II	8,9	Ativação/Cofator da LPL
C-III	8,8	Proteína estrutural das HDL
E	34	Ligando do recetor das LDL

Legenda: HDL, High-density lipoprotein/Lipoproteína de alta densidade; IDL, Intermediate-density lipoprotein/Lipoproteína de densidade intermédia; LCAT, lecithin-cholesterol acyltransferase/lecitina-colesterol-acil-transferase; LDL, low-density lipoprotein/Lipoproteína de baixa densidade; LPL, lipoprotein lipase/lipoproteína lipase; Qm, quilomicra; VLDL, Very low-density lipoprotein/Lipoproteína de muito baixa densidade

Quanto às lipoproteínas consideram-se habitualmente seis grandes classes: quilomicra (Qm), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL, *very low density lipoprotein*), lipoproteínas de densidade intermédia ou intermediária (IDL, *intermediate density lipoprotein*), lipoproteínas de baixa densidade (LDL, *low density lipoprotein*), lipoproteínas de alta densidade (HDL, *high density lipoprotein*) e a lipoproteína A (Lp(a)). Na Tabela 1.2 estão descritas as principais características destas lipoproteínas.

Tabela 1.2 - Características das principais lipoproteínas (adaptado de Olson, 2000)

Classe	Densidade (g/mL)	Dimensão (nm)	Lípidos principais	Apoproteínas principais
Qm	< 0,93	100-500	TG exógenos	B-48, C-II, E
VLDL	0,93-1,006	30-80	TG endógenos	B-100, C-II, E
IDL	1,006-1,019	25-50	EC e TG	B-100, E
LDL	1,063-1,210	18-28	EC	B-100
HDL	1,063-1,210	5-15	EC	A, C-II, E
Lp(a)	1,090-1,400	25-30	EC	B-100 e glicoproteínas

Legenda: EC, ésteres de colesterol; HDL, high-density lipoprotein/lipoproteína de alta densidade; IDL, intermediate-density lipoprotein/lipoproteína de densidade intermédia; LDL, low-density lipoprotein/lipoproteína de baixa densidade; Lp(a), lipoprotein (a)/lipoproteína (a); VLDL, very low-density lipoprotein/lipoproteína de muito baixa densidade; TG, triglicéridos; Qm, quilomicra

A fisiologia do metabolismo das lipoproteínas foi já extensivamente alvo de revisão (Silva, 2000; Tulenko e Sumner, 2002), pelo que não será aqui incluída.

1.3.2 Metabolismo do colesterol

A absorção, a síntese e a excreção do colesterol contribuem para manter a homeostasia do metabolismo do colesterol, e dessa forma, os níveis de colesterol plasmático.

O colesterol exógeno é absorvido no intestino enquanto o colesterol endógeno é produzido quer no fígado quer nos tecidos periféricos.

O fígado tem sido considerado o órgão *major* do controlo da manutenção da homeostasia do colesterol: facilita a depuração das VLDL e do conteúdo em colesterol dos remanescentes de Qm, sintetiza colesterol, sintetiza e segrega as HDL (nascentes), segrega colesterol e SB para a biliar e está envolvido no transporte reverso do colesterol (TRC) (Tulenko e Sumner, 2002). O TRC tem sido definido, de um ponto de vista clássico, como o processo através do qual o colesterol proveniente de tecidos periféricos é transportado ao fígado, sendo excretado via biliar para as fezes na forma de esteróis neutros e ácidos biliares (AB).

Nos últimos anos, o intestino tem vindo a ser alvo de reconhecida importância em diversos aspetos da fisiologia do colesterol, nomeadamente pelo grande impacto sobre a homeostasia do colesterol ao nível da (re)absorção, excreção fecal e síntese *de novo* (Kruit *et al.*, 2006).

1.3.2.1 Síntese do colesterol

A síntese da molécula do colesterol (27C) inicia-se a partir da unidade precursora, a acetilcoenzima A (Ac-CoA) através de uma complexa via metabólica (esquematizada na Figura 1), que de certa forma pode ser interpretada como estando dividida em duas secções: a secção do esqualeno e a secção do pós-esqualeno.

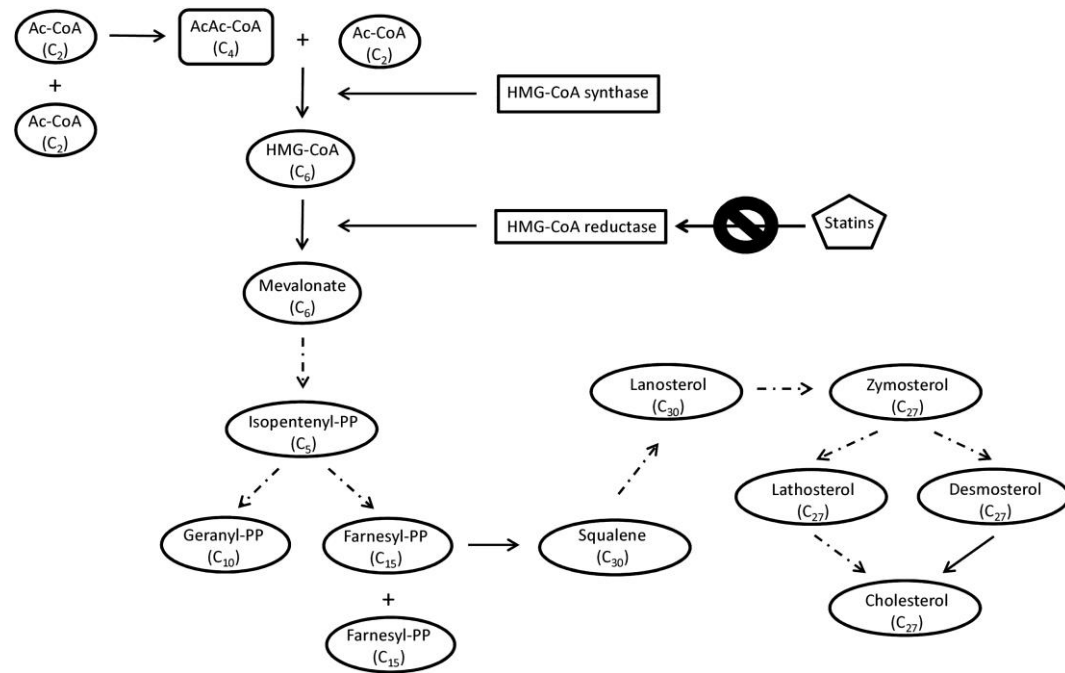


Figura 1. Via da biossíntese do colesterol

Reprodução com a permissão do autor AK Groen (van der Wulp *et al.*, 2013)

Seta contínua: passo direto. Setas tracejadas: o produto é formado via etapas intermediárias.

Legenda: Ac-CoA/Acetil-coenzima A (Acetil-CoA); AcAc-CoA/Acetoacetil-CoA; Cholesterol/Colesterol; Desmosterol/Desmosterol; Farnesyl-PP/Farnesil pirofosfato (Farnesil-PP); Geranyl-PP/Geranyl pirofosfato (Geranyl-PP); HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA); HMG-CoA reductase/HMG-CoA reductase; HMG-CoA synthase/HMG-CoA sintase; Isopentenyl-PP/Isopentenil pirofosfato (Isopentenil-PP); Lanosterol/Lanosterol; Lathosterol/Latosterol; Mevalonate/Mevalonato; Squalene/Esqualeno; Statins/Estatinas; Zymosterol/Zimosterol.

Na secção do esqualeno, duas unidades de Ac-CoA (2C) sofrem condensação, formando acetoacetil-CoA (4C), a qual por junção de uma terceira unidade de Ac-CoA (2C) é transformada em 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) (6C) por ação da HMG-CoA sintase (ou transferase). A molécula de HMG-CoA é convertida em mevalonato (6C) pela enzima HMG-CoA reductase (uma glicoproteína membranar do retículo endoplasmático; principal enzima limitante da síntese de colesterol, sujeita a um mecanismo de retroalimentação). A etapa seguinte é a formação de unidades isoprenóides (bases estruturais do esqueleto esteróide do colesterol), cuja base é o isopentenil pirofosfato (isopentenil-PP) (5C), a partir do mevalonato, por perda de dióxido de carbono (CO₂). Geranyl-pirofosfato (geranyl-PP) (10C) e farnesil-pirofosfato (farnesil-PP) (15C) são formados a partir do isopentenil-PP. A combinação de duas subunidades de farnesil-PP dá origem à formação de esqualeno (30C). Na secção do pós-esqualeno da via da biossíntese do colesterol, o esqualeno é convertido em lanosterol (30C), o qual após vários intermediários, tais como o zymosterol (27C), o desmosterol (27C) e o

latosterol (27C), vai dar origem ao colesterol (27C). Na Figura 2 ilustra-se a estrutura química da molécula do colesterol.

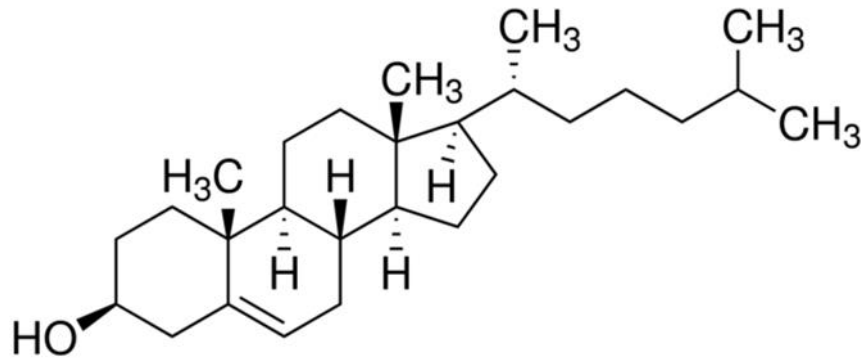


Figura 2. Estrutura química do colesterol

Embora a HMG-CoA redutase seja considerada a enzima limitante da biossíntese do colesterol, a monooxigenase do esqualeno, enzima que cataliza o primeiro passo de oxigenação foi apontada por Gill *et al.* (2011) como interveniente num possível segundo ponto de controlo na síntese do colesterol, assim como outras enzimas que intervêm nos passos seguintes (Rozman e Monostory, 2010; Trapani *et al.*, 2011).

Relembrando, no que diz respeito à regulação da síntese do colesterol, o mecanismo envolve o fator de transcrição SREBP-2, que para ter ação ativadora tem de ser primeiramente ativado por proteólise, a qual é realizada pela proteína SCAP que é sensível ao nível de colesterol das membranas celulares. A clivagem proteolítica e a consequente ativação do SREBP-2 estão aumentadas quando os níveis de colesterol baixam nas células. Quando os níveis de colesterol celular estão aumentados, este processo hidrolítico não acontece e não ocorre a ativação da transcrição dos genes codificadores da HMG-CoA sintase, da HMG-CoA redutase e dos LDLR.

O SREBP-2 é assim um componente de um mecanismo homeostático que promove a síntese de colesterol e a captação celular de colesterol plasmático quando este baixa nas células. Ao provocar o aumento da atividade dos LDLR, a diminuição do colesterol nas células faz baixar a concentração de LDL no plasma (van der Wulp *et al.*, 2013).

Algumas hormonas também têm efeitos na síntese do colesterol: as hormonas tiroideias, por exemplo, estimulam simultaneamente a síntese de colesterol (por via da indução do gene da HMG-CoA redutase) e a síntese de LDLR.

A importância da síntese do colesterol para a sobrevivência está ilustrada pelo facto de que defeitos na via metabólica da biossíntese são geralmente letais (em ratos). A perda de função de enzimas colesterogénicas raramente tem sido descrita em humanos e deficiências destas enzimas levam a graves malformações e doença (Horvat *et al.*, 2011).

1.3.2.2 Absorção do colesterol

No que respeita a absorção do colesterol, o processo inicia-se com a digestão e a emulsificação das gorduras da dieta no estômago por ação enzimática. O produto resultante é transportado ao lúmen duodenal, onde é misturado com a bÍlis e o suco pancreático. No lúmen do intestino o colesterol proveniente da dieta é associado aos TG e PL em emulsões lipídicas, designadas por vesículas ou micelas mistas (DMM, *dietary mixed micelles*). Nas DMM coexiste também o colesterol sintetizado pelo fígado e lançado na bÍlis. Seguidamente, estas vesículas sofrem uma ação enzimática de lipases, quer na superfície quer no cerne, libertando o colesterol para poder ser absorvido ao nível das células da mucosa intestinal. O colesterol na forma esterificada representa cerca de 20% do colesterol consumido diariamente. No lúmen, os EC são hidrolisados pela enzima pancreática colesterol-esterase, pois só na forma livre, o colesterol pode ser absorvido pelos enterócitos, as células da mucosa intestinal do duodeno e no jejuno proximal (Trautwein *et al.*, 2003). Segundo Ikeda *et al.* (2002), esta enzima promove a absorção do colesterol mediando uma alteração na estrutura das micelas através da hidrólise efetiva dos PL e consequente libertação do colesterol.

A absorção do colesterol ocorre nos enterócitos, sendo este então proveniente de diversas fontes, incluindo a via exógena (dieta), a via endógena (síntese) e a captação da circulação.

Em indivíduos que consomem uma dieta típica ocidental, cerca de 300-500 mg de colesterol exógeno chega diariamente ao lúmen intestinal, enquanto a contribuição do colesterol de origem biliar foi estimada em aproximadamente 800-1200 mg/dia. Em indivíduos saudáveis normalmente aproximadamente 30-60% do colesterol intestinal é absorvido. O restante é excretado sob a forma de produtos de degradação bacteriana, principalmente coprostanol e colestanol (Sudhop *et al.*, 2002a).

Adicionalmente ao colesterol, uma dieta típica ocidental contém também esteróis vegetais (PS) (aproximadamente 95% de fitoesteróis e 5% de fitoestanois), compostos de estrutura química similar à do colesterol, e que inibem a absorção deste, por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos (e que serão apresentados adiante no sub-capítulo intitulado “Mecanismos de ação hipocolesterolemiantes dos fitoesteróis”).

1.3.2.3 Recetores, transportadores, enzimas e lipoproteínas envolvidas no metabolismo do colesterol ao nível do enterócito

A absorção intestinal do colesterol requer a sua emulsificação, hidrólise (do colesterol esterificado da dieta/exógeno), solubilização micelar e captação pelos enterócitos. O colesterol de origem biliar não é esterificado, enquanto o colesterol de origem exógena está parcialmente esterificado, pelo que os EC têm então de ser hidrolisados antes de poderem ser transportados para os enterócitos.

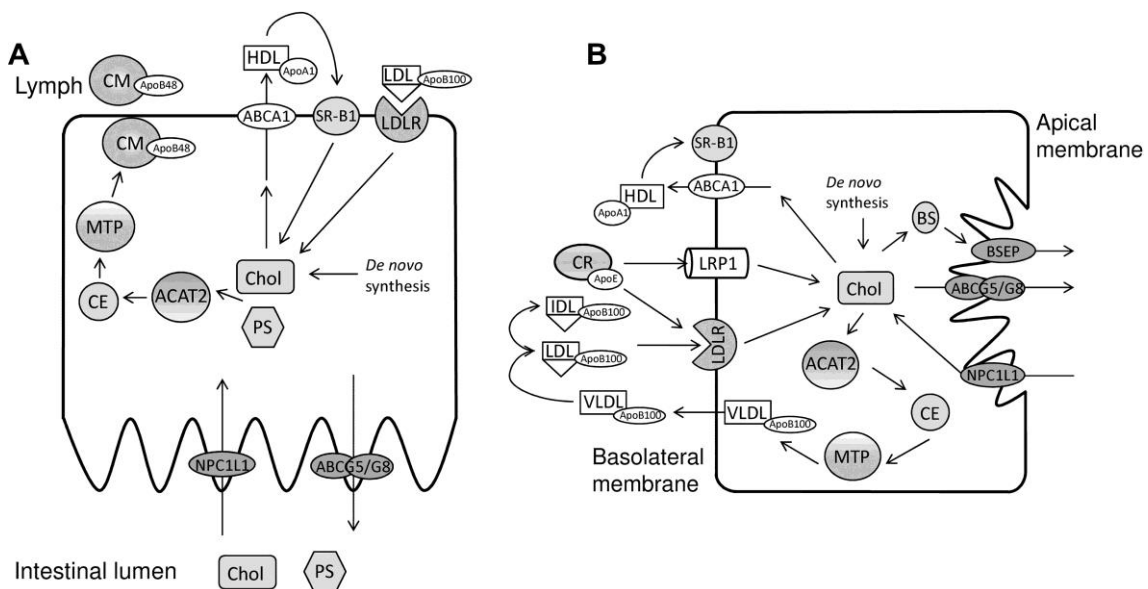


Figura 3. Transportadores do colesterol, lipoproteínas e enzimas envolvidas
 Reprodução com a permissão do autor AK Groen (van der Wulp *et al.*, 2013)

Legenda: ABCA1, ATP-binding cassette A1; ABCG5/G8, ATP-binding cassette G5/G8; ACAT2, Acil CoA-colesterol aciltransferase; Apical membrane/Membrana apical; ApoA1, Apoproteína A1; ApoB48, Apoproteína B48; ApoB100, Apoproteína B100; Basolateral membrane/Membrana basolateral; BS, Bile salts/Sais biliares; BSEP, Bile salt export pump/Bomba de transporte de sais biliares; CE, Cholesterol esters/Ésteres de colesterol; Chol/Colesterol; CM, Chylomicron/Quilomicra; CR, Chylomicron remnants/Remanescentes de quilomicra; *De novo synthesis*/Síntese *de novo*; HDL, High-density lipoprotein/Lipoproteína de alta densidade; IDL, Intermediate-density lipoprotein/Lipoproteína de densidade intermédia; Intestinal lumen/Lumen intestinal; LDL, Low-density lipoprotein/Lipoproteína de baixa densidade; LDLR, LDL receptor/Recetor da LDL; Lymph/Linfa; LRP1, LDL receptor-related protein 1/Proteína 1 relacionada ao recetor da LDL; MTP, Microsomal transfer protein/Proteína de transferência microssomal; NPC1L1, Nieman-Pick C1 Like1; PS, Plant sterols/Fitoesteróis; VLDL, Very low-density lipoprotein/Lipoproteína de muito baixa densidade.

O transporte do colesterol (e de PS) do lúmen intestinal para o enterócito é facilitado pelo transportador Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1), localizado na membrana apical dos

enterócitos, no intestino proximal e jejuno (Davis *et al.*, 2008; Davis e Altmann, 2009) (Figura 3A). Altmann *et al.* (2004) e Davis *et al.* (2004) verificaram em estudos em ratos *null NPC1L1*, 70% e 90% de redução da absorção do colesterol e de PS respectivamente, em comparação com os controles.

O transportador NPC1L1 encontra-se co-localizado na membrana apical do enterócito com o conjunto de semi-transportadores do tipo *ATP binding cassette* (ABC) G5/G8 (ABCG5 e ABCG8), que promovem o efluxo de colesterol (e de PS não esterificados) de volta para o lúmen, assim como facilitam a secreção de colesterol de origem biliar (Berge *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002). O colesterol intracelular que não é exportado através do heterodímero ABCG5/G8 é alvo de esterificação pela enzima acil CoA: colesterol aciltransferase (ACAT2) no retículo endoplasmático. Os EC são incorporados em Qm, juntando-se aos TG, PL e apoB48 para serem lançados na corrente linfática. Este processo é facilitado nos enterócitos pela proteína microsomal de transferência de triglicerídeos (MTP, *microsomal triglyceride transfer protein*), a qual também facilita a formação de VLDL nos hepatócitos, após a esterificação do colesterol pela ACAT2. Após distribuição na corrente linfática, os Qm entram na circulação através do ducto torácico. Os TG, incorporados em Qm, são hidrolisados pela lipoproteína lipase (LPL) localizada nas células endoteliais capilares, levando à formação de remanescentes de Qm, que são depois capturados da circulação ao nível do fígado, juntamente com o colesterol.

Alternativamente, o colesterol pode ser transferido para partículas HDL por via do transportador ATP-binding cassette A1 (ABCA1) (Brunham *et al.*, 2006).

A captação seletiva do colesterol (de diferentes origens) pode ser mediada por recetores *scavenger* classe B tipo 1 (SR-B1) (recetores das HDL) e/ou LDLR (por reconhecimento da apoB100), na membrana basolateral do enterócito (Figura 3A).

1.3.2.4 Recetores, transportadores, enzimas e lipoproteínas envolvidas no metabolismo do colesterol ao nível do fígado

A síntese de colesterol pode ocorrer em qualquer célula nucleada, porém a produção maioritária tem origem hepática.

O fígado desempenha um papel importante na homeostasia do colesterol através da regulação das lipoproteínas, da síntese e da secreção do colesterol. O colesterol presente no fígado pode ter tido origem na dieta, mas também pode ter sido aí sintetizado (*síntese de novo*) ou resultar da captação endocítica das IDL e LDL ou da captação do colesterol das HDL.

No hepatócito (Figura 3B), a enzima ACAT2 esterifica o colesterol, sendo os EC incorporados em partículas VLDL juntamente com outros produtos derivados dos remanescentes de Qm,

sob ação da MTP, por ligação da apoB100. O fígado lança (a nível basolateral) as partículas VLDL (e também as HDL por via do transportador ABCA1) para a circulação para permitir a distribuição de lípidos aos tecidos periféricos. A *clearance* das VLDL é em parte feita pelos LDLR, enquanto o resto é transformado em IDL e LDL, que ainda contêm apoB100, necessária para a re-captção pelo hepatócito via LDLR. Ao nível apical o efluxo do colesterol do hepatócito para a bÍlis processa-se quer diretamente na forma de colesterol livre, através do heterodímero ABCG5/ABCG8 quer pela conversão em sais biliares, que são exportados através de uma bomba de transporte de sais biliares designada BSEP (*bile salt export pump*).

A captação do colesterol (LDL e VLDL) é facilitada primeiramente pelos LDLR na membrana basolateral; também ocorre captação das HDL através dos recetores SR-B1 e pelo reconhecimento da apoE de remanescentes de Qm pela proteína 1 relacionada com o LDLR (LRP1). Na membrana apical o transportador hepático NPC1L1 pode facilitar a recaptção do colesterol de origem biliar (Figura 3B).

1.3.2.5 Excreção do colesterol

O colesterol pode ser excretado do organismo sob a forma de esteróis neutros (colesterol e metabolitos resultantes da degradação bacteriana intestinal) ou SB, principalmente por via fecal.

O TRC tem sido considerado durante décadas, a única via de eliminação do colesterol. De um ponto de vista clássico, o TRC diz respeito ao fluxo do excesso de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado (mediado principalmente pelas HDL) e a subsequente exportação deste colesterol para a bÍlis (via hepatobiliar), que é transportada para o lúmen intestinal, para excreção por via fecal.

Na “via direta do transporte reverso do colesterol”, os EC incorporados nas HDL vão sendo captados no fígado, processo em que participa o SR-B1. Após verterem o colesterol no fígado, as HDL passam a ser pequenas partículas denominadas HDL pré- β (contêm apenas apoA1 e algumas moléculas de PL e de colesterol) (Figura 3B).

Na “via indireta do transporte reverso do colesterol” os EC das HDL são transferidos para as LDL, VLDL e Qm em troca por TG destas partículas (por ação da proteína de transferência de EC – CETP, *cholesteryl ester transfer protein*), os quais serão captados pelo fígado aquando da endocitose das LDL ou das VLDL e Qm remanescentes (via LDLR) (Figura 3B).

Brufau *et al.* (2011) defendem que a eliminação fecal do colesterol pode não ocorrer maioritariamente pela via hepatobiliar clássica (TRC), mas através de uma via alternativa designada Excreção Trans-Intestinal do Colesterol (TICE, *Trans Intestinal Cholesterol Excretion*).

Foi evidenciado em modelos animais (ratos) (em dieta estável de colesterol) com inativação dos transportadores ABCG5/G8 e sobreexpressão do NPC1L1, que não houve alteração da taxa de excreção de esteróis neutros, o que permitiu sugerir que o colesterol podia ser excretado diretamente da circulação sanguínea para as fezes, via mucosa intestinal (Tang *et al.*, 2009; van der Veen *et al.*, 2009).

A constatação da existência da TICE, em ratos, deriva de estudos de quantificação *in vivo* do fluxo do colesterol do plasma e da bÍlis para as fezes, através da marcação diferenciada do colesterol com isótopos estáveis para seguir a sua distribuição ao longo do tempo, no sangue, bÍlis e fezes, tendo sido estimada a sua contribuição em cerca de 1/3 da excreção fecal (van der Veen *et al.*, 2009).

Embora a evidência existente sugira que a TICE possa estar presente em humanos, no momento, não é possível afirmar que a TICE ocorre num indivíduo saudável e se pode ser estimulada por via farmacológica ou dietética.

Mais ainda, os estudos de Temel *et al.* (2010) (em ratos com desvio biliar agudo, nos quais, colesterol marcado injetado por via intraperitoneal, transportado em macrófagos, chegou ao lúmen intestinal) contribuiram para a evidência de que a TICE pode ser quantitativamente mais importante do que a secreção hepatobiliar do colesterol, na eliminação do colesterol por via fecal, e nesse sentido, segundo os referidos autores, a estimulação da TICE em humanos poderá vir a representar uma nova abordagem hipocolesterolemiantes.

Contudo, é certo que existe a necessidade de prosseguir a investigação neste domínio, pois até à data, desconhece-se como é feita a mediação do transporte do colesterol na TICE, *i.e.* se é facilitado por proteínas transportadoras, mediado por lipoproteínas ou se em alternativa ocorre um aumento do aporte do colesterol em eritrócitos, ao lúmen intestinal.

1.4 QUANTIFICAÇÃO DO METABOLISMO DO COLESTEROL

1.4.1 Métodos de quantificação da síntese do colesterol

A síntese de colesterol contribui substancialmente mais para os reservatórios de colesterol circulante do que a via da absorção. A síntese de colesterol exibe uma periodicidade diária, mantendo os níveis de colesterol durante o jejum (Santosa *et al.*, 2007). Tendo em mente a homeostasia do colesterol, torna-se assim relevante a necessidade da quantificação da via da síntese no campo da investigação do metabolismo do colesterol.

Os métodos disponíveis para quantificar a síntese do colesterol *in vivo* baseiam-se no balanço 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 medição de precursores do colesterol (no plasma ou soro). Mackay e Jones (2011) desenvolveram um estudo de revisão em que sumariaram todos os métodos disponíveis para o estudo do mecanismo de síntese (e de absorção) do colesterol em humanos, destacando as forças e as fraquezas de cada método, assim como a sua aplicabilidade em diferentes tipos de ensaios. Segue-se uma breve descrição de cada método.

1.4.1.1 Balanço do colesterol

O método baseado no balanço do colesterol pode ser usado quando estão respeitados os critérios de um estado metabólico estável, tais como níveis constantes de colesterol plasmático e de excreção fecal de colesterol, durante um período de composição corporal constante. Nestas condições, a síntese de colesterol pode ser estimada como a diferença entre a excreção de colesterol (excreção fecal de esteróis neutros e de AB) e a ingestão exógena de colesterol (dieta). A ingestão de colesterol através da dieta pode ser quantificada e as fezes podem ser recolhidas durante o período experimental. O fluxo fecal pode ainda ser monitorizado através da administração oral de um marcador como o óxido crômico (Cr_2O_3) para garantir que as fezes recolhidas dizem respeito ao período de estudo. Os esteróis neutros e os AB fecais são quantificados habitualmente por cromatografia gasosa-detector de ionização de chama (CG-FID, *gas chromatography-flame ionization detector*) ou cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS, *gas chromatography-mass spectrometry*), permitindo estimar a síntese do colesterol relativamente a um determinado período de tempo. Embora este método seja o “*gold standard*”, não é isento de erros na estimativa quer da excreção fecal quer da ingestão de colesterol da dieta.

O método do balanço do colesterol permite determinar a massa de colesterol sintetizada durante um dado período de tempo, em condições metabólicas estáveis, porém não se adequa à realização de ensaios de grande escala (Mackay e Jones, 2011).

1.4.1.2 Conversão fracional do esqualeno

A taxa de síntese diária de colesterol também pode ser estimada a partir da conversão do mevalonato (marcado radioisotopicamente) em esqualeno, por infusão intravenosa de [^{14}C]-mevalonato. Após o mevalonato marcado ter atingido o valor máximo de enriquecimento no reservatório plasmático de esqualeno, estima-se a síntese de colesterol por medição da síntese de esqualeno. Neste método assume-se assim que a síntese de esqualeno é equivalente à síntese de colesterol, o que poderá nem sempre corresponder à verdade.

Em termos de vantagens, a execução do protocolo deste método demora apenas cerca de uma hora, podendo ser repetido cada três semanas; porém, implica a administração intravenosa de radioisótopos (Mackay e Jones, 2011).

1.4.1.3 Incorporação de deutério

O método DI implica o consumo de água enriquecida com deutério (D_2O) para determinar a taxa de síntese de colesterol livre, tendo em conta que a D_2O vai entrar em equilíbrio com o restante conteúdo total em água e com o fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NADPH). Assim pode efetuar-se a determinação do enriquecimento em deutério da água circulante no plasma (representativa do reservatório precursor) e do enriquecimento em deutério do colesterol, quer no plasma quer na membrana dos glóbulos vermelhos, por espectrometria de massa. Se num período de 24 horas, nenhum átomo de deutério for incorporado em precursores do reservatório citosólico de Ac-CoA e se o H do NADPH for oriundo unicamente de fontes não marcadas, apenas 7 átomos de deutério seriam encontrados em cada nova molécula de colesterol sintetizada (a razão de incorporação teórica mínima de deutério seria de 7/27 carbonos). Alternativamente se a molécula de NADPH entrar em equilíbrio total com a água enriquecida, nesse caso, a razão de incorporação de deutério/C seria de 22/27C. Teoricamente torna-se difícil prever exatamente quantos átomos de deutério seriam incorporados em cada molécula de colesterol. Também não está definida a razão H/C para todos os órgãos, dificultando assim a quantificação da taxa absoluta de síntese do colesterol (van der Wulp *et al.*, 2013).

1.4.1.4 Análise da distribuição de massa isotopomérica

Com o método MIDA, o enriquecimento do reservatório da unidade precursora, a síntese fracional e a síntese absoluta do colesterol (total) são calculados com base no padrão de enriquecimento por excesso, da massa de isotopómeros de colesterol presente no plasma, após administração de moléculas de acetato marcadas com ^{13}C . A distribuição das abundâncias isotopoméricas em novas moléculas de colesterol, medida por GC-MS, permite calcular a abundância do precursor. Conhecido o nível de enriquecimento em termos do reservatório da unidade precursora podem calcular-se as taxas de síntese de colesterol, fracional e absoluta. Di Buono *et al.* (2000) demonstraram a obtenção de resultados equivalentes pelos métodos DI e MIDA, na estimativa da taxa de síntese do colesterol (fracional e absoluta), medida ao longo de 24 horas.

Neese *et al.* (1993) e Jones *et al.* (1996) evidenciaram que a taxa de síntese do colesterol medida quer pelo método DI quer pelo MIDA era comparável àquela determinada pelo método clássico do balanço do colesterol.

Van der Wulp *et al.* (2013) efetuaram uma revisão de todos os estudos em que foram utilizados os métodos DI e MIDA para a quantificação da síntese do colesterol (colesterol sintetizado *de novo* total e por órgão). Concluíram que o trato gastrointestinal contribui com cerca de 15-35% para a síntese total de colesterol em animais experimentais (as taxas mais baixas de síntese local de colesterol, em ratos, foram observadas nas glândulas supra-renais, baço, pulmões e rins), correspondendo nos humanos, o contributo do fígado, a cerca de 10% da taxa de síntese total de colesterol.

1.4.1.5 Quantificação de precursores da síntese do colesterol

A determinação da concentração sérica de intermediários da via da biossíntese do colesterol constitui outra abordagem para quantificar a síntese do colesterol. O mevalonato, o esqualeno, o lanosterol, o desmosterol e o latosterol são exemplos desses precursores que têm sido usados como marcadores relativos da eficiência da síntese do colesterol. Os níveis séricos destes precursores correlacionam-se fortemente com a estimativa da síntese do colesterol quando são normalizados para o nível de colesterol sérico, sendo assim expressos comumente em mmol/mol de colesterol (Nissinen *et al.*, 2008).

Os níveis séricos destes precursores flutuam em função dos padrões de síntese do colesterol, sofrem influência do ritmo circadiano, assim como em condições em que a síntese do colesterol está aumentada ou diminuída (Santosa *et al.*, 2007).

A quantificação sérica destes precursores do colesterol é habitualmente realizada por GC-FID, GC-MS ou cromatografia líquida de alta pressão (HPLC, *high pressure liquid chromatography*), remetendo-se a sua descrição adiante para o capítulo intitulado “Métodos combinados de quantificação da absorção e da síntese do colesterol”.

A determinação de precursores da síntese do colesterol requer apenas a colheita de uma amostra de sangue, pelo que se revelam ideais para a determinação da síntese do colesterol em estudos epidemiológicos. Na revisão desenvolvida por Mackay e Jones (2011), este método foi o único a ser apontado para poder ser usado na determinação da síntese do colesterol em estudos de grande escala/escala populacional.

1.4.2 Métodos de quantificação da absorção do colesterol

Mathan e Lichtenstein (2004) fizeram a revisão dos principais métodos existentes para a medição da absorção absoluta do colesterol, destacando as vantagens, as limitações técnicas e de interpretação, bem como a aplicabilidade em estudos a diferentes escalas. Todas as revisões anteriores tinham focado apenas os métodos baseados em radioisótopos ou aqueles adequados ao uso em modelos animais.

Mais recentemente, Mackay e Jones (2011) atualizaram a referida revisão de 2004, adicionando os métodos disponíveis para a determinação da síntese do colesterol, tal como atrás referido.

Assim, os métodos disponíveis para medir a absorção do colesterol dividem-se em métodos diretos (perfusão intestinal) e indiretos (balanço do colesterol, utilização de radioisótopos ou de isótopos estáveis, níveis séricos de PS exógenos).

1.4.2.1 Perfusão intestinal

Os métodos diretos para determinar a absorção do colesterol medem o fluxo do colesterol do intestino à linfa. São classificados como métodos diretos porque é medida diretamente a quantidade de colesterol absorvida (os níveis fecais ou plasmáticos) através de uma secção do intestino.

O único método direto disponível, a perfusão intestinal, foi introduzido por Grundy e Mok (1977) e baseia-se na infusão, no duodeno, de uma fórmula líquida contendo uma quantidade conhecida de colesterol e de β -sitosterol. A análise do aspirado intestinal permite estimar a absorção absoluta do colesterol (por hora) ao longo de um segmento do intestino de 100 cm. A diferenciação entre colesterol exógeno e endógeno pode fazer-se pela infusão de colesterol marcado.

Porém, no intestino, o colesterol é transformado por ação de bactérias noutros produtos e essa perda não é tida em conta neste método, constituindo uma limitação. Deve destacar-se, contudo, como maior limitação, o facto de se tratar de um método bastante invasivo (necessidade de intubação e de exposição a radiação), não obstante, serem apenas os métodos diretos aqueles que permitem obter medidas absolutas da absorção do colesterol (total, exógeno ou endógeno) ao nível do intestino (Mackay e Jones, 2011).

1.4.2.2 Balanço do colesterol

Os métodos baseados no balanço do colesterol permitem quantificar a absorção do colesterol pela diferença entre a ingestão de esteróis da dieta e a eliminação de colesterol por via fecal,

excluindo o colesterol de origem endógena. A técnica baseia-se na administração de colesterol marcado com radioisótopos para permitir distinguir o colesterol endógeno do exógeno, nos reservatórios de colesterol fecal e plasmático.

Mackay e Jones (2011) reviram e detalharam quer a técnica quer o processo de cálculo necessário à aplicação deste método para a quantificação da absorção do colesterol.

1.4.2.3 Razão de radioisótopos

Os métodos baseados na razão de radioisótopos permitem calcular a percentagem, mas não um valor absoluto, de absorção do colesterol. À semelhança do método do balanço do colesterol é necessário registar a ingestão diária de colesterol para poder estimar o colesterol exógeno consumido.

Dividem-se basicamente em três tipos: a razão fecal (*faecal isotope ratio method*), a razão plasmática (*plasma isotope ratio method*) e a administração contínua de radioisótopos (*continuous isotope feeding method*).

No método da razão fecal de radioisótopos (colesterol e β -sitosterol marcados com radioisótopos), a absorção do colesterol é calculada como a percentagem da dose oral de colesterol marcado com radioisótopos não recuperada nas fezes.

O método da razão plasmática de radioisótopos implica a administração simultânea por via oral e intravenosa de colesterol marcado com [^{14}C] e [^3H] e a colheita de uma única amostra de sangue 3 a 4 dias depois. A absorção do colesterol é calculada com base na razão entre a percentagem do marcador oral e do marcador intravenoso. Este método apresenta vantagens relativamente ao anterior, nomeadamente: a) a colheita de uma única amostra de sangue; b) uma baixa dose de radioisótopos; c) a não necessidade de recolha de fezes; d) a não necessidade de uso de marcadores (como o β -sitosterol) para corrigir as perdas fecais.

No terceiro método, na administração contínua de radioisótopos, são administrados [^{14}C]-colesterol e [^3H]- β -sitosterol, três vezes ao dia, ao longo de dez dias, recolhidas as fezes do 4^o ao 10^o dia (a partir do 3^o dia a razão de isótopos torna-se constante), sendo calculada a média da absorção do colesterol com base na diferença entre a razão de colesterol marcado fecal e exógeno e a razão para o β -sitosterol.

Os 3 métodos anteriormente descritos para a quantificação da absorção do colesterol foram introduzidos essencialmente nos anos 70 e 80 (século XX). Posteriormente foi investigado por Lin *et al.* (2005) um quarto método, a radioactividade específica do colesterol plasmático. Estes autores calcularam a radioactividade específica do colesterol no plasma, por colheita de uma amostra de sangue às 24 horas e às 48 horas após a administração de uma refeição-teste

contendo colesterol marcado com radioisótopos, a indivíduos com a síndrome de Smith-Lemli-Opitz (uma patologia do foro da síntese do colesterol).

Na opinião de Mackay e Jones (2011) resta, porém, ainda, validar a robustez da relação entre a radioactividade específica do colesterol plasmático e a absorção do colesterol, especialmente em indivíduos saudáveis.

1.4.2.4 Isótopos estáveis

Não obstante o avanço na investigação da absorção do colesterol conseguido com os radioisótopos, o advento das técnicas laboratoriais com recurso a isótopos estáveis veio permitir progredir ainda mais, porque diminuiu as dificuldades logísticas relacionadas com o armazenamento, manuseamento, destino final e segurança em geral associadas aos radioisótopos (Pouteau *et al.*, 2003). Dessa forma veio a tornar-se possível a investigação da absorção do colesterol em populações específicas que até aí tinham estado excluídas, por razões éticas, tais como as crianças, as grávidas e lactantes (Mackay e Jones, 2011).

Vários autores quantificaram a absorção do colesterol usando isótopos estáveis em versões optimizadas dos métodos com radioisótopos (maioritariamente por adaptação do método da razão plasmática de radioisótopos e do método da administração contínua de radioisótopos). Foram usados o colesterol e o sitostanol (este último como marcador da perdas fecais de colesterol, por ser menos absorvido que o β -sitosterol) marcados com isótopos estáveis tal como o [^2H], tendo sido demonstrada uma cinética idêntica à de métodos com radioisótopos, sem o risco associado à exposição à radioactividade (Mackay e Jones, 2011).

Jones *et al.* (2000) foram os primeiros autores a usar a espectrometria de massa da razão isotópica (IRMS, *isotope ratio mass spectrometry*) para a determinação da absorção do colesterol através do enriquecimento isotópico, com o método da razão plasmática de isótopos (adaptado do método da razão plasmática de radioisótopos). Posteriormente foi acoplada a pirólise por cromatografia gasosa à IRMS (GC/P/IRMS) que muito veio contribuir para a precisão do método na determinação da absorção do colesterol (Gremaud *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004).

1.4.2.5 Quantificação sérica de fitoesteróis

Para a quantificação da absorção do colesterol resta falar da quantificação dos níveis séricos dos esteróis vegetais exógenos (não colesterolémicos), vulgarmente designados por fitoesteróis (PS), apesar de incluírem esteróis (campesterol, β -sitosterol, estigmasterol,

fucosterol, entre outros) e estanoís (análogos saturados dos fitoesteróis, como por exemplo o campestanol e o sitostanol) vegetais (Figura 4).

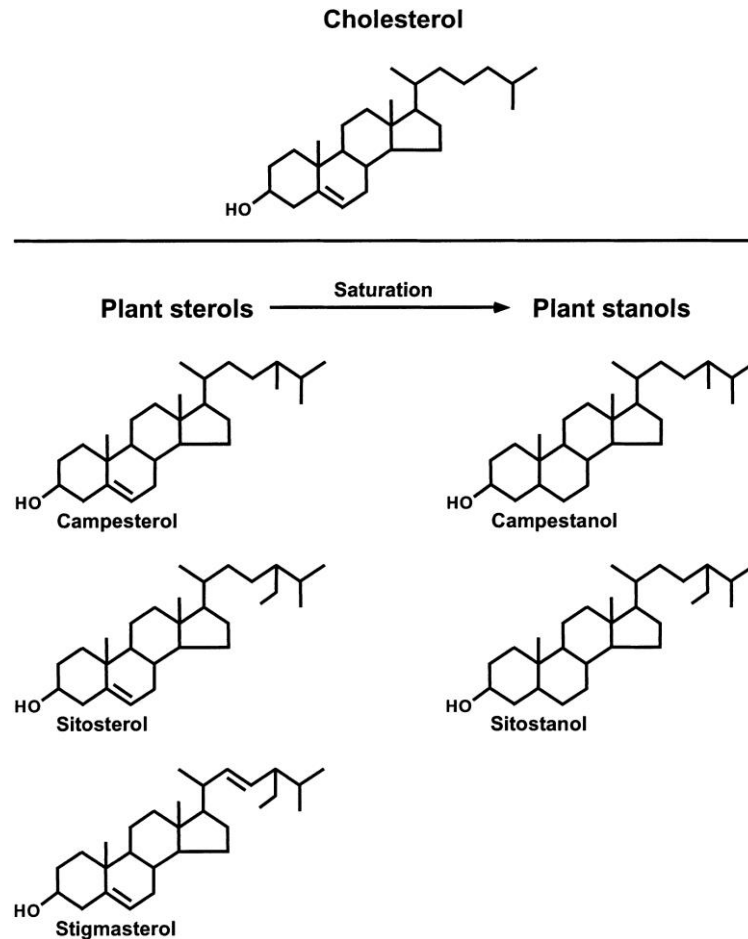


Figura 4. Estrutura química dos esteróis e estanoís vegetais
(Kerckhoffs *et al.*, 2002)

Legenda: Cholesterol/Colesterol; Campestanol/Campestanol; Campesterol/Campesterol; Plant stanols/Estanoís vegetais; Plant sterols/Esteróis vegetais; Saturation/Saturação; Sitostanol/Sitostanol; Sitosterol/Sitosterol; Stigmasterol/Estigmasterol

Os níveis séricos de fitoesteróis e de fitoestanoís tipicamente ascendem até 30 $\mu\text{mol/L}$ e 0,3 $\mu\text{mol/L}$ respetivamente (Gylling e Miettinen, 2010).

Tilvis e Miettinen propuseram pela primeira vez, em 1986, a determinação dos níveis séricos do campesterol e do β -sitosterol, ou ainda do colestanol, um derivado do colesterol, como medida de quantificação da absorção do colesterol. Demonstraram que existia uma correlação positiva entre os níveis séricos de campesterol (normalizados para o valor de colesterol sérico

total) e a absorção do colesterol, por comparação com o método da administração contínua de isótopos (anteriormente descrito).

Em determinadas circunstâncias, os PS não devem ser usados como marcadores da absorção do colesterol, como por exemplo em estudos de intervenção com a toma de PS, pois nessa situação os níveis de PS refletem não só a absorção de colesterol mas também o consumo dos PS (Vanstone e Jones, 2004; Miettinen *et al.*, 2011; Mackay e Jones, 2012). Durante a toma de PS, o colestanol pode ser usado como um marcador da absorção do colesterol, dado que não faz parte da composição dos alimentos suplementados com PS. Miettinen *et al.* (1989) apontaram que apesar do colestanol derivar da síntese de AB e algum poder advir do consumo de carne vermelha, existe uma correlação significativa entre os níveis de colestanol sérico e a absorção intestinal do colesterol.

Correntemente, os níveis séricos dos PS são reportados como um rácio em função do colesterol total para normalizar as diferenças causadas por diferentes níveis de lipoproteínas que transportam o colesterol e os esteróis não colesterolémicos (NCS, noncholesterol sterols). A quantificação sérica dos PS implica uma preparação prévia de extração lipídica da amostra de soro ou plasma, a que se segue a determinação dos níveis de PS e do colesterol, habitualmente por GC-FID, GC-MS ou HPLC.

Nissinen *et al.* (2008) mostraram existir uma correlação mais forte entre a razão β -sitosterol/colesterol total e a absorção do colesterol do que no caso da razão do campesterol/colesterol.

A razão entre um PS e o colesterol total tem vindo a ser subsequentemente utilizada em vários estudos como marcador da absorção do colesterol. Alguma variabilidade tem sido apontada no que toca aos níveis séricos de PS em diferentes populações, porém maioritariamente atribuída ao método utilizado na determinação (Chan *et al.*, 2006).

A determinação dos níveis séricos de PS da dieta como marcadores relativos da eficiência da absorção do colesterol caracteriza-se por uma relativa simplicidade e rapidez, para além de ser a única abordagem aplicável a estudos de larga escala, comparativamente aos métodos anteriormente referidos (Mackay e Jones, 2011).

1.4.3 Métodos combinados de quantificação da absorção e da síntese do colesterol

A absorção e a síntese do colesterol contribuem para a manutenção da homeostasia do colesterol. Vários fatores, fisiológicos e terapêuticos, afetam o metabolismo do colesterol e uma alteração num dos vetores, a absorção ou a síntese, tem revelado uma alteração compensatória e oposta no outro (Santosa *et al.*, 2007). Torna-se portanto indispensável o desenvolvimento de metodologias analíticas combinadas que permitam a quantificação

simultânea da absorção e da síntese do colesterol, tendo em vista uma maior eficácia nas intervenções hipocolesterolemiantes.

É possível medir simultaneamente a absorção e a síntese do colesterol usando uma técnica tripla de isótopos estáveis que combina o método plasmático de isótopos com o método DI. Nesta técnica combinada é administrado colesterol marcado diferencialmente ($[^{18}\text{O}]$ ou $[^{13}\text{C}]$ -colesterol) por via intravenosa e por via oral, enquanto D_2O é administrada oralmente (Gremaud *et al.*, 2001; Gremaud *et al.*, 2002). Enquanto esta abordagem isotópica constitui uma medida absoluta do metabolismo do colesterol, a determinação sérica de NCS, como por exemplo a quantificação simultânea de precursores da síntese do colesterol, de fitoesteróis exógenos e de metabolitos do colesterol, tem vindo a ser usada como medida da eficiência relativa do metabolismo do colesterol (Kuksis, 2001).

Os NCS podem referir-se a todos os esteróis exceto o colesterol, porém, essa designação tem sido usada para incluir a) os precursores da biossíntese do colesterol (por exemplo o desmosterol e o latosterol) vistos como biomarcadores da síntese do colesterol; b) os fitoesteróis (campesterol, β -sitosterol, estigmasterol, fucosterol, entre outros) tidos como biomarcadores da absorção do colesterol; c) derivados do colesterol, como é o caso do colestanol (o qual deve preferencialmente ser utilizado no caso de intervenções com suplementação de PS).

A razão entre os marcadores da síntese e da absorção do colesterol pode ser utilizada como uma estimativa do metabolismo/homeostasia do colesterol.

Miettinen *et al.* (2011) numa revisão recente acautelaram que quando a escolha da metodologia de quantificação do metabolismo do colesterol recair sobre os NCS, devem ser medidos vários NCS e usadas também medidas absolutas sempre que possível. Contudo, comparativamente aos métodos absolutos de quantificação da síntese e da absorção do colesterol, a determinação dos NCS é muito mais simples, menos invasiva, menos onerosa, permite poupança de tempo e pode ser aplicada em ensaios clínicos de larga escala e em estudos epidemiológicos, o que tem aumentado o potencial de utilização destes marcadores do metabolismo do colesterol em diversas doenças e condições, quer em estudos genéticos quer na monitorização de intervenções hipocolesterolemiantes, dietéticas ou farmacológicas (Mackay e Jones, 2012; Mackay *et al.*, 2014).

1.4.3.1 Métodos analíticos de determinação de esteróis não colesterolémicos

Os métodos analíticos disponíveis e os respetivos avanços mais recentes para a quantificação dos NCS foram alvo de revisão por Andrade *et al.* (2013) (ver Anexo 3.1). Importa desde já destacar que não existe ainda um método analítico de referência para a quantificação dos NCS

em amostras biológicas (soro, plasma ou líquido amniótico são as matrizes mais utilizadas), embora estejam em curso ensaios interlaboratoriais (*round robin testing*) para ultrapassar esta questão, nos quais Portugal tem participado, representado pelo grupo de investigação no seio do qual foi desenvolvido o presente projeto de doutoramento.

Por outro lado tem sido detetada alguma variabilidade na apresentação dos níveis de NCS: alguns autores reportam os valores exatos/absolutos, enquanto outros reportam os valores normalizados relativamente ao colesterol total, pelo que se impõe a necessidade de harmonização a este nível. Neste último caso, do rácio para o colesterol, alguns investigadores utilizam o colesterol medido na mesma corrida cromatográfica que os NCS, enquanto outros utilizam o colesterol medido por métodos enzimáticos (por exemplo da determinação clínica da ficha lipídica). Na população em geral, as concentrações séricas dos NCS circulantes são cerca de 200-1000 vezes inferiores às do colesterol, razão pela qual alguns investigadores optaram pela utilização do valor do colesterol medido pelos métodos enzimáticos. Na maior parte dos estudos, os níveis de NCS são determinados por GC, no entanto, em métodos rápidos de separação cromatográfica, a grande quantidade de colesterol presente na amostra, pode exceder o limite máximo de deteção ou interferir com a separação de alguns NCS, e, deste modo, levar a alguma incerteza na quantificação de alguns esteróis.

Torna-se assim urgente a aposta na padronização das metodologias analíticas, essencial em análises clínicas de rotina com fins de diagnóstico (Mackay e Jones, 2012; Andrade *et al.*, 2013; Mackay *et al.*, 2014).

Na prática laboratorial, a determinação de NCS, sumariamente, envolve etapas de preparação e caracterização da amostra (extração lipídica; saponificação alcalina e/ou hidrólise ácida; extração dos componentes insaponificáveis; limpeza do extrato; derivatização dos esteróis), antes da quantificação final (técnicas de separação e deteção).

Os métodos analíticos para a determinação dos níveis séricos de NCS têm revelado alguma evolução, quer ao nível da preparação da amostra (pré-tratamento e derivatização), quer das técnicas de separação e deteção (Andrade *et al.*, 2013).

Na preparação da amostra, no que diz respeito à extração dos esteróis, a evolução técnica tem-se traduzido essencialmente por aspetos tais como a miniaturização da amostra, a automatização do método, a redução ou ausência do uso de solventes líquidos. Diversas técnicas de extração são utilizadas desde a clássica extração por solventes ou líquido-líquido, a extração e a microextração em fase sólida, a extração em fluido supercrítico, à extração com partículas magnéticas (magMIPs, *magnetic molecular imprinted polymers*).

No diagnóstico de defeitos metabólicos da biosíntese do colesterol tem-se verificado o recurso à análise direta de um “borrão” de sangue/plasma em papel (*blood spot*), sem necessidade de

preparação da amostra (Paglia *et al.*, 2010), o que oferece vantagens tais como a facilidade e a natureza menos invasiva da obtenção da amostra, bem como a redução do tempo de análise.

No que diz respeito à derivatização, um passo crítico na determinação dos esteróis por GC (para diminuir a polaridade do esteroide, aumentando assim a volatilidade e melhorando a definição do pico cromatográfico, a resolução e a sensibilidade), os agentes mais comumente utilizados têm sido o *N,O*-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) e as misturas *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida/trimetilclorosina (BSTFA:TMCS); *N*-metil-*N*-(tertbutildimetilsilil) trifluoroacetamida/iodeto de amónio (MTBSTFA:NH₄I); *N*-metil-*N*-(tertbutildimetilsilil) trifluoroacetamida-1,4-ditioeritritol-trimetiliodosilano (MSTFA:DTE:TMIS). Saraiva *et al.* (2011) compararam estas misturas e concluíram que a mistura MSTFA:DTE:TMIS é a mais eficiente em termos de especificidade/sensibilidade.

Quanto à determinação/quantificação dos esteróis propriamente dita, as técnicas cromatográficas (GC e LC) têm sido as mais populares, embora haja que referir que apenas foi feita a validação do método por GC-FID (Phillips *et al.*, 1999), GC-MS (García-Llatas *et al.*, 2012) e GC-MS em modo seletivo de monitorização de iões [(GC-MS (SIM))] (Ahmida *et al.*, 2006; Saraiva *et al.*, 2011).

A LC, em geral, tem sido alvo de grande evolução com a introdução de técnicas de ionização e dessorção, o que poderá vir a contribuir para avanços na determinação dos NCS (Andrade *et al.*, 2013).

Em conclusão, a determinação dos NCS constitui uma ferramenta valiosa que oferece o potencial de estudar o metabolismo do colesterol, através de uma única amostra de sangue e de instrumentação de uso relativamente simples. Porém, a variabilidade/falta de harmonização nos métodos usados tem dificultado a definição de um método de referência, essencial em análises de rotina.

1.5 TERAPÊUTICA HIPOCOLESTEROLEMIANTE

Na abordagem terapêutica do doente dislipidémico, a dieta e mudanças individualizadas no estilo de vida (procura e manutenção de uma composição corporal ideal, exercício físico aeróbico regular, combate ao tabagismo e promoção do equilíbrio físico-emocional) nem sempre são medidas suficientes para proporcionar a normalização do perfil lipídico. Caso, após a instituição progressiva destas medidas não haja correção das alterações lipídicas, o tratamento farmacológico encontra-se indicado.

1.5.1 Abordagem não farmacológica

1.5.1.1 Estilos de vida

Na sociedade atual, a alimentação desregrada e o sedentarismo resultam em agressão oxidativa e a maior ingestão de alimentos lipídicos acarreta consequências nos níveis dos lípidos séricos, sobretudo de partículas LDL oxidadas que são extremamente aterogênicas e pró-inflamatórias, condicionando o processo ateromatoso e a lesão endotelial, logo, risco de acidentes ou eventos vasculares trombóticos/isquêmicos.

A DCV aterosclerótica está fortemente associada aos estilos de vida, especialmente ao tabagismo, dieta pouco saudável, inatividade física e stresse psicossocial. Mais de 75% da mortalidade associada à DCV poderia ser evitada com mudanças adequadas nos estilos de vida (Organização Mundial de Saúde, 2002).

Os estilos de vida saudáveis (adesão a uma dieta saudável, prática regular de exercício físico, evitação do tabagismo e manutenção de uma composição corporal adequada) continuam a ser um componente chave da promoção da saúde e da redução do risco cardiovascular (RCV), tal como vem descrito no mais recente documento orientador "*2013 American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA) Guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults*" (Stone *et al.*, 2014). Em consonância, o grupo de trabalho dedicado aos estilos de vida (LSWgroup, Lifestyle Work group) da ACC/AHA desenvolveu *guidelines* relativas à gestão dos estilos de vida com o objetivo de reduzir o RCV, tendo por base a evidência científica existente da mais elevada qualidade, tais como ensaios clínicos randomizados (RCTs, randomized clinical trials), meta-análises, revisões sistemáticas de estudos em adultos, e ainda estudos observacionais sujeitos a avaliação de qualidade (Eckel *et al.*, 2013).

Especificamente, o objetivo geral do LSWgroup foi avaliar com base na evidência existente, o papel que o padrão de dieta e o nível e tipo de atividade física podem desempenhar na prevenção e tratamento da DCV, através da ação sobre fatores de risco modificáveis, tais como a pressão arterial e os lípidos. A evidência científica e as recomendações emanadas nestas *guidelines* podem igualmente ser usadas, se aplicável, na gestão da hipercolesterolemia e da hipertensão (Eckel *et al.*, 2013). O LSWgroup efetuou uma avaliação do impacte do padrão de dieta e da composição em macronutrientes sobre os níveis plasmáticos de c-LDL, c-HDL e TG e sobre a pressão sistólica e diastólica, estabelecendo como pressupostos, um mês como período mínimo numa intervenção RCT, em qualquer localização geográfica e numa qualquer infraestrutura de investigação científica.

Destacam-se assim seguidamente as recomendações sobre estilos de vida saudáveis surgidas da revisão sistemática desenvolvida pelo LSWgroup, em termos de abordagem dietética (baseada no elevado nível de evidência existente) e de atividade física (baseada no nível moderado de evidência existente), com vista à redução dos lípidos e da pressão arterial (aplicáveis a adultos com idade inferior a 80 anos com ou sem DCV) (Eckel *et al.*, 2013):

Recomendações para a adoção de estilos de vida saudáveis

Dieta

O Adopção de um padrão de dieta que privilegie o consumo de vegetais, frutos e cereais integrais; a inclusão de laticínios com baixo teor de gordura, carne branca (aves), peixe, legumes, óleos vegetais (não tropicais) e sementes oleaginosas; a limitação do consumo de produtos alimentares doces, de bebidas açucaradas e de carnes vermelhas;

- Adesão a um padrão de dieta com um aporte calórico reduzido proveniente de gordura saturada e de gordura *trans* (em que apenas 5% a 6% das calorias seja proveniente de gordura saturada);
- Aconselhamento para a redução da ingestão de sal (sódio) face aos benefícios em termos de redução da pressão arterial;

O Adaptação deste padrão de dieta a necessidades calóricas específicas, às preferências individuais e culturais e a terapias nutricionais para outras condições de saúde (incluindo a diabetes mellitus);

O Implementação deste padrão de dieta seguindo planos dietéticos como por exemplo a dieta DASH (DASH, Dietary Approaches to Stop Hypertension), a dieta USDA (USDA, United States Department of Agriculture), a dieta da AHA (American Heart Association) ou a dieta mediterrânica.

Atividade física

O Adesão à prática de exercício físico de intensidade moderada por 150 minutos/semana, ou 75 minutos/semana de intensidade vigorosa-atividade aeróbica intensa, ou uma combinação de ambas. A atividade aeróbica deve ser realizada em períodos de pelo menos 10 minutos, preferencialmente distribuídos ao longo da semana.

Manutenção de composição corporal

Adicionalmente é recomendada a manutenção da composição corporal (adequada ao sexo e idade).

A adoção de estilos de vida saudáveis conduzirá à manutenção ou à modulação da composição corporal através da redução da deposição de gordura central, intervisceral, altamente prejudicial do ponto de vista metabólico ou de lesão endotelial por conter adipócitos ativos produtores de hormonas e fatores proinflamatórios.

Pressupostos

A redução da ingestão de gordura saturada diminui o c-LDL e c-HDL e dado que o efeito é mais significativo sobre o c-LDL do que o c-HDL, o menor consumo de gordura saturada é benéfico em termos do perfil lipídico. No entanto, esse benefício é ainda maior quando a gordura saturada é substituída por ácidos gordos polinsaturados, ou por ácidos gordos monoinsaturados, ou ainda hidratos de carbono (sendo preferível a substituição da gordura saturada por cereais integrais em vez de açúcares refinados).

Relativamente aos ácidos gordos polinsaturados, há que destacar os ómega-3 e os ómega-6, mas principalmente o balanço entre ambos, revelando-se este um importante determinante de saúde ao influenciar a expressão génica, a homeostasia, bem como o desenvolvimento normal. Uma razão ómega-6/ómega-3 alta (15/1 a 16,7/1), tal como é encontrada hoje em dia em muitas dietas ocidentais, promove a patogénese de várias condições crónicas, incluindo DCV, diabetes, cancro, obesidade, doenças auto-imunes, asma e depressão, as quais estão associadas a um aumento de produção de marcadores pró-inflamatórios, tais como o tromboxano A₂, leucotrieno B₄, interleucina-1β, interleucina-6, factor de necrose tumoral e proteína C-reativa, enquanto níveis superiores de ómega-3 (uma razão baixa ómega-6/ómega-3) parecem exercer efeitos supressores (Simopoulos, 2006).

A redução da ingestão de gordura *trans* também leva à diminuição do c-LDL, sem efeito ou com pouco efeito sobre o c-HDL ou os TG. A adesão à recomendação da redução do consumo de fontes de gordura saturada (carne e laticínios) resultará numa redução adicional da ingestão de gordura *trans*.

No que diz respeito ao sal (sódio) existe evidência clínica de que a redução do seu consumo se traduz numa diminuição da pressão arterial independentemente da variação de peso corporal. Estudos observacionais sugerem que a redução do consumo de sal (sódio) está associada a um menor risco de eventos cardiovasculares em indivíduos com ou sem hipertensão, devendo-se essa condição à diminuição da pressão arterial.

Relativamente à associação entre níveis de atividade física e menor taxa de DCV (e de outras doenças crónicas como a diabetes mellitus tipo 2), existe evidência científica substancial de que se trata de uma relação dose-dependente. Os mecanismos propostos para a referida associação passam por efeitos benéficos ao nível dos lípidos, das lipoproteínas, da pressão

arterial e da diabetes mellitus, para além da importância da perda e manutenção de peso corporal, para a prevenção e controlo dos fatores de RCV (Eckel *et al.*, 2013).

Existem outras intervenções de interesse, quer ao nível da dieta quer da atividade física, que não foram abordadas pelo LSWgroup neste documento orientador, devido a limitações de tempo e de recursos, nomeadamente, o cálcio, o magnésio, o álcool, o treino cardio-respiratório, a combinação das intervenções sobre os estilos de vida com a farmacoterapia, e o tabaco. Dada a sua importância como fatores de RCV e porque são focados neste trabalho de investigação, serão ainda enquadrados neste capítulo o tabaco e o álcool.

Tabaco

Outros autores dedicaram-se ao estudo da associação entre o tabaco e o risco aumentado de todos os tipos de DCV. Segundo as estimativas do SCORE (*Systematic Coronary Risk Evaluation*), o RCV a 10 anos de eventos fatais duplica em fumadores, sendo proporcionalmente maior o risco em mulheres do que em homens (Mucha *et al.*, 2006).

Embora ainda não estejam totalmente esclarecidos os mecanismos associados ao tabagismo e o aumento do risco da doença aterosclerótica, estes apontam para um efeito sobre a função endotelial, envolvendo processos oxidativos, a função plaquetária, fibrinólise, inflamação e modificação de lípidos e da função vasomotora. As espécies reativas de oxigénio (radicais livres) presentes no fumo inalado causam a oxidação do c-LDL e por sua vez a forma oxidada despoleta um processo inflamatório na túnica íntima das artérias através da estimulação da adesão dos monócitos à parede dos vasos, potenciando a aterosclerose (Rahman e Laher, 2007).

Álcool

Quanto ao consumo de álcool, este apresenta-se como um fator de RCV com um carácter dual, benéfico ou nocivo, sobre a aterosclerose. O consumo leve a moderado de álcool é geralmente tido como cardioprotetor em termos da redução do risco de DCV, particularmente na doença coronária e no enfarte isquémico. Acredita-se existir um efeito favorável no caso do vinho tinto, devido à composição em polifenóis e em especial em resveratrol. Cho *et al.* (2008) demonstraram em estudos *in vivo* (em animais) que o resveratrol reduz a síntese de colesterol através da inibição da atividade da HMG-CoA redutase (similar à inibição pela atorvastatina) e da atenuação da expressão do mRNA, minimizando a progressão aterosclerótica.

Por outro lado, o consumo excessivo de álcool incrementa o risco de DCV (Corrao *et al.*, 2004). De acordo com Briasoulis *et al.* (2012), o metabolismo aumentado de utilização da glucose e

efeitos anti-inflamatórios são mediadores potenciais do efeito cardioprotetor do consumo moderado de álcool, enquanto a pressão arterial elevada, níveis elevados de TG e hiperglicemia são tidos como responsáveis pelo RCV aumentado em grandes consumidores de álcool.

As *guidelines* europeias sobre prevenção cardiovascular indicam que os consumidores devem limitar o consumo de bebidas alcoólicas a um máximo de um copo/dia para as mulheres (10 g de álcool) ou dois copos/dia (20 g de álcool) para os homens, para assim garantir o nível mais baixo de risco de doença crónica (Perk *et al.*, 2012).

Ao concluir este sub-capítulo dedicado aos estilos de vida saudáveis, não poderíamos deixar de referir o padrão de vida mediterrânico, um estilo de vida que promove a saúde e bem-estar dos indivíduos e populações e não apenas um padrão de dieta/modelo nutricional (a dieta mediterrânica), pois combina ingredientes da agricultura local, receitas e formas de cozinhar próprias de cada lugar, refeições partilhadas e tradições (modelo cultural), que, juntamente com o exercício físico moderado diariamente, traduzem um modelo multidisciplinar de vida saudável.

A dieta mediterrânica, a qual representa, atualmente, o paradigma da alimentação saudável (considerada pela UNESCO como Património Imaterial da Humanidade para alguns países, aos quais Portugal se associou em 2013), consiste num consumo abundante de produtos de origem vegetal (cereais, arroz, hortaliças, legumes, fruta fresca e frutos oleaginosos); utilização do azeite como principal fonte de gordura; consumo moderado de peixe, carne branca, lacticínios, ovos; pequenas quantidades de carne vermelha e vinho com moderação, às refeições.

A dieta mediterrânica tem sido associada a efeitos benéficos sobre fatores de RCV tais como os níveis de lipoproteínas, a vasodilatação endotelial, a resistência insulínica, a prevalência da síndrome metabólica, a capacidade antioxidativa, a incidência de enfarte agudo do miocárdio e a mortalidade cardiovascular.

As conclusões de dois grandes estudos europeus de seguimento da coorte grega EPIC (Trichopoulou *et al.*, 2003; Dilis *et al.*, 2012) e da coorte HALE (Knoops *et al.*, 2004), assim como de dois outros grandes estudos americanos, o *NIH-AARP Diet and Health* (Mitrou *et al.*, 2007) e um estudo de *follow-up* da coorte do *Nurse Health Study* (Fung *et al.*, 2009) evidenciam a associação entre a adesão ao padrão de dieta mediterrânica e a redução da mortalidade devida à doença coronária cardíaca e mortalidade por todas as causas.

Shai *et al.* (2008) no estudo de intervenção DIRECT (*Dietary Intervention Randomized Controlled Trial*) demonstraram que a dieta mediterrânica é mais eficaz na promoção da

manutenção da composição corporal adequada e na redução do rácio lipídico aterogénico CT/c-HDL (em indivíduos obesos) do que uma dieta de baixo teor de gordura.

Tem assim sido demonstrada uma associação inversa entre a adesão ao padrão de dieta mediterrânica e a mortalidade por causa cardiovascular ou por outras causas, embora limitada no que respeita os eventos cardiovasculares não fatais (Fung *et al.*, 2009; Sofi *et al.*, 2010; Hoevenaar-Blom *et al.*, 2012).

O estudo PREDIMED (PREvención con Dieta MEDiterránea), um ensaio clínico randomizado de prevenção primária veio evidenciar a associação entre a adesão a uma dieta de padrão mediterrânico (enriquecida com azeite extra-virgem ou com frutos oleaginosos) e a redução da mortalidade cardiovascular, bem como em eventos não fatais (enfarte do miocárdio ou AVC não fatais), em comparação com uma dieta com baixo teor de gordura, complementada por uma melhoria do perfil lipídico, redução da pressão arterial e dos níveis de glucose em jejum, e por diminuição dos marcadores de inflamação (embora neste último caso sem significado estatístico) (Estruch *et al.*, 2013).

Martinez-Gonzalez e Bes-Rastrollo (2014) reviram os resultados da última meta-análise existente desenvolvida por Sofi *et al.* (2010) e incluíram sete novos estudos observacionais publicados *a posteriori*; após remover da meta-análise os estudos que apenas incluíam os eventos cardiovasculares fatais, os autores observaram não apenas uma associação inversa mais forte entre a adesão à dieta mediterrânica e a incidência de DCV, mas também ausência de heterogeneidade.

Também existe evidência considerável, não apenas em países da bacia mediterrânica, mas igualmente em outros países, que a adoção de um padrão de dieta mediterrânica está associada a maior longevidade, para além de adiar o início da deterioração da saúde.

A medicina moderna tem tido sucesso ao adicionar anos de vida à população, mas não tem de igual modo conseguido adiar o surgimento de doenças crónicas. Existe evidência epidemiológica de que a prevalência de uma doença crónica constitui um fator de risco significativo para a incidência de múltiplas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento. Multimorbidade, fragilidade e mortalidade nos idosos estão associadas a marcadores de inflamação crónica sistémica (Collerton *et al.*, 2012; Fontana *et al.*, 2013). Os resultados do estudo de Jurk *et al.* (2014) apontam no sentido de que uma intervenção anti-inflamatória de longo termo (farmacológica ou de modificação dos estilos de vida) em idosos com doenças degenerativas associadas à idade poderia ter um potencial de “anti-envelhecimento”, podendo apontar-se o padrão de dieta mediterrânica por favorecer a expectativa de vida.

1.5.1.2 Alimentos suplementados com fitoesteróis

Não obstante a recomendação da adesão a uma dieta saudável e à prática regular de exercício físico tendo em vista a redução do RCV, podem ainda ser introduzidas outras terapêuticas dietéticas hipocolesterolemiantes adjuvantes tais como a toma de PS, concomitantemente às referidas intervenções nos estilos de vida.

Nas últimas duas décadas, mais de 200 ensaios clínicos e numerosas meta-análises corroboraram a eficácia, benefício e segurança do consumo de PS como terapêutica hipocolesterolemiantes, a qual pode traduzir-se por uma redução da concentração do c-LDL até 0,30 mmol/L ou 10 –12% (AbuMweis *et al.*, 2008; Demonty *et al.*, 2009).

Na dieta podemos encontrar os PS sobretudo nos óleos vegetais, cereais e sementes oleaginosas, mas as dietas omnívora e vegetariana apenas fornecem, em média, cerca de 250 mg e 500 mg de PS/dia, respetivamente (Law, 2000). Porém, para alcançar uma redução significativa em termos clínicos dos níveis de c-LDL é necessária uma dose de 2 g/dia, o que se tornou possível graças ao consumo de alimentos enriquecidos ou suplementados com PS, ou à toma de suplementos de PS. Dado que a esterificação com ácidos gordos potencia a liposolubilidade dos PS, passou a ser cada vez mais frequente a incorporação de PS esterificados em matrizes alimentares com um teor considerável de gordura, como a margarina, o iogurte, os molhos/temperos de saladas, o queijo, a maionese, o leite, o chocolate, os produtos de padaria/pastelaria e os produtos cárneos, a que se seguiram ainda outros exemplos, tais como as barras de cereais e os sumos (AbuMweis *et al.*, 2008).

Numa meta-análise, AbuMweis *et al.* (2008) demonstraram que em comparação com outras matrizes enriquecidas com PS, a margarina, o iogurte, o tempero para salada e o leite, quando suplementados com PS, permitem uma maior redução dos níveis de c-LDL. Os mesmos autores observaram ainda que os valores mínimo (-0,25 mmol/L) e máximo (-0,42 mmol/L) de redução da concentração de c-LDL são obtidos com a ingestão de <1,5 g/dia e >2,5 g/dia PS respetivamente, sendo a relação entre a dose de PS e as concentrações séricas de colesterol uma relação não linear dose-dependente. Katan *et al.* (2003), Demonty *et al.* (2009) e Musa-Veloso *et al.* (2011) mostraram que a ação hipocolesterolemiantes dos PS atinge o efeito “plateau” com a ingestão de doses de PS ≥ 2 g/dia até 3 g/dia. Consequentemente a dose de 2 g/dia de PS foi reconhecida pelas autoridades competentes na matéria (NCEP, *National Cholesterol Education Program*, Programa Nacional de Educação do Colesterol; AHA; Sociedade Internacional de Aterosclerose), como sendo a dose indicada para garantir uma redução significativa do ponto de vista clínico, do nível circulante de c-LDL (AbuMweis e Jones, 2008).

Já no que diz respeito à frequência de consumo, múltiplas doses diárias de PS facilitam uma maior redução do c-LDL, do que uma única toma diária. No entanto, com base na evidência decorrente de uma meta-análise, Demonty *et al.* (2009) concluíram ser recomendável o consumo de produtos suplementados com PS em pelo menos duas tomas diárias.

Para além dos alimentos/produtos alimentares enriquecidos com PS, os PS também podem ser consumidos sob a forma de suplementos, em cápsulas ou comprimidos, com a mesma eficácia. Recentemente, em ensaios clínicos, Myrie *et al.* (2012) e Shaghghi *et al.* (2013) demonstraram que cápsulas ou comprimidos de PS na dose de 0,8-3,0 g/dia durante 4-12 semanas contribuem para uma redução de 0,30 mmol/L da concentração de c-LDL, equivalente a valores obtidos com alimentos enriquecidos com PS.

Diversos RCTs permitiram concluir que apesar da dose de 2 g/dia de PS ser bem tolerada sem efeitos secundários significativos, a redução dos níveis circulantes de c-LDL é alcançada à custa de uma elevação dos níveis séricos de PS (Perk *et al.*, 2012). Não obstante o impacto positivo na redução do RCV, surgiram preocupações de que os PS pudessem ser aterogénicos (Baumgartner *et al.*, 2011; Plat *et al.*, 2012), nomeadamente por duas razões: 1) o facto de os indivíduos portadores de sitosterolemia, uma doença hereditária autossómica recessiva na qual as concentrações séricas de PS estão cerca de 50-100 vezes mais elevadas, poderem vir a desenvolver DCV prematuramente e de forma grave; 2) a associação reportada nalguns estudos populacionais entre concentrações séricas elevadas de PS e DCV. A esse respeito, Genser *et al.* (2012) conduziram a primeira revisão sistemática com meta-análise para investigar se existia associação entre as concentrações séricas de PS (campesterol e sitosterol; quer a concentração absoluta quer a razão fitoesterol/colesterol total) e o risco de DCV, não tendo sido encontrada qualquer evidência dessa associação.

Em suma, foi demonstrado em animais e em humanos o efeito hipocolesterolemizante dos PS e não obstante os aspectos relacionados com a segurança, as orientações existentes para a gestão do colesterol emanadas pelos organismos internacionais competentes na matéria (NCEP-ATP III, 2001; Reiner *et al.*, 2011; Perk *et al.*, 2012) têm encorajado o consumo de PS como uma opção terapêutica dietética para diminuir o c-LDL. Contudo, há que referir que no documento orientador mais recentemente publicado, as *guidelines* de 2013 da ACC/AHA, não é dado ênfase ao consumo de PS devido ao facto de não existirem estudos com *endpoints* clínicos identificados para os PS, ésteres de fitoesteróis (PSE), estanois ou ésteres de estanois (Stone *et al.*, 2014).

Em geral, o desenvolvimento de RCTs para avaliar o efeito de alimentos ou de componentes alimentares na morbidade e mortalidade cardiovascular não são praticáveis devido ao elevado custo e fraca adesão. Assim, alternativamente, para o estudo de tais associações, têm

sido realizados estudos de coorte observacionais de grande dimensão, incluindo uma avaliação adequada do ponto de vista nutricional e dietético (Hu, 2011). Porém, ainda não foi feita a avaliação do efeito hipocolesterolemiantes a longo termo dos PS, nem avaliação de prova científica (*hard endpoints*) associada com morbimortalidade cardiovascular. Face a esta falta de evidência, até à data, a associação entre a redução dos níveis circulantes de c-LDL e um menor risco de mortalidade cardiovascular permanece meramente especulativa (AbuMweis *et al.*, 2014).

1.5.1.2.1 Mecanismos de ação hipocolesterolemiantes dos fitoesteróis

O principal mecanismo responsável pela ação hipocolesterolemiantes dos PS (e PSE) é a inibição da absorção intestinal do colesterol. Os PS são metabolizados de maneira similar ao colesterol. As possíveis etapas ao longo das quais pode ocorrer a inibição da absorção do colesterol pelos PS são as seguintes: 1) Solubilização micelar; 2) Co-cristalização do colesterol e PS das micelas; 3) Inibição de lipases, esterases e outras enzimas envolvidas no processo absorptivo; 4) Efeitos sobre o tráfico intracelular nos enterócitos (Trautwein *et al.*, 2003).

Trautwein *et al.* (2003) reviram os potenciais mecanismos envolvidos ao nível gastroduodenal, tais como a competição dos PS com o colesterol pela solubilização nas DMM e a co-cristalização com formação de cristais mistos insolúveis. Como qualquer agregado de natureza anfifílica, as DMM exibem uma capacidade limitada de solubilização de moléculas lipofílicas. Assim sendo, a introdução dos PS na composição da dieta traduz-se por uma competição dinâmica pela solubilização, e os estudos, quer *in vitro* quer *in vivo*, têm evidenciado que os PS restringem a solubilização micelar do colesterol. Os PS, moléculas hidrofóbicas, exibem uma maior afinidade pelas DMM e daí resulta a substituição do colesterol, energeticamente favorável. No que se refere ao segundo possível mecanismo, Mel'nikov *et al.* (2004) defenderam ser improvável que a formação de cristais mistos (co-cristalização) afetasse significativamente a absorção intestinal do colesterol *in vivo*, devido à relativamente elevada solubilidade do colesterol e PS em produtos da lipólise das gorduras.

Dado que existe evidência de que os PS tomam o lugar do colesterol nas DMM durante a digestão, nalguns estudos tem sido avaliada a possibilidade de os PS poderem causar a diminuição da absorção de vitaminas lipossolúveis (Richelle *et al.*, 2004). Não obstante o facto de que até 9 g/dia de PS não se verifica a modulação dos níveis circulantes (ajustados ao colesterol) de vitaminas lipossolúveis (Raeini-Sarjaz *et al.*, 2002; Mensik *et al.*, 2002), outros estudos demonstraram o efeito contrário (Hendriks *et al.*, 2003; Gylling *et al.*, 2010). Contudo,

não deve haver motivo de preocupação se apesar de ocorrer uma diminuição dos níveis circulantes de vitaminas lipossolúveis, estes níveis permanecerem dentro das concentrações normais. Noakes *et al.* (2002) mostraram que um ligeiro aumento no consumo diário de frutos e vegetais ricos em carotenóides (1-2 porções/dia ou 125-250 mL/dia) poderá mitigar quaisquer efeitos nos níveis de carotenóides circulantes, causados pela ingestão de doses terapêuticas de PS.

Ainda relativamente aos mecanismos de inibição da absorção do colesterol, outros estudos permitiram sugerir que os PS podem exercer uma ação molecular no interior dos enterócitos e hepatócitos, reforçando a ideia de que o deslocamento do colesterol das DMM poderá não ser o único mecanismo de diminuição da absorção do colesterol induzido pelos PS. Trautwein *et al.* (2003) apontaram a interferência dos PS com o processo de hidrólise do colesterol por lipases e esterases, no local da absorção, levando à diminuição das concentrações séricas de colesterol. No lúmen, antes de serem absorvidos pelos enterócitos, os EC (cerca de 20% do colesterol consumido na dieta) têm de ser hidrolisados para a forma livre pela colesterol-esterase. Esta enzima pancreática promove, assim, a absorção do colesterol, ao mediar uma alteração estrutural nas micelas, resultante da hidrólise dos PL e da libertação consequente do colesterol (Ikeda *et al.*, 2002). Os PSE podem agir como substratos desta enzima devido à sua grande semelhança estrutural com os EC. Os PSE podem bloquear a enzima e diminuir a sua atividade, uma explicação no entanto pouco provável, pois a quantidade de EC na dieta é muito baixa, ou, por outro lado, devido à rápida hidrólise dos PSE, os PS podem substituir o colesterol nas micelas, causando a acumulação do colesterol e dos EC na fase óleo da emulsão (Nissinen *et al.*, 2002).

Mais ainda, outros mecanismos emergentes foram também apontados ao nível do tráfego intracelular do colesterol, no transporte do colesterol do lúmen intestinal para a corrente linfática. Este processo pode ser dividido em 3 etapas que contribuem para a redução da absorção do colesterol: 1) passagem através do epitélio nas células da mucosa intestinal, por competição entre PS e colesterol ao nível dos transportadores membranares; 2) re-esterificação nas células da mucosa, por via da inibição da atividade da enzima ACAT, e 3) interferência com a montagem dos Qm, antes da exportação para a linfa (Trautwein *et al.*, 2003; Rozner e Garti, 2006; Calpe-Bardiel *et al.*, 2009) (Figura 5).

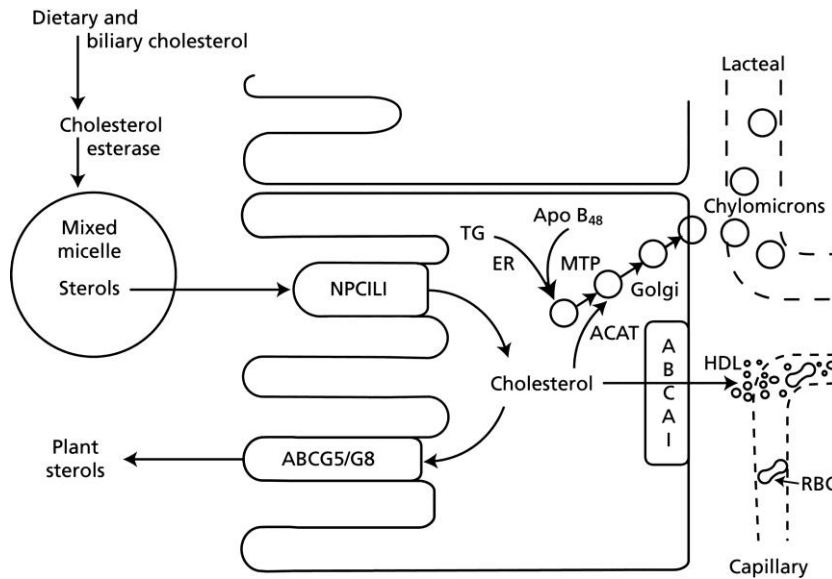


Figura 5. Mecanismos de ação dos fitoesteróis
(Charlton-Menys e Durrington, 2008)

Legenda: ABCA1, ATP-binding cassette A1; ABCG5/G8, ATP-binding cassette G5/G8; ACAT, Acil CoA:colesterol acil transferase; ApoB48, Apoproteína B48; Capillary/Capilar; Cholesterol/Colesterol; Cholesterol esterase/Colesterol esterase; Chylomicrons/Quilomicra; Dietary and biliary cholesterol/Colesterol da dieta e biliar; ER, Endoplasmic reticulum/Retículo endoplasmático; Golgi, Complexo de Golgi; HDL, High-density lipoprotein/Lipoproteína de alta densidade; Lacteal/Lacteal; Mixed micelle/Micela mista; MTP, Microsomal triglyceride transfer protein/Proteína microssomal de transferência de triglicerídeos; NPC1L1, Niemann-Pick C1 Like 1; Plant sterols/Fitoesteróis; RBC, Red blood cells/Glóbulos vermelhos; Sterols/Esteróis; TG, Triglyceride/Triglicerídeos

Vejamos o primeiro destes mecanismos (Figura 5): o influxo intestinal do colesterol é regulado por transportadores membranares da família ABC, tais como os ABCG5 e ABCG8 que exportam esteróis dos enterócitos de volta para o lúmen e o ABCA1 que tem a função de transportar o excesso de esteróis dos tecidos, na primeira etapa do TRC, para o lúmen. Assim, um aumento da atividade do heterodímero ABCG5/G8 foi proposto como um possível mecanismo subjacente ao efeito hipocolesterolemizante dos PS. No entanto, pelo menos em ratos, estudos conclusivos em que foram utilizados ratos deficientes em ABCA1 e em ABCG5/G8, demonstraram que a inibição da absorção do colesterol mediada pelos PS é independente destes transportadores ABC (Plosch *et al.*, 2006; Calpe-Berdiel *et al.*, 2006; Calpe-Berdiel *et al.*, 2007).

Quanto a outros potenciais mecanismos, outros estudos levantaram hipóteses quanto à possível regulação pelos PS do metabolismo do colesterol ao nível intestinal e hepático, através de vias independentes do LXR. Vários autores propuseram uma ação dos PS sobre a esterificação do colesterol e sobre a montagem de lipoproteínas (ACAT; apoB); a internalização do colesterol (NPC1L1; anexina, ANXA2); a síntese do colesterol (HMG-CoA redutase; C-24

redutase) e ainda sobre a remoção de apoB100-lipoproteínas. Porém, o impacto *in vivo* da ingestão de PS sobre estes processos fisiológicos permanece por clarificar (Calpe-Berdiel *et al.*, 2009).

Em conclusão, os PS inibem a absorção do colesterol ao afetarem a sua solubilização no lúmen intestinal, interferindo com a difusão luminal do colesterol para o epitélio e/ou inibindo os mecanismos moleculares responsáveis pela captação do colesterol para o enterócito. Deste modo, o conteúdo em colesterol das Qm é reduzido, menos colesterol é transportado para o fígado nos Qm remanescentes, a atividade dos LDLR hepáticos está aumentada, reduzindo os níveis plasmáticos de c-LDL. A diminuição da produção hepática de VLDL e da conversão de VLDL em LDL também contribuem para o abaixamento dos níveis de c-LDL (Cohn *et al.*, 2010).

1.5.2 Abordagem farmacológica

O tratamento farmacológico das dislipidemias e em particular da hipercolesterolemia reveste-se de grande importância, não só pela possibilidade de regressão e/ou estabilização de placas ateroscleróticas, como também de diminuição da morbimortalidade com comprometimento aterosclerótico.

A inibição da síntese *de novo* do colesterol (cerca de 2/3 do total de colesterol) tem sido a principal estratégia terapêutica para a redução dos níveis de colesterol. Outras estratégias têm sido identificadas devido a grandes avanços no estudo da relação entre algumas das enzimas-chave, recetores e transportadores envolvidos na biossíntese e na transferência do colesterol e o desenvolvimento de fármacos para a regulação do metabolismo do colesterol. Por exemplo a descoberta do LDLR permitiu concluir que os níveis de colesterol circulante podiam ser reduzidos por estimulação da expressão do LDLR hepático em consequência da diminuição da concentração intracelular de colesterol. A primeira classe de fármacos que atua desta forma são as resinas sequestrantes de ácidos biliares, as quais ao interromperem a circulação entero-hepática dos SB, diminuem o colesterol intra-hepático que seria utilizado na formação dos SB. Por sua vez, o ezetimibe atua bloqueando seletivamente a absorção intestinal do colesterol, ao nível do transportador de esteróis NPC1L1, expresso a nível apical no enterócito e na interface (canalicular) hepatobiliar.

As estatinas, largamente prescritas para a prevenção da DCV, são metabolitos de fungos, capazes de inibir a HMG-CoA redutase, a enzima-chave limitante da síntese hepática do colesterol. Outras enzimas intervenientes na via da biossíntese do colesterol podem constituir-se como potenciais alvos da terapêutica hipocolesterolemizante (já disponíveis no mercado),

como por exemplo as enzimas envolvidas na via do mevalonato, tais como a mevalonato-cinase e a fosfomevalonato-cinase, seguidas da esqualeno-sintase, esqualeno-epoxidase, lanosterol-sintase e lanosterol 14 α -demetilase, e ainda as enzimas esterol delta-redutases, demetilases, isomerases e dessaturases. Alguns destes fármacos, tais como os inibidores da esqualeno-sintase, estão em fase clínica de investigação (Rozman e Monostory, 2010). Outras terapêuticas emergentes incluem os inibidores da CETP (uma enzima-chave do TRC envolvida na transferência dos EC da HDL para a LDL), da MTP (que interferem com a montagem das VLDL no fígado), dos oligonucleotídeos antisense apoB (inibem a síntese de apoB, componente essencial das lipoproteínas aterogênicas – VLDL, LDL, IDL e Lp(a)) e da pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) (que promove a degradação endossomal e lisossomal dos LDLR hepáticos) (Charlton-Menys e Durrington, 2008; Noto *et al.*, 2014).

Num estudo de revisão, Noto *et al.* (2014) avaliaram os dados clínicos e de segurança destes agentes emergentes para a redução do c-LDL. Todos os agentes referidos produzem reduções potentes da concentração de c-LDL e apoB, superiores às das estatinas e/ou outras terapêuticas hipolipemiantes, em indivíduos de alto risco com hipercolesterolemia e em doentes com hipercolesterolemia familiar. Contudo, estão ainda sob investigação, a eficácia a longo termo, tolerabilidade e impacte na redução de eventos cardiovasculares, em ensaios de larga escala.

Existem também outros fármacos hipolipemiantes que estão disponíveis comercialmente mas que não serão aqui abordados por terem uma ação preferencial sobre os TG (fibratos, niacina) e deste modo, serão enquadrados apenas os fármacos com ação predominante na hipercolesterolemia e relevantes face aos objetivos do estudo, nomeadamente as estatinas, quer em monoterapia quer em terapêutica combinada.

1.5.2.1 Estatinas

As estatinas são usadas em larga escala para reduzir os níveis aterogênicos de colesterol em indivíduos em risco de desenvolver DCV ou em alto risco. Existe evidência clínica de que a terapêutica com estatinas permite a redução de *endpoints* clínicos, tendo Preiss e Sattar (2009) demonstrado a redução de 12% na mortalidade de qualquer causa, de 19% por doença arterial coronária e de 23% por enfarte do miocárdio. De acordo com as mais recentes *guidelines* de tratamento do colesterol para a redução do RCV aterosclerótico (Stone *et al.*, 2014) são maioritariamente quatro os grupos de indivíduos que podem beneficiar do tratamento com estatinas, nos quais o potencial de redução do RCV aterosclerótico claramente excede o potencial de efeitos adversos, nomeadamente: 1) Indivíduos com

diagnóstico clínico de DCV aterosclerótica; 2) Indivíduos com c-LDL \geq 190 mg/dL; 3) Indivíduos entre 40 e 75 anos de idade com diabetes e c-LDL entre 70 e 189 mg/dL; 4) Indivíduos com diagnóstico clínico de DCV aterosclerótica ou diabetes, com idade entre 40 e 75 anos, c-LDL entre 70 e 189 mg/dL e um risco estimado a 10 anos de desenvolver DCV aterosclerótica igual a 7,5% ou superior.

As estatinas são indicadas para o tratamento da hipercolesterolemia comum, da hipercolesterolemia familiar (forma heterozigótica ou combinada familiar), da hiperlipidemia mista e das dislipidemias secundárias.

Do ponto de vista farmacológico, a inibição (parcial) competitiva da HMG-CoA redutase pelas estatinas reduz a conversão da HMG-CoA em mevalonato, a etapa limitante da biossíntese do colesterol. A redução a jusante dos intermediários metabólicos subsequentes traduz-se pelo aumento da expressão dos LDLR na superfície dos hepatócitos e da captação de c-LDL da circulação (Goldstein e Brown, 2009).

De entre as várias estatinas (Figura 6), a lovastatina e a sinvastatina inibem a HMG-CoA redutase somente após hidrólise no fígado e, por isso, são consideradas pró-fármacos; as restantes estatinas não necessitam daquela transformação sendo consideradas fármacos ativos. A absorção é intestinal, a metabolização processa-se no fígado e a excreção ocorre por via intestinal (a maior parte) e renal. Diferem em relação à percentagem de absorção, ao efeito da alimentação sobre a sua biodisponibilidade, à ligação com as proteínas plasmáticas, à extração hepática e à meia-vida plasmática (Vaughan e Gotto, 2004).

Todas as estatinas são metabolizadas no citocromo P 450 (CYP P 450) por diferentes sistemas enzimáticos: a atorvastatina, a lovastatina e a sinvastatina são substratos e inibidores da isoenzima CYP3A4, responsável pelo metabolismo de mais de 60% dos fármacos no fígado (Beaird, 2000; Neuvonen, 2006); a fluvastatina, maioritariamente do CYP2C9; enquanto a pravastatina, a rosuvastatina e a pitavastatina utilizam pouco o CYP P 450.

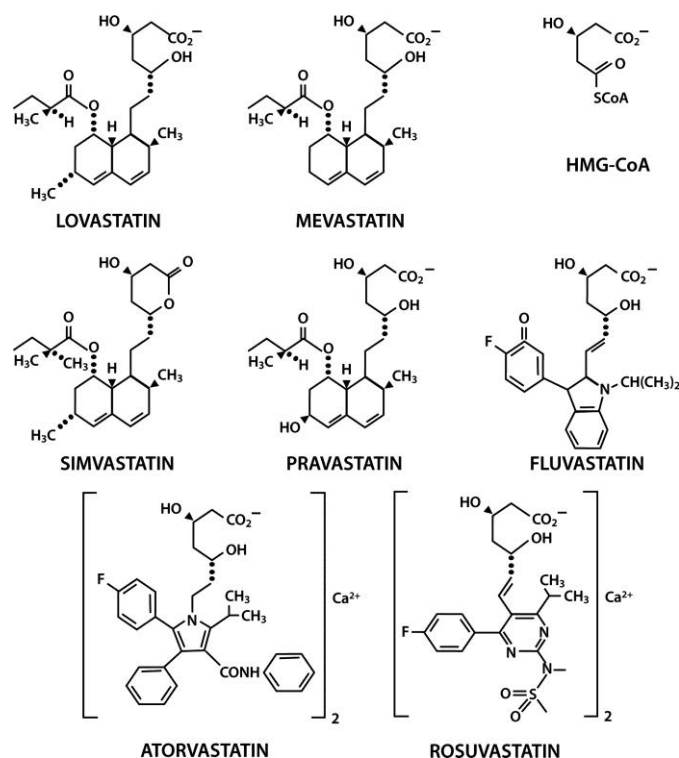


Figura 6. Estrutura química das estatinas, inibidores da HMG-CoA redutase

(Charlton-Menys e Durrington, 2008)

Legenda: Atorvastatin/Atorvastatina; Fluvastatin/Fluvastatina; HMG-CoA, 3-hidroxi-metilglutaril-Coenzima A; Lovastatin/Lovastatina; Mevastatin/Mevastatina; Pravastatin/Pravastatina; Rosuvastatin/Rosuvastatina; Simvastatin/Sinvastatina

O uso concomitante de outros fármacos que dependem dos mesmos sistemas enzimáticos, ou que são capazes de inibir a ação destes, pode causar elevação dos níveis séricos das estatinas, aumentando o risco de efeitos indesejáveis. Por outro lado, fármacos que aumentam a atividade enzimática podem levar ao abaixamento dos níveis circulantes das estatinas, reduzindo a sua eficácia (Bottorff e Hansten, 2000). Contudo, muitas das interações são difíceis de prever dado que quer a homeostasia do colesterol quer o metabolismo dos fármacos dependem não só do genótipo de cada indivíduo, como também do estado nutricional e fisiológico, ser normo ou hiperlipidémico e ainda do ritmo circadiano (Rozman e Monostory, 2011).

As estatinas, além de inibirem parcialmente a HMG-CoA redutase, reduzindo a síntese intracelular do colesterol, aumentam o número de LDLR, principalmente no fígado, levando assim a uma maior depuração e consequente diminuição dos seus níveis plasmáticos. Adicionalmente interferem na secreção das VLDL, IDL e apo B, o que também contribui para a redução de c-LDL circulante. Induzem um aumento discreto de c-HDL, possivelmente por

diminuir a atividade da CETP e por potencializar a síntese de apo A1. Não estimulam a remoção dos Qm e praticamente não têm efeito sobre os níveis plasmáticos da Lp (a) (Genest *et al.*, 2005).

Paralelamente à ação no perfil lipídico, as estatinas possuem efeitos pleiotrópicos (embora variáveis e não comuns a todas as estatinas), tais como: 1) aumento da atividade da óxido nítrico (NO) sintase e inibição da endotelina, com melhoria da função endotelial; 2) efeito antioxidante sobre a LDL e a HDL; 3) efeito anti-inflamatório traduzindo-se por uma diminuição dos valores da proteína C-reativa; 4) inibição da migração e proliferação das células musculares lisas e da formação de células espumosas; 5) diminuição do fator tecidual e da agregação plaquetária; 6) estabilização da placa aterosclerótica; 7) diminuição da formação de osteoclastos e estimulação da formação de osteoblastos; e 8) modulação da função imune (em alguns animais) (Forti e Diament, 2004). Estes efeitos pleiotrópicos e a diminuição do colesterol atuam sinergicamente na redução do RCV.

Na prática, as estatinas reduzem os valores de CT de 15% a 60%, do c-LDL entre 20% a 60%, dos TG de 10% a 20% e aumentam o c-HDL entre 5% a 10%, com variações entre as diferentes estatinas e dependentes da dose empregue. Os benefícios do tratamento da hipercolesterolemia com estatinas têm sendo evidenciados em estudos controlados com recurso a angiografia, ressonância magnética, ultra-sonografia e estudos clínicos prospetivos de longa duração, tendo sido avaliados nestes últimos grandes populações e grupos especiais, tais como idosos, crianças, mulheres, hipertensos, renais, diabéticos, doentes em fase aguda do miocárdio e após transplante renal e cardíaco (Baigent *et al.*, 2005).

1.5.3 Abordagem combinada com estatinas

Apesar de nas mais recentes *guidelines* (Stone *et al.*, 2014) ser recomendada a prescrição das estatinas de intensidade moderada a todos os doentes com RCV aterosclerótico moderado ou elevado, independentemente da concentração de c-LDL, e ser crescente o número de indivíduos tratados com estatinas, cresce também o número de doentes com efeitos secundários ou que não respondem bem a esta terapêutica, particularmente aqueles com DCV pré-existente, diabetes ou indivíduos assintomáticos de alto risco com respostas individuais sub-ótimas. As estatinas podem ser associadas a outros fármacos com mecanismo de ação hipocolesteremiante diferente (Rozman e Monostory, 2010; Gudzone *et al.*, 2014), não obstante as estatinas deverem ser usadas na dose mais alta tolerável, antes de qualquer terapêutica combinada (Stone *et al.*, 2014). Porém, alguns doentes não toleram ou não respondem à monoterapia com estatinas de potência elevada e este regime tem sido

associado a um risco aumentado significativo de eventos adversos e à descontinuação ou não adesão à terapêutica. A combinação de estatinas de potência baixa ou moderada com outros fármacos antilipídêmicos pode ser uma alternativa, mas os benefícios e os riscos quando em comparação com a monoterapia com estatinas de potência elevada ainda são pouco conhecidos (Gudzune *et al.*, 2014).

No Estudo Internacional da Dislipidemia (DYSIS, *Dyslipidemia International Study*), um estudo epidemiológico, multicêntrico e transversal, foi avaliada a prevalência e o tipo de alterações lipídicas persistentes em doentes a fazer terapêutica com estatinas. Publicado em 2011, o estudo DYSIS-Portugal mostrou que mesmo medicados com estatinas, a maioria dos doentes continuava a não atingir os objetivos terapêuticos recomendados para o c-LDL, estando vulneráveis ao desenvolvimento de complicações cardiovasculares (66,7% dos doentes recrutados apresentava risco elevado de desenvolver complicações cardiovasculares; 30% com DCV pré-existente). A estatina mais frequentemente usada era a sinvastatina (55,9%) e a maioria dos doentes estava a fazer tratamento com estatinas de baixa potência. Apenas 15,3% dos doentes estavam simultaneamente a fazer outra terapêutica antilipídêmica, sendo o fármaco mais usado o ezetimibe (10,2% do total dos doentes) (Marques da Silva e Massano Cardoso, 2011).

O estudo IMPROVE-IT (*IMProved Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy International Trial*), um estudo multicêntrico internacional, em dupla ocultação e controlado por placebo (18114 doentes com síndrome coronária aguda recrutados e com c-LDL <125 mg/dL) faz a comparação entre dois braços terapêuticos: a monoterapia com sinvastatina (40 mg) *versus* a associação de ezetimibe/sinvastatina (10/40 mg) (Canon *et al.*, 2008). Este estudo (recentemente concluído e apresentado em Novembro de 2014 no congresso da AHA) veio permitir ultrapassar a falta de evidência em termos de eficácia e segurança deste fármaco relativamente às estatinas, confirmando que em indivíduos de alto RCV, a redução do c-LDL com um fármaco não-estatina (ezetimibe) conduz à mesma redução de eventos demonstrada com estatinas e que a redução do c-LDL para valores abaixo de 70 mg/dL proporciona uma redução adicional de eventos.

Recentemente Gudzune *et al.* (2014) apresentaram uma revisão sistemática fazendo uma comparação em termos dos benefícios clínicos, adesão e riscos, entre uma terapêutica combinada (incluindo resinas sequestrantes de ácidos biliares, ezetimibe, fibratos, niacina e ácidos gordos ómega 3) com estatinas de baixa potência e a monoterapia com estatinas de elevada potência, em adultos com elevado RCV aterosclerótico. Os resultados evidenciaram que a combinação de uma resina sequestrante de ácidos biliares com uma estatina de potência moderada, ou de ezetimibe com uma estatina de baixa potência, permite uma redução do c-LDL similar ou superior (de 0% a 14%) àquela que seria obtida com estatinas de

elevada potência. Porém esta meta-análise não permitiu determinar se o benefício obtido em termos de diminuição do c-LDL se traduziu por redução do risco de mortalidade, de eventos coronários ou de processos de revascularização. Mais ainda, os autores não encontraram evidência suficiente no que diz respeito à terapêutica combinada com fibratos, niacina ou ácidos gordos ómega 3, comparativamente à monoterapia com estatinas de potência elevada. De facto vários estudos têm avaliado se os indivíduos com alterações da homeostasia do colesterol podem beneficiar de estratégias de tratamento que se traduzam por redução da absorção do colesterol em adição à terapêutica com estatinas (enquanto alguns em comparação com estatinas de potência elevada). Nesse sentido, para além da sinergia ezetimibe+estatina, os alimentos suplementados com PS como terapêutica adjuvante da dieta têm sido igualmente avaliados em múltiplos estudos em co-administração com uma estatina (PS+estatina), com comprovada eficácia.

Os resultados de 5 anos de intervenção (entre 1998 e 2002 e com um *follow-up* de 2003 a 2007) na coorte *Dutch Doetinchem* (3829 homens e mulheres; idades entre 31 e 71 anos) mostraram que nos consumidores de margarina enriquecida com PS houve uma redução de 4% nos níveis circulantes de colesterol e igualmente de 4% nos níveis séricos do colesterol não-HDL (Fransen *et al.*, 2007) e ainda com a mesma coorte, Eussen *et al.* (2011) comprovaram que a combinação PS+estatina foi mais eficaz na redução do não-HDL (-32%) do que a monoterapia com estatina (- 26%).

Uma revisão sistemática com meta-análise de 8 ensaios (306 indivíduos) comparativos entre PS+estatina e monoterapia com estatinas permitiu concluir que a co-administração PS+estatina resultou numa redução adicional do c-LDL de 0,34 mmol/L, sendo ainda enfatizado pelos seus autores a necessidade de RCT com PS em combinação com estatinas para a avaliação do impacte sobre a morbimortalidade (Scholle *et al.*, 2009).

Embora a ingestão de alimentos enriquecidos em PS efetivamente atenua a absorção do colesterol, coletivamente, os estudos indicam, em resposta, um aumento da síntese do colesterol. A supressão da absorção do colesterol pelos PS (ou pelo ezetimibe) resulta numa redução dos níveis circulantes de colesterol, o que causa a inibição da retroalimentação negativa sobre a HMG-CoA redutase, levando a um aumento da síntese do colesterol.

Deste modo, parece igualmente plausível que ocorra o efeito recíproco sobre a absorção do colesterol quando o alvo da terapêutica é a síntese do colesterol.

Assim sendo, o efeito terapêutico sobre um vector, a síntese ou a absorção do colesterol, traduz-se por um efeito recíproco e compensatório sobre o outro vector, *i.e.* uma sinergia para manter a homeostasia do colesterol, de que resulta um balanço/efeito benéfico sobre os níveis circulantes de colesterol (Santosa *et al.*, 2007).

Uma vez que a maioria dos estudos comprova esta relação recíproca entre os dois vetores, a magnitude do efeito revela-se deveras importante. No caso dos PS, a diminuição induzida pelo tratamento na absorção do colesterol foi consistentemente mais pronunciada do que o aumento recíproco na síntese. No caso das estatinas, a redução induzida na síntese do colesterol foi superior ao aumento compensatório observado na absorção. A alteração recíproca no segundo vetor não compensa totalmente a alteração ocorrida no primeiro vetor, permitindo que ocorra uma redução dos níveis circulantes de colesterol. A magnitude desse efeito tem sido determinada em ensaios em que foi estudado o efeito dos PS e das estatinas sobre o metabolismo do colesterol, mas, só pode ser quantificada quando são empregues métodos diretos tais como o balanço de esteróis, a razão de isótopos, ou a incorporação de deutério (Santosa *et al.*, 2007).

Porém, esta relação mecânica, ainda permanece por esclarecer. A evidência desta relação recíproca e compensatória permite sugerir que as terapêuticas combinadas que afetam simultaneamente os dois vetores poderão ser mais vantajosas do que a monoterapia.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto de investigação consistiu na caracterização (pioneira em Portugal) do metabolismo do colesterol através da determinação analítica dos marcadores séricos de síntese e de absorção do colesterol (esteróis não colesterolémicos) na população adulta portuguesa hipercolesterolémica, sem terapêutica hipolipemiante, com o intuito de contribuir para o conhecimento do metabolismo/homeostasia do colesterol, de disponibilizar uma nova ferramenta, na prática clínica, coadjuvante da abordagem clássica da ficha lipídica e de analisar o contributo dos referidos marcadores bioquímicos no estabelecimento ou na monitorização de uma terapêutica hipocolesterolemiantes.

O presente projeto de investigação pode ser subdividido em dois estudos com os seguintes objetivos específicos:

ESTUDO 1 – Categorização dos perfis de “metabolizador” do colesterol na população portuguesa, numa amostra estatisticamente representativa da região Centro, caracterizada por sexo e por grupo etário, através da quantificação/proporção de marcadores de síntese e de absorção do colesterol, por recurso à GC-MS. Esta categorização dos indivíduos classificando-os como tendo taxas de absorção gastrointestinal altas, intermédias ou baixas (e as taxas opostas de síntese hepática de colesterol) pode contribuir para a avaliação do correspondente nível de RCV e para o estabelecimento ou monitorização de uma terapêutica hipocolesterolemiantes.

Dadas as associações entre a homeostasia do colesterol, a concentração de lípidos e lipoproteínas e a DCV, foi também objetivo específico avaliar as relações entre os marcadores de síntese e absorção do colesterol e os fatores de RCV/estilos de vida.

ESTUDO 2 - Avaliação do efeito aditivo da toma de um alimento (de baixo teor de gordura) suplementado com fitoesteróis (intervenção não farmacológica sobre a via exógena do metabolismo do colesterol) combinada com o tratamento com estatinas (terapêutica farmacológica sobre a via endógena do metabolismo do colesterol), na redução do c-LDL, em indivíduos idosos, com valor basal de c-LDL <130 mg/dL, através da determinação analítica dos marcadores séricos de síntese e absorção do colesterol por GC-MS e da ficha lipídica.

CAPÍTULO III

POPULAÇÃO DE ESTUDO E MÉTODOS

CAPÍTULO 3 – POPULAÇÃO DE ESTUDO E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Os ESTUDOS 1 e 2 foram desenvolvidos após a obtenção do parecer positivo da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e da Comissão de Avaliação de Pedidos de Patrocínio Científico e Autorização de Estudos (CAPPCA) da Administração Regional de Saúde do Centro (ARSC) e da autorização das instituições públicas e privadas onde se realizaram os referidos estudos.

3.1.1 População de estudo 1 (ESTUDO 1)

O cálculo amostral (n=309) teve por base a população da região Centro de Portugal (2 381 068 indivíduos) estimada nos Censos de 2011, uma prevalência de 55% de hipercolesterolemia, um nível de confiança de 95% e uma margem de erro de 5%. O número de indivíduos adultos estimado como necessário para completar a amostra, caracterizado por sexo e por idade está ilustrado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Cálculo amostral por sexo e escalão etário com base na população da região Centro de Portugal (Censos 2011)

Idade (anos)	Homens	Mulheres	Total
18-29	25	24	49
30-39	28	28	56
40-49	27	28	55
50-59	24	25	49
60-69	19	22	41
70-79	16	21	37
≥ 80	8	14	22

A seleção dos 309 indivíduos a incluir no estudo foi feita ao nível da rede de cuidados de saúde primários (três unidades de saúde familiar (USF) e um centro de saúde (CS)), do Agrupamento de Centros de Saúde (ACES) - Baixo Mondego, através da consulta dos ficheiros eletrónicos médicos dos utentes codificados para alterações do metabolismo dos lípidos (código T93). Os critérios de inclusão basearam-se nos valores de referência dos parâmetros lipídicos, CT \geq 200

mg/dL (5,2 mmol/L) e/ou c-LDL \geq 100 mg/dL (2,6 mmol/L), aplicáveis à data deste estudo, definidos nas orientações do NCEP-ATP III, e ainda na ausência de toma de qualquer terapêutica hipolipemiante (medicação, suplementos dietéticos ou alimentos funcionais) nos três meses anteriores ao início do estudo.

Face aos critérios de inclusão do estudo foram selecionados os indivíduos que poderiam ser recrutados, com base nos valores da última ficha lipídica e no registo da terapêutica hipolipemiante prescrita pelo médico de medicina geral e familiar.

Os critérios de exclusão foram os seguintes: diagnóstico de sitosterolemia, história clínica de doença hepática ou renal crónica, doença mental, gravidez.

Não tendo sido possível obter o número de indivíduos necessário para ter significado estatístico, no escalão etário dos 18 aos 29 anos e naqueles com idade igual ou superior a 70 anos, nas USF e no CS onde o estudo tinha sido autorizado, foram contactadas instituições de ensino superior, empresas públicas e privadas e lares de idosos e obtida a autorização para a realização do estudo. Contudo, o objetivo não foi alcançado, pelo que a equipa de investigação tomou a opção de limitar a população de estudo 1, aos indivíduos em idade ativa (30-65 anos), perfazendo um total de 201.

Seguidamente foi feito o contacto por telefone ou através de correio eletrónico aos utentes selecionados, para explicação do estudo e convite à participação.

A Tabela 3.2 resume o processo de seleção e recrutamento.

Tabela 3.2 - Processo de seleção e recrutamento dos participantes	N
Total de utentes adultos codificados T93 (rede de cuidados de saúde primários) (3 Unidades de Saúde Familiar e 1 Centro de Saúde da rede de ACES-Baixo Mondego)	6711
Total de indivíduos selecionados com base no último registo médico de ficha lipídica e ausência de terapêutica hipolipemiante (indivíduos contactados e convidados a participar)	1407
Total de indivíduos recrutados noutras instituições (lares de idosos; instituições de ensino superior; empresas públicas e privadas) para completar os escalões etários dos 18-29 e \geq 70 anos	140
Total de amostras de sangue analisadas para ficha lipídica, para verificação dos critérios de inclusão lipídicos (CT \geq 200 mg/dL e/ou c-LDL \geq 100 mg/dL)	350
Total de amostras séricas analisadas para a quantificação dos marcadores de absorção e síntese do colesterol, em respeito dos critérios de inclusão lipídicos	212

A população de estudo 1 ficou assim completa com 212 indivíduos adultos hipercolesterolémicos, sem terapêutica hipocolesterolemiantes (100 do sexo masculino e 112 do sexo feminino), de nacionalidade portuguesa, habitantes ou trabalhadores na região Centro de Portugal, com idade compreendida entre os 30 e os 65 anos.

3.1.2 População de estudo 2 (ESTUDO 2)

Dada a carência de estudos em indivíduos idosos hipercolesterolémicos, para além de que a este subgrupo da população é vulgarmente prescrita uma estatina como terapêutica hipocolesterolemiantes, a nossa população de estudo 2 ficou constituída por indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos, em tratamento regular com estatinas, com valores basais de c-LDL inferiores a 130 mg/dL (3,35 mmol/L), nos quais foi estudado o efeito aditivo da toma de leite fermentado suplementado com fitoesteróis (PS-FM, *PS-fermented milk*). Porque se pretendia garantir a inclusão de indivíduos com dieta regular controlada, a seleção e recrutamento foram feitos em lares de idosos, mais concretamente em 3 lares de idosos localizados na região Centro, onde estes se encontravam institucionalizados.

Foi estimada uma amostra de 18 indivíduos como sendo necessária, com um poder de 80% para detetar uma redução de c-LDL de 0,27 mmol/L (5% de nível de significância). A nossa amostra ficou completa com 35 indivíduos.

Os critérios de inclusão basearam-se nos valores de c-LDL <130 mg/dL, toma regular de uma estatina há pelo menos 3 meses, idade igual ou superior a 65 anos, estar institucionalizado em instituição da terceira idade. A toma de qualquer outro agente hipocolesterolemiantes seja medicamento, suplemento dietético ou alimento funcional constituiu critério de exclusão.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 ESTUDO 1

A todos os indivíduos que deram o seu consentimento informado para a participação no estudo foi pedido o preenchimento de um questionário de caracterização sociodemográfica, clínica e de estilos de vida e colhida uma amostra de sangue (5 mL a 10 mL) em jejum (cuja preparação e análise está descrita adiante no sub-capítulo 3.2.3).

No desenvolvimento do referido questionário (concebido especificamente para este estudo) esteve envolvido um painel de especialistas das áreas da Nutrição, Medicina e Farmácia com vários anos de experiência. O painel validou o questionário em termos de legibilidade, estrutura, relevância e número total de questões. Foi realizado um pré-teste e com base nos

resultados obtidos, procedeu-se à revisão do questionário, incluindo-se no Anexo 1 a sua versão final, autoadministrada aos participantes.

Em termos dos estilos de vida, nomeadamente a prática regular de exercício físico aeróbio, tabagismo e padrão dietético, os pressupostos tomados para a definição de níveis adequados tiveram por base as recomendações para a adoção de estilos de vida saudáveis emanadas pelo grupo de trabalho internacional dedicado aos estilos de vida da ACC/AHA (Eckel *et al.*, 2013), tendo em vista a redução do risco de doença crónica.

As recomendações em termos do padrão dietético tidas em consideração foram as seguintes:

a) preferência pela utilização de azeite como gordura para uso culinário ou para tempero; consumo preferencial de carnes brancas em detrimento das carnes vermelhas; consumo baixo de carnes vermelhas e produtos cárneos (≤ 2 porções/semana); consumo moderado a alto de peixe (≥ 3 porções/semana) (especialmente de peixes azuis ≥ 2 porções/semana; ingestão moderada de álcool, especialmente de vinho tinto às refeições (1 copo/dia para o sexo feminino - 10 g de álcool ou 2 copos/dia para o sexo masculino - 20 g de álcool); e consumo máximo de sal (sódio) de 5 g/dia (Perk *et al.*, 2012). No que diz respeito ao aporte hídrico (proveniente de bebidas) diário adequado para a população portuguesa foram seguidas as recomendações $\geq 1,9$ L para homens e $\geq 1,5$ L para mulheres (Padrão *et al.*, 2011).

Como prática regular adequada de exercício físico, foi considerado o exercício aeróbico de intensidade moderada durante 150 minutos/semana ou 75 minutos de intensidade vigorosa, ou uma combinação de ambos (Jansson e Andersson, 2010).

Foram considerados fumadores aqueles indivíduos com um consumo tabágico equivalente igual ou superior a um cigarro/dia.

Em termos da caracterização clínica foi avaliado o IMC, registada a medicação prescrita para comorbilidades e a existência de diagnóstico de hipertensão, diabetes mellitus ou DCV. Foi considerada medicação concomitante que pode afetar os níveis circulantes de colesterol os inibidores da enzima de conversão da angiotensina, bloqueadores do recetor da angiotensina II, bloqueadores beta, bloqueadores do canal de cálcio e agentes diuréticos.

Neste estudo foi adotada a classificação ATP III do NCEP para os níveis de CT, c-LDL, c-HDL e TG (NCEP-ATP III, 2001) e a classificação da Organização Mundial de Saúde de IMC para adultos (OMS, 2004 – actualização de OMS, 1995 e 2000).

3.2.2 ESTUDO 2

No Estudo 2 foi pedido aos indivíduos recrutados em lares de idosos, medicados com estatinas, que fizessem uma toma diária (ao almoço) de um leite fermentado suplementado com 2 g de fitoesteróis (apresentação da declaração nutricional na Tabela 3.3). Tratava-se de um leite fermentado aromatizado e açucarado com adição de esteróis vegetais composto de leite pasteurizado magro (79%), ésteres de esteróis vegetais (2%), açúcares (2%), fibras, fruta (1%), aromas, antioxidante (extrato rico em tocoferóis), corante (antocianinas), edulcorante (sucralose), emulsionantes (mono e diglicéridos de ácidos gordos).

Tabela 3.3 - Declaração nutricional

Valores nutricionais médios	
por 100g de produto:	
Valor energético	190kJ/45 kcal
Proteínas	2,5 g
Hidratos de carbono	4,5 g
dos quais açúcares	4,5 g
Lípidos (excluindo esteróis)	1,5 g
dos quais saturados	0,2 g
monoinsaturados	0,4 g
polinsaturados	0,9 g
Fibra	1,0 g
Sódio	0,04 g
Esteróis vegetais	2,0 g

Fonte: Unilever Jerónimo Martins Lda.

Os participantes tomaram o PS-FM ao longo de 2 períodos consecutivos de 3 semanas e o efeito da terapêutica combinada foi avaliado por comparação com os valores basais da ficha lipídica e dos marcadores séricos de absorção e síntese do colesterol, assim como os valores ao fim de 6 semanas de *washout*. Assim, a todos os indivíduos que deram o seu consentimento informado para a participação no estudo foram colhidas quatro amostras de sangue (5 mL a 10 mL), em jejum, respetivamente nos intervalos de tempo t0 (basal-antes da toma do PS-FM); t1 (após 3 semanas de toma de PS-FM), t2 (ao fim de 6 semanas de toma de PS-FM) e t3 (após 6 semanas de *washout*).

Uma vez que o Estudo 2 foi desenvolvido em lares de idosos, no que diz respeito à caracterização sociodemográfica, clínica e de estilos de vida dos participantes, destaca-se que toda a informação foi dada pelo pessoal de enfermagem responsável da própria instituição. A

dieta era comum a todos os participantes do estudo e não havia nenhum caso de dieta específica por condição de saúde.

Neste estudo foi igualmente adotada a classificação ATP III do NCEP para os níveis de CT, c-LDL, c-HDL e TG (NCEP-ATP III, 2001) e a classificação da Organização Mundial de Saúde de IMC para idosos (OMS, 2000).

3.2.3 Preparação e análise da amostra

A amostra de sangue (Estudo 1 e Estudo 2) foi sujeita a centrifugação a 1500-2000 g/minuto, durante 20 minutos para a separação do soro. A amostra de soro obtida foi dividida em aliquotas que foram congeladas a -20°C para análise dentro de 2-3 meses e a -70°C para um período de tempo superior. Uma aliquota de soro foi utilizada para a determinação da ficha lipídica (CT, c-HDL e TG) por método enzimático colorimétrico, no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O valor de c-LDL foi calculado através da equação de Friedwald (Friedwald *et al.*, 1972) e o do não-c-HDL pela diferença entre o CT e o c-HDL. Apenas no caso de cumprimento dos parâmetros de inclusão lipídicos (CT ≥ 200 mg/dL e/ou c-LDL ≥ 100 mg/dL), outra aliquota da mesma amostra foi utilizada para a determinação por GC-MS, dos marcadores séricos de absorção e síntese do colesterol, no laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

No fluxograma seguinte esquematiza-se o procedimento experimental implementado para a preparação e análise da amostra por GC-MS (Figura 7). Este método foi validado por Saraiva *et al.* (2011).

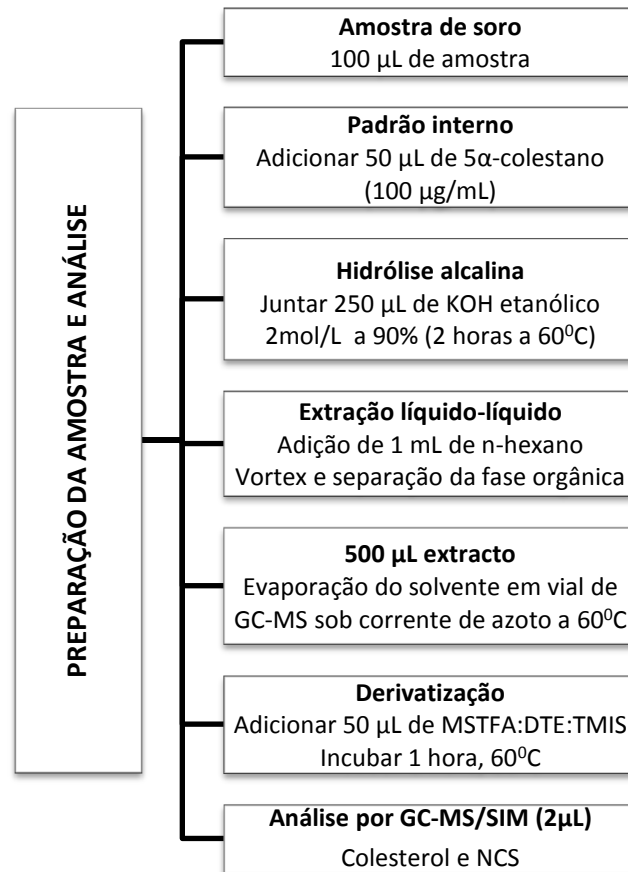


Figura 7. Procedimento experimental adoptado para a extração e análise do colesterol e NCS

Existem vários métodos padronizados para a análise dos esteróis principalmente desenvolvidos para a análise de alimentos. Na área biomédica a maioria dos investigadores introduziu modificações a estes métodos para os tornar adequados a amostras de menor dimensão, para usar menores volumes de solvente e eliminar algumas das etapas de preparação da amostra, reduzindo o tempo de análise. Existe assim entre os vários grupos de investigação nesta área uma grande variabilidade quer no que diz respeito ao padrão interno utilizado quer às técnicas para a extração, a derivatização e a separação na análise dos NCS.

A descrição que se segue diz respeito unicamente aos procedimentos utilizados neste trabalho de investigação.

Padrões e Padrão Interno (IS)

Foram preparadas soluções de concentração conhecida, do padrão interno (IS, *internal standard*) e dos padrões desmosterol, latosterol, sitosterol, campesterol, campestanol,

sitostanol, colestanol, fucosterol, estigmasterol e colesterol, a partir dos respetivos padrões puros (Sigma, Madrid, Espanha) para a identificação dos NCS e do colesterol presentes nas amostras de soro. As concentrações indicadas na Tabela 3.4 dizem respeito ao Estudo 1, enquanto no Estudo 2 se recorreu a uma diluição de 1:20.

Tabela 3.4 - Padrões de colesterol, NCS e padrão interno

Padrões	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
5 α -colestano (IS)	100
Desmosterol	25
Latosterol	50
Sitosterol	60
Campesterol	40
Campestanol	35
Sitostanol	65
Colestanol	100
Fucosterol	50
Estigmasterol	50
Colesterol	200

IS – Padrão interno

No que diz respeito ao IS ideal, este deve corresponder a um composto com uma estrutura e um comportamento químico similar ao dos NCS, embora não possa estar presente na amostra; a sua concentração deve estar dentro de uma gama semelhante à dos NCS a medir e deve poder ser sujeito ao passo de derivatização tal e qual a amostra. O IS que foi utilizado foi o 5 α -colestano.

Extração dos esteróis

Para a preparação das amostras para a determinação dos NCS é geralmente necessário um passo de extração dos esteróis da respetiva matriz biológica, sendo o soro ou o plasma as matrizes mais comuns. No nosso caso, previamente à extração por solventes, foi efetuada uma saponificação/hidrólise alcalina para converter os ésteres de ácidos gordos dos NCS a esteróis na forma livre, permitindo assim que possam ser extraídos como parte da matéria insaponificável. Para tal sujeitou-se a amostra de soro (a que se adicionou o IS) à ação de uma solução 2 mol/L de hidróxido de potássio etanólico a 90%, durante 2 horas à temperatura de 60°C, condições óptimas segundo Saraiva *et al.* (2011).

Seguidamente procedeu-se ao passo de extração por solventes, em que são geralmente utilizados solventes não polares. Foi usado o n-hexano, num volume de 1 mL adicionado à amostra. Foi recolhido um volume de 500 µL da fase orgânica para um “vial” de GC e seguidamente procedeu-se à evaporação do solvente/concentração dos analitos de interesse, sob corrente de azoto (a 60°C), para prevenir a oxidação dos esteróis. Seguiu-se um passo de ressuspensão, usando-se o agente de derivatização.

Derivatização dos esteróis

A volatilidade é um passo crítico para a separação dos esteróis por GC-MS (a técnica que foi usada neste trabalho de investigação) e a derivatização contribui, sem dúvida, para a melhoria das propriedades cromatográficas dos compostos de interesse. A maioria dos NCS tem um grupo hidroxilo polar no carbono 3, o qual pode ser derivatizado (conversão em derivados siliados no nosso caso) para potenciar a volatilidade e a termoestabilidade, reduzir a polaridade, facilitando a separação e deteção por GC-MS.

Neste trabalho de investigação foi usada a mistura de derivatização MSTFA:DTE:TMIS (Sigma, Madrid, Espanha; Merck, Lisboa, Portugal; Sigma, Madrid, Espanha) (5000:10:10, m:m:v) apontada como sendo a mais eficiente em termos de especificidade/sensibilidade por Saraiva *et al.* (2011).

Separação e deteção dos esteróis

GC e LC são as duas técnicas mais utilizadas para a separação de misturas de esteróis, tendo sido usada a GC neste trabalho. Em GC a separação dos analitos de interesse é função dos seus pontos de ebulição, do grau de adsorção à fase estacionária e da temperatura da coluna.

Foi utilizada uma coluna capilar de 30 m x 250 µm x 0,25 µm (Supelco SLB-5MS, Reagente 5, Porto, Portugal) equipada num cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de massa seletivo (Agilent Technologies 6890N Network GC System, Soquímica, Lisboa, Portugal). Foi injetado um volume de 2 µL de amostra, sendo a temperatura do injetor de 250°C. Foi estabelecido um programa multi-rampa de temperaturas para o forno, sendo a temperatura inicial da coluna de 200°C, a qual foi mantida por 1 minuto, seguida por um aumento de 20°C/minuto até aos 300°C, mantendo-se nessa temperatura durante 10 minutos. A corrida cromatográfica total teve uma duração de 16 minutos.

Os NCS separados por GC foram detetados e avaliados por MS por monitorização seletiva de iões (SIM). O detetor encontrava-se a uma temperatura de 280°C. O detetor MS é um detetor

seletivo que ioniza os analitos gerando fragmentos que são depois medidos em função da razão massa/carga (m/z). O *software* associado registra um espectro de massa mostrando a abundância de cada fragmento de massa ionizado. A recolha de dados foi efetuada no modo SIM tendo sido selecionado um só íão, em termos de quantificação, para cada composto: m/z 217 para o colestano, m/z 458 para o colesterol, m/z 215 para o colestanol, m/z 343 para o desmosterol, m/z 255 para o latosterol, m/z 343 para o campesterol, m/z 215 para o campestanol, m/z 255 para o estigmasterol, m/z 357 para o β -sitosterol, m/z 215 para o β -sitostanol, m/z 386 para o fucosterol. No modo SIM os íões “indesejados” estão a ser evitados, sendo a seletividade potenciada e podendo contribuir para eliminar interferências de matriz.

Os picos de interesse de cada amostra, registados sob a forma de um cromatograma (ver Anexo 2) (cujas áreas/abundâncias relativas são proporcionais às concentrações do analito em causa) foram identificados por comparação com os padrões e expressos em relação ao padrão interno.

Quantificação de NCS

A concentração de NCS (valor absoluto) deve ser reportada nas unidades SI, ou seja, em mol/L. Quando se usam os NCS como marcadores séricos do metabolismo do colesterol é prática comum reportar os resultados como um rácio para o colesterol (mmol NCS/mol de colesterol). Neste caso a medição do colesterol deve provir da preparação da mesma amostra e idealmente resultar da mesma corrida por GC-MS.

Neste trabalho de investigação os resultados dos NCS foram apresentados como um rácio para o colesterol (resultados normalizados para o colesterol). Apesar de a medição do colesterol ter sido efetuada na mesma corrida cromatográfica dos NCS, a grande quantidade de colesterol presente nas amostras, traduziu-se por incerteza na quantificação, pelo que foi usada a concentração de colesterol medida por método enzimático na determinação da ficha lipídica (da mesma amostra).

Apesar de não existir ainda um método analítico de referência para a análise dos NCS em amostras biológicas (soro, plasma, líquido amniótico, fezes), essencial em análises de rotina, as opções tomadas em termos de preparação e caracterização da amostra (saponificação alcalina; extração dos componentes insaponificáveis; limpeza do extrato, derivatização dos esteróis) e das técnicas de separação e deteção (GC-MS/SIM) tiveram por base as conclusões retiradas do estudo de revisão desenvolvido por Andrade *et al.* (2013) em termos dos avanços mais recentes nos métodos analíticos disponíveis para a análise dos NCS (ver Anexo 3.1) e

derivaram do facto de o método ter sido previamente validado por investigadores do grupo de investigação (Saraiva *et al.*, 2011) no seio do qual foi desenvolvido o presente estudo.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 ESTUDO 1

Os resultados do Estudo 1 foram submetidos para publicação sob a forma de artigo original em revista científica internacional (ver Anexo 3.2). Este sub-capítulo diz assim respeito a essa publicação científica.

4.1.1 Caracterização da população

Os participantes do Estudo 1 apresentavam a seguinte distribuição em termos de categorias profissionais: trabalhador por conta de outrem (152; 71,7%); reformado (26; 12,3%); trabalhador por conta própria (17; 8,0%); trabalhador do serviço doméstico (5; 2,4%); desempregado (5; 2,4%); estudante (4; 1,9%); outra (3; 1,4%).

No que diz respeito às habilitações literárias a distribuição era a seguinte: 1º ciclo (18; 8,5%); 2º ciclo (11; 5,2%); 3º ciclo (37; 17,5%); ensino secundário (40; 18,9%); bacharelato (12; 5,7%); licenciatura (60; 28,3%); mestrado (23; 10,8%); doutoramento (10; 4,7%); outra (1; 0,5%).

As Tabelas 4.1 e 4.2 contêm a caracterização clínica e de estilos de vida dos participantes.

Relativamente à caracterização clínica, do total de indivíduos que constituíam a amostra, vinte e sete indivíduos (12,7 %) eram obesos ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$), 18,9 % tinham hipertensão, enquanto 1,9 % e 2,8 % tinham diabetes e DCV respetivamente. Apenas 42,0% reportaram sofrer de dislipidemia. Trinta e sete indivíduos (17,5%) tomavam medicação para outras comorbidades que poderiam exercer efeito sobre os níveis de colesterol (Tabela 4.1).

No que diz respeito à caracterização dos estilos de vida, 46 (21,7%) participantes eram fumadores e 49,5% auto-reportaram praticar exercício físico regularmente nos níveis recomendados (Tabela 4.2).

Dos 212 indivíduos inquiridos, 168 (79,2%) consideram que a alimentação pode influenciar o estado de saúde e o rendimento laboral e 206 (97,2%) fazem pelo menos três refeições por dia (pequeno-almoço, almoço e jantar).

Tabela 4.1 - População de estudo: Caracterização clínica (N=212)

Variável	30 a 39 anos	40 a 49 anos	50 a 59 anos	60 a 65 anos	p-value
	(N=56)	(N=59)	(N=52)	(N=45)	
IMC, kg/m ²					
Mulheres	24,0 ± 3,7	25,3 ± 3,9	25,4 ± 2,7	25,0 ± 5,1	NS
Homens	26,9 ± 3,2	27,2 ± 3,9	27,6 ± 2,6	27,4 ± 3,9	NS
Total	25,5 ± 3,8	26,2 ± 4,0	26,5 ± 2,8	26,6 ± 4,6	NS
Hipertensão, N (%)					
Mulheres	1 (3,6)	3 (9,4)	7 (25,9)	9 (36,0)	0,007
Homens	1 (3,6)	4 (14,8)	10 (40,0)	5 (25,0)	0,008
Total	2 (3,6)	7 (11,9)	17 (32,7)	14 (31,1)	0,000
Diabetes, N (%)					
Mulheres	0 (0,0)	1 (3,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	NS
Homens	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,0)	2 (10,0)	NS
Total	0 (0,0)	1 (1,7)	1 (1,9)	2 (4,4)	NS
DCV, N (%)					
Mulheres	1 (3,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (12,0)	NS
Homens	1 (3,6)	0 (0,0)	1 (4,0)	0 (0,0)	NS
Total	2 (3,6)	0 (0,0)	1 (1,9)	3 (6,7)	NS
Medicação concomitante*, N (%)					
Mulheres	0 (0,0)	2 (6,3)	7 (25,9)	8 (32,0)	0,002
Homens	2 (7,1)	3 (11,1)	8 (32,0)	7 (35,0)	0,026
Total	2 (3,6)	5 (8,5)	15 (28,8)	15 (33,3)	0,000

Os valores são expressos como média ± DP ou N (%).
 IMC, índice de massa corporal; DCV, doença cardiovascular. *Medicação concomitante que pode afetar o teor de colesterol (ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitor/Inibidor da enzima de conversão da angiotensina; ARB, angiotensin II receptor blocker/bloqueador do recetor da angiotensina II; bloqueador beta; bloqueador do canal de cálcio; diuréticos)

Em termos do padrão dietético desta população de estudo, resumem-se as principais características na Tabela 4.2: a) baixo aporte hídrico (proveniente de bebidas) com apenas 30,2% dos indivíduos a ingerir a quantidade adequada de água por dia; b) ingestão leve a moderada de álcool, especialmente na forma de vinho tinto e às refeições; c) consumo de carnes vermelhas superior ao recomendado (> 5 refeições/semana nos indivíduos do sexo masculino; > 3 refeições/semana nas mulheres; 22,6% tinham um consumo adequado de carnes vermelhas); d) consumo adequado de peixes azuis e brancos. A maioria dos participantes desconhecia a quantidade de sal ingerida por dia, tendo apenas 38 (17,9%) reportado um consumo ≥5 g/dia. Os participantes exibiam preferência por azeite como gordura quer para cozinhar quer para temperar alimentos (dados não apresentados em tabela).

Quanto aos fatores de risco relacionados com os estilos de vida, a destacar por exemplo, a inadequação em termos da prática regular de exercício físico, do consumo de carnes vermelhas ou do aporte hídrico diário, podemos dizer tratar-se de oportunidades para a implementação de alterações terapêuticas sobre os estilos de vida.

Tabela 4.2 - Caracterização da população de estudo: Estilos de vida (N=212)

Variável*	30 a 39 anos (N=56)	40 a 49 anos (N=59)	50 a 59 anos (N=52)	60 a 65 anos (N=45)	p-value
Fumador					
Mulheres	4 (14,3)	9 (28,1)	6 (22,2)	4 (16,0)	NS
Homens	8 (28,6)	8 (29,6)	3 (12,0)	4 (20,0)	NS
Total	12 (21,4)	17 (28,8)	9 (17,3)	8 (17,8)	NS
Exercício físico regular adequado					
Mulheres	10 (35,7)	17 (53,1)	16 (59,3)	16 (64,0)	NS
Homens	16 (57,1)	10 (37,0)	10 (40,0)	10 (50,0)	NS
Total	26 (46,4)	27 (45,8)	26 (50,0)	26 (57,8)	NS
Aporte hídrico diário adequado					
Mulheres	12 (42,9)	11 (34,4)	6 (22,2)	10 (40,0)	NS
Homens	8 (28,6)	6 (22,2)	8 (32,0)	3 (15,0)	NS
Total	20 (35,7)	17 (28,8)	14 (26,9)	13 (28,9)	NS
Ingestão semanal adequada de álcool					
Mulheres	28 (100,0)	30 (93,8)	24 (88,9)	24 (96,0)	NS
Homens	26 (92,9)	19 (70,4)	17 (68,0)	11 (55,0)	NS
Total	54 (96,4)	49 (83,1)	41 (78,8)	35 (77,8)	0,044
Ingestão semanal adequada de carnes vermelhas					
Mulheres	5 (17,9)	11 (34,4)	11 (40,7)	10 (40,0)	NS
Homens	3 (10,7)	1 (3,7)	3 (12,0)	4 (20,0)	NS
Total	8 (14,3)	12 (20,3)	14 (26,9)	14 (31,1)	NS
Ingestão semanal adequada de peixe					
Mulheres	25 (89,3)	32 (100,0)	27 (100,0)	25 (100,0)	0,026
Homens	27 (96,4)	26 (96,3)	24 (96,0)	20 (100,0)	NS
Total	52 (92,9)	58 (98,3)	51 (98,1)	45 (100,0)	NS
Ingestão semanal adequada de peixes azuis					
Mulheres	12 (42,9)	21 (65,6)	16 (59,3)	20 (80,0)	0,046
Homens	12 (42,9)	11 (40,7)	18 (72,0)	13 (65,0)	0,056
Total	24 (42,9)	32 (54,2)	34 (65,4)	33 (73,3)	0,011
Perceção da ingestão de sal					
Mulheres	1 (3,6)	8 (25,0)	4 (14,8)	6 (24,0)	NS
Homens	3 (10,7)	8 (29,6)	5 (20,0)	3 (15,0)	NS
Total	4 (7,1)	16 (27,1)	9 (17,3)	9 (20,0)	0,016

* Todas as variáveis são auto-reportadas. Os resultados são expressos como N (%).

É considerável a evidência científica que serve de suporte ao impacto positivo da atividade/exercício físico sobre os níveis séricos dos lípidos. Múltiplas intervenções sobre os estilos de vida são de facto recomendadas na prática clínica, passando usualmente por intervenções não somente ao nível da atividade física, mas também da dieta e da manutenção de composição corporal saudável adequada ao sexo e idade, tanto mais que os estilos de vida saudáveis são um componente-chave da promoção da saúde e da redução do RCV, tal como consta do mais recente documento orientador “*2013 ACC/AHA Guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults*” (Stone et al., 2014).

Relativamente à ficha lipídica, 89 (42,0%) dos indivíduos estudados apresentavam CT \geq 240 mg/dL (\geq 6,21 mmol/L); 70 (33,0%) tinham c-LDL \geq 160 mg/dL (\geq 4,15 mmol/L); e 43 (20,3%) tinham valores de TG \geq 200 mg/dL (\geq 2,26 mmol/L) (dados não apresentados sob a forma de tabela). Para além dos marcadores da absorção do colesterol (campesterol, sitosterol e colestanol), também foram determinados outros fitoesteróis menos abundantes, tendo sido obtidos os seguintes resultados (mmol/mol de colesterol), em média: 24,3 \pm 12,8 de campestanol [79 indivíduos (37,3%)]; 28,3 \pm 7,6 de estigmasterol [32 indivíduos (15,1%)]; 59,7 \pm 20,6 de sitostanol [139 indivíduos (65,6%)]; e 44,4 \pm 22,5 de fucosterol [159 indivíduos (75,0%)].

Para a quantificação das concentrações de todos os NCS analisados, os picos de interesse de cada amostra sérica, registados sob a forma de cromatograma, foram identificados por comparação com os padrões e expressos em relação ao padrão interno (cujas áreas/abundâncias relativas são proporcionais às concentrações do analito em causa), tendo por base o método de regressão linear. Na Tabela 4.3 apresentam-se as equações de regressão linear e o coeficiente de linearidade obtidos para cada uma das respetivas curvas de padrões.

Tabela 4.3 - Regressão linear para o cálculo da concentração dos NCS

NCS	Equação de regressão linear	Linearidade (R ²)
Colestanol	$y = 0,7008 x + 0,0099$	0,9985
Desmosterol	$y = 0,7664 x + 0,0014$	0,9995
Latosterol	$y = 0,8397 x + 0,001$	0,9992
Campesterol	$y = 0,5889 x + 0,0012$	0,9989
Campestanol	$y = 0,368 x + 0,0002$	0,9993
Estigmasterol	$y = 0,1997 x + 0,0008$	0,9988
Sitosterol	$y = 0,1846 x + 0,0013$	0,9983
Sitostanol	$y = 0,3714 x + 0,0023$	0,9980
Fucosterol	$y = 0,6042 x + 0,0013$	0,9994

Y - Corresponde ao valor da razão entre a abundância relativa do NCS e a abundância relativa do padrão interno;
X - Corresponde à concentração do NCS em µg/µL.

4.1.2 Marcadores séricos do metabolismo do colesterol e perfil lipídico em função do sexo

Neste estudo transversal, verificou-se que, em média, as concentrações dos marcadores de absorção eram mais elevadas do que as dos marcadores de síntese do colesterol (Tabela 4.4), em concordância com Matthan *et al.* (2013). Também, e em consonância com outros estudos anteriores (Trautwein *et al.*, 2003; Silbernagel *et al.*, 2010; Strandberg *et al.*, 2010; Tuikkala *et al.*, 2010; Weingärtner *et al.*, 2010) observou-se a existência de associação inversa entre os marcadores de síntese e os marcadores de absorção do colesterol, refletindo um provável mecanismo de compensação homeostático no metabolismo do colesterol.

No nosso estudo foram observadas diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito aos marcadores do metabolismo do colesterol, entre homens e mulheres, tal como indicado anteriormente por Sudhop *et al.* (2002b) e Silbernagel *et al.* (2010). Em média, comparativamente aos homens, as mulheres tinham concentrações mais baixas dos marcadores de síntese do colesterol ($p < 0,01$ para o latosterol,) indicando que, nas mulheres, a taxa de biosíntese de colesterol é fisiologicamente mais baixa, o que também pode traduzir-se por uma atividade e expressão reduzida da HMG-CoA redutase, a enzima limitante da síntese do colesterol. Em termos dos marcadores de síntese, apenas no caso do latosterol, os nossos resultados tinham significado estatístico, mas não para o desmosterol. Estes resultados estão em concordância com Nissinen e colaboradores (2008) que mostraram ser o latosterol, o marcador de síntese do colesterol mais fiável.

Tabela 4.4 - Marcadores do metabolismo do colesterol e perfil lipídico em função do sexo

Variável	Mulheres (N=112)	Homens (N=100)	p-value*	p-value ajustado ao IMC**
Marcadores síntese do colesterol, *10 ² mmol/mol colesterol				
Desmosterol	23,4 ± 9,5	24,3 ± 4,6	0,391	0,542
Latosterol	35,5 ± 8,8	40,7 ± 11,2	0,000	0,006
Marcadores absorção do colesterol, *10 ² mmol/mol colesterol				
Campesterol	47,4 ± 13,6	43,2 ± 13,6	0,026	0,155
Sitosterol	63,6 ± 19,8	55,3 ± 20,6	0,003	0,020
Colestanol	61,6 ± 16,2	65,1 ± 21,2	0,175	0,069
Razão Síntese/Absorção				
Latosterol/campesterol	0,78 ± 0,27	1,02 ± 0,42	0,000	0,000
Latosterol/sitosterol	0,60 ± 0,23	0,84 ± 0,41	0,000	0,000
Latosterol/colestanol	0,61 ± 0,26	0,68 ± 0,26	0,062	0,490
Lípidos, mmol/L				
CT	6,07 ± 0,71	6,22 ± 1,12	0,235	0,263
c-LDL	3,84 ± 0,67	4,03 ± 0,74	0,046	0,070
c-HDL	1,58 ± 0,35	1,20 ± 0,23	0,000	0,000
TG	1,47 ± 0,72	2,37 ± 2,55	0,000	0,004
Não-c-HDL	4,49 ± 0,70	5,02 ± 1,12	0,000	0,000
Rácios lipídicos				
CT/c-HDL	4,01 ± 0,91	5,30 ± 1,26	0,000	0,000
c-LDL/c-HDL	2,55 ± 0,76	3,43 ± 0,97	0,000	0,000
TG/c-HDL	2,31 ± 1,45	4,94 ± 6,51	0,000	0,000
Não-c-HDL/c-HDL	3,01 ± 0,91	4,34 ± 1,26	0,000	0,000

Os valores são expressos como média ± DP.

*p-value com base no teste *t-student* para duas amostras.

** p-value com base no teste *t-student* para duas amostras a partir do modelo linear geral para o IMC (índice de massa corporal).

CT, colesterol total; c-LDL, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; c-HDL, colesterol da lipoproteína de alta densidade; Não-c-HDL, colesterol não-HDL; TG, triglicérides.

Em média, as mulheres tinham concentrações mais elevadas de campesterol e de sitosterol ($p < 0,05$), mas não de colestanol, embora apenas com significado estatístico para o sitosterol ($p < 0,05$).

Com base nestas diferenças, os homens exibiam valores mais elevados da razão síntese/absorção do que as mulheres ($p < 0,001$ para a razão latosterol/campesterol e latosterol/sitosterol).

No que diz respeito ao perfil lipídico e aos rácios aterogénicos lipídicos, também se observaram diferenças em função do sexo: em quase todos os parâmetros, as mulheres tinham concentrações mais baixas ($p < 0,01$ para os TG; $p < 0,001$ para o não-c-HDL e todos os rácios); apenas o c-HDL era inferior nos homens ($p < 0,001$) (Tabela 4.4).

As referidas diferenças, observadas com base no sexo, não eram explicadas por diferenças em termos do IMC, à exceção do campesterol e do c-LDL.

4.1.3 Marcadores séricos do metabolismo do colesterol e perfil lipídico em função da idade

Foram observadas diferenças entre estratos etários no que diz respeito aos marcadores séricos do metabolismo do colesterol e aos parâmetros lipídicos tradicionais. Verificou-se a existência de uma associação positiva entre a idade e a concentração (média) dos marcadores de absorção do colesterol, à exceção do colestanol, embora apenas com significado estatístico no caso do campesterol ($p < 0,05$) e do sitosterol ($p < 0,001$). Em consonância o significado estatístico foi de natureza inversa para a razão latosterol/sitosterol ($p < 0,001$) em função da idade (intra e inter grupos) (Tabela 4.5; correlações na Tabela 4.7).

Tabela 4.5 - Marcadores do metabolismo do colesterol e perfil lipídico em função da idade

Variável	30 a 39 anos	40 a 49 anos	50 a 59 anos	60 a 65 anos	p-value*	p-value ajustado ao IMC**
	(N=56)	(N=59)	(N=52)	(N=45)		
Marcadores da síntese do colesterol, *10 ² mmol/mol colesterol						
Desmosterol	23,1 ± 12,4	23,6 ± 5,8	24,9 ± 4,5	24,0 ± 3,9	0,678	0,724
Latosterol	37,3 ± 12,3	39,1 ± 12,0	39,1 ± 7,9	36,2 ± 7,6	0,409	0,351
Marcadores da absorção do colesterol, *10 ² mmol/mol colesterol						
Campesterol	41,8 ± 10,2	45,7 ± 17,2	47,9 ± 14,3	46,7 ± 11,5	0,112	0,037
Sitosterol	49,3 ± 14,3	58,8 ± 24,9	67,1 ± 18,9	65,4 ± 17,6	0,000	0,000
Colestanol	61,0 ± 15,7	66,3 ± 23,9	62,1 ± 16,9	63,5 ± 16,8	0,468	0,427
Razão Síntese/Absorção						
Latosterol/campesterol	0,95 ± 0,46	0,94 ± 0,39	0,87 ± 0,30	0,83 ± 0,30	0,279	0,056
Latosterol/sitosterol	0,83 ± 0,41	0,77 ± 0,38	0,64 ± 0,27	0,61 ± 0,28	0,004	0,000
Latosterol/colestanol	0,66 ± 0,34	0,62 ± 0,22	0,67 ± 0,23	0,63 ± 0,25	0,754	0,595
Lípidos, mmol/L						
CT	6,09 ± 1,29	6,17 ± 0,74	6,17 ± 0,75	6,12 ± 0,82	0,969	0,964
c-LDL	3,76 ± 0,69	3,95 ± 0,76	4,01 ± 0,65	3,97 ± 0,71	0,262	0,308
c-HDL	1,47 ± 0,45	1,40 ± 0,34	1,32 ± 0,30	1,41 ± 0,27	0,174	0,277
TG	2,17 ± 3,07	1,93 ± 1,46	1,81 ± 1,21	1,60 ± 0,63	0,487	0,298
Não-c-HDL	4,63 ± 1,33	4,77 ± 0,83	4,86 ± 0,76	4,71 ± 0,78	0,651	0,740
Rácios lipídicos						
CT/c-HDL	4,50 ± 1,49	4,66 ± 1,37	4,89 ± 1,11	4,49 ± 0,99	0,348	0,387
c-LDL/c-HDL	2,74 ± 0,99	2,98 ± 1,13	3,17 ± 0,83	2,92 ± 0,81	0,155	0,255
TG/c-HDL	4,19 ± 8,03	3,59 ± 3,53	3,48 ± 2,76	2,79 ± 1,45	0,546	0,334
Não-c-HDL/c-HDL	3,50 ± 1,49	3,67 ± 1,37	3,89 ± 1,10	3,49 ± 0,99	0,342	0,380

Os valores são expressos como média ± DP.

*p-value com base no teste ANOVA.

** p-value com base no teste ANOVA a partir do modelo linear geral para o IMC (índice de massa corporal).

CT, colesterol total; c-LDL, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; c-HDL, colesterol da lipoproteína de alta densidade; Não-c-HDL, colesterol não-HDL; TG, triglicerídeos.

Os nossos resultados estão de acordo com alguns dos estudos anteriores, pese embora não com todos (Matthan *et al.*, 2013), o que pode ser explicado pelo facto de existir uma grande intra e inter-variabilidade nos níveis de fitoesteróis de diferentes populações. Muita desta variabilidade pode ser atribuível ao método analítico utilizado para a determinação/quantificação desses níveis, porém também outros fatores tais como a genética, sexo, dieta e morbilidades podem estar igualmente envolvidos (Chan *et al.*, 2006).

Comparativamente aos participantes de meia-idade observou-se uma aparente atenuação da colesterogénese entre os indivíduos do último escalão etário estudado (60-65 anos), quer em termos dos NCS quer do perfil lipídico. Tal como observado por Tilvis *et al.* (2011), trata-se de um processo lógico de diminuição anabólica relacionado com o avançar da idade e que está também associado à multimorbilidade.

Embora sem significado estatístico, foi observada uma associação positiva entre a idade e as concentrações dos lípidos aterogénicos CT, c-LDL, não-c-HDL e os rácios aterogénicos CT/c-HDL e c-LDL/c-HDL, em oposição aos parâmetros TG, c-HDL e os rácios aterogénicos não-c-HDL/c-HDL e TG/c-HDL (Tabela 4.5).

Todas as diferenças observadas em termos dos estratos etários, não eram explicadas por diferenças em termos do IMC, à exceção do campesterol.

4.1.4 Marcadores séricos do metabolismo do colesterol em função de fatores de risco cardiovascular

Foram avaliadas as possíveis associações entre os marcadores séricos do metabolismo do colesterol e fatores de RCV, nomeadamente o IMC e os parâmetros lipídicos CT, c-LDL, c-HDL, TG e o não-c-HDL. Foram observadas associações estatisticamente significativas entre o IMC e as concentrações dos marcadores do colesterol, positiva no caso do latosterol ($p < 0,01$) e inversa para o campesterol e sitosterol ($p < 0,01$ e $p < 0,05$ respetivamente) (Tabela 4.6; correlações apresentadas na Tabela 4.7 – correlação positiva para o latosterol para ambos os sexos).

À semelhança de outros estudos, os nossos resultados indicam uma relação positiva de significado estatístico entre a concentração do latosterol e o IMC/peso corporal, um padrão já observado e que é considerado indicativo de uma condição de alto RCV, tal como os estados de obesidade, diabetes e síndrome metabólica (Miettinen e Gylling, 2000; Matthan *et al.*, 2013).

Tal como Matthan *et al.* (2013), observámos nos indivíduos estudados uma relação inversa entre a absorção do colesterol e os níveis de TG, assim como entre a síntese de colesterol e a concentração de c-LDL; a diminuição da síntese do colesterol relaciona-se assim negativamente com a atividade/expressão dos LDLR e portanto, positivamente com os níveis de colesterol circulantes.

No nosso estudo, observou-se uma associação negativa entre as concentrações do c-HDL e dos marcadores de síntese do colesterol (apenas no caso do sexo masculino) e positiva com os marcadores de absorção do colesterol, tal como foi igualmente reportado por Miettinen e Gylling (2000), em indivíduos obesos e hipercolesterolémicos, sem doença cardíaca.

Relativamente aos parâmetros lipídicos tradicionais (Tabela 4.6) constatou-se a existência de uma associação positiva entre o sitosterol e as concentrações de TG e de c-LDL, enquanto uma associação inversa foi observada entre os marcadores da síntese do colesterol e o c-HDL (correlações inversas no caso do sexo masculino – Tabela 4.7). Foi ainda verificada, para ambos os sexos, a existência de uma relação inversa estatisticamente significativa entre os marcadores de absorção do colesterol ($p < 0,01$ para o campesterol e o sitosterol) e os TG (correlações apresentadas na Tabela 4.7).

Tabela 4.6 - Marcadores do metabolismo do colesterol em função de fatores de risco cardiovascular (a continuar)

Variável	N	Marcadores da síntese do colesterol			Marcadores da absorção do colesterol		Razão Síntese/Absorção		
		Desmosterol	Latosterol	Campesterol	Sitosterol	Colestanol	Lat/Camp	Lat/Sit	Lat/Col
IMC (kg/m ²)									
<18,5	5	19,4 ± 5,9	30,3 ± 6,6	50,5 ± 12,6	63,0 ± 17,8	68,4 ± 7,9	0,58 ± 0,19	0,47 ± 0,10	0,42 ± 0,12
18,5 – 24,9	83	23,1 ± 5,8	35,6 ± 8,9	49,4 ± 14,1	64,8 ± 20,2	67,0 ± 19,8	0,77 ± 0,31	0,61 ± 0,26	0,56 ± 0,17
25,0 – 29,9	97	24,9 ± 9,5	39,2 ± 11,0	43,0 ± 12,8	57,4 ± 20,2	59,9 ± 18,3	0,97 ± 0,37	0,77 ± 0,38	0,71 ± 0,31
≥30,0	27	23,3 ± 4,1	42,3 ± 10,6	41,1 ± 13,6	52,3 ± 21,2	63,2 ± 17,3	1,11 ± 0,40	0,92 ± 0,41	0,73 ± 0,26
p-value*		0,244	0,004	0,003	0,020	0,079	0,000	0,000	0,000
CT (mg/dL)									
<200	20	26,8 ± 18,4	41,0 ± 14,0	43,5 ± 15,5	15,5 ± 3,5	72,6 ± 15,8	1,05 ± 0,54	0,91 ± 0,45	0,57 ± 0,19
200 - 239	103	24,8 ± 5,7	39,1 ± 10,4	47,6 ± 11,8	20,3 ± 2,0	63,4 ± 17,4	0,87 ± 0,33	0,68 ± 0,31	0,67 ± 0,29
≥240	89	22,0 ± 4,6	36,1 ± 9,1	43,4 ± 15,2	20,8 ± 2,2	61,1 ± 18,8	0,90 ± 0,38	0,72 ± 0,36	0,64 ± 0,24
p-value*		0008	0,050	0,092	0,002	0,046	0,167	0,031	0,316
c-LDL (mg/dL)**									
100 - 129	50	25,4 ± 13,5	38,2 ± 12,8	43,2 ± 12,6	55,0 ± 19,3	64,8 ± 20,2	0,94 ± 0,41	0,77 ± 0,38	0,65 ± 0,36
130 - 159	86	24,3 ± 4,7	39,8 ± 10,7	47,2 ± 12,4	64,1 ± 20,1	65,0 ± 14,9	0,90 ± 0,38	0,69 ± 0,34	0,64 ± 0,20
160 - 189	51	22,4 ± 4,0	34,6 ± 6,5	47,2 ± 17,7	60,8 ± 22,8	59,4 ± 17,9	0,81 ± 0,29	0,66 ± 0,31	0,65 ± 0,27
≥190	19	20,7 ± 3,6	37,3 ± 9,7	42,9 ± 10,6	56,2 ± 16,1	65,8 ± 31,4	0,92 ± 0,36	0,72 ± 0,30	0,62 ± 0,23
p-value*		0,154	0,106	0,109	0,021	0,308	0,052	0,015	0,703

*p-value com base no teste ANOVA.

** Os valores *missing* em c-LDL dizem respeito aos indivíduos em que não foi possível calcular a concentração de c-LDL devido a valores de TG >400 mg/dL (>4,5 mmol/L).

IMC, índice de massa corporal; CT, colesterol total; c-LDL, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; c-HDL, colesterol da lipoproteína de alta densidade; TG, triglicerídeos.

Tabela 4.6 - Marcadores do metabolismo do colesterol em função de fatores de risco cardiovascular (continuação)

Variável	N	Marcadores da síntese do colesterol		Marcadores da absorção do colesterol			Razão Síntese/Absorção		
		Desmosterol	Latosterol	Campesterol	Sitosterol	Colestanol	Lat/Camp	Lat/Sit	Lat/Col
c-HDL (mg/dL)									
<40	26	25,2 ± 4,5	43,7 ± 15,1	45,2 ± 12,8	59,3 ± 21,3	67,7 ± 26,4	1,09 ± 0,60	0,88 ± 0,57	0,68 ± 0,23
40 - 59	117	24,6 ± 9,1	39,1 ± 9,2	43,0 ± 12,3	57,1 ± 19,0	62,4 ± 18,1	0,97 ± 0,33	0,77 ± 0,33	0,68 ± 0,24
≥60	69	21,9 ± 7,6	34,1 ± 8,7	49,6 ± 15,6	64,5 ± 22,5	63,1 ± 16,6	0,72 ± 0,26	0,58 ± 0,22	0,58 ± 0,30
p-value*		0,042	0,000	0,007	0,059	0,433	0,000	0,000	0,028
TG (mg/dL)									
<150	131	23,9 ± 8,9	36,8 ± 9,6	47,5 ± 13,8	62,2 ± 20,6	63,4 ± 16,9	0,83 ± 0,33	0,66 ± 0,29	0,62 ± 0,27
150 - 199	38	22,7 ± 4,9	38,8 ± 11,7	42,9 ± 15,1	55,1 ± 20,2	59,0 ± 17,4	0,97 ± 0,39	0,79 ± 0,39	0,72 ± 0,27
200 - 499	38	24,4 ± 5,3	40,9 ± 11,4	42,4 ± 11,4	58,7 ± 20,1	67,5 ± 24,5	1,04 ± 0,42	0,80 ± 0,40	0,65 ± 0,22
≥500	5	26,3 ± 3,8	41,4 ± 9,7	33,8 ± 7,5	38,7 ± 14,3	60,8 ± 26,2	1,29 ± 0,46	1,19 ± 0,57	0,76 ± 0,29
p-value*		0,688	0,140	0,021	0,027	0,266	0,000	0,001	0,207
Não-c-HDL (mg/dL)									
<130	4	25,1 ± 6,6	36,6 ± 5,7	61,9 ± 15,6	67,7 ± 24,3	82,7 ± 10,9	0,62 ± 0,14	0,58 ± 0,14	0,45 ± 0,11
130 - 159	47	25,7 ± 13,4	37,0 ± 12,2	44,9 ± 10,9	58,3 ± 17,9	65,1 ± 18,7	0,87 ± 0,42	0,70 ± 0,38	0,62 ± 0,36
160 - 189	84	23,5 ± 4,9	39,5 ± 10,8	47,6 ± 15,1	63,8 ± 22,9	64,6 ± 16,3	0,89 ± 0,36	0,70 ± 0,33	0,64 ± 0,20
≥190	77	23,0 ± 4,4	37,1 ± 8,7	42,5 ± 12,9	55,7 ± 18,8	59,8 ± 21,0	0,95 ± 0,36	0,76 ± 0,37	0,68 ± 0,25
p-value*		0,270	0,433	0,009	0,071	0,051	0,295	0,593	0,243

*p-value com base no teste ANOVA.

** Os valores *missing* em c-LDL dizem respeito aos indivíduos em que não foi possível calcular a concentração de c-LDL devido a valores de TG >400 mg/dL (>4,5 mmol/L).

IMC, índice de massa corporal; CT, colesterol total; c-LDL, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; c-HDL, colesterol da lipoproteína de alta densidade; TG, triglicerídeos.

Com base nas associações determinadas entre os marcadores do metabolismo do colesterol e os diferentes fatores de RCV, foram ainda estudadas as correlações (grau de associação). Foram sumariadas na Tabela 4.7 as correlações mais importantes, apesar de fracas a moderadas. Destacam-se as seguintes correlações: positiva para ambos os sexos – entre o latosterol e o IMC, o sitosterol e a idade e entre o sitosterol e o número de refeições de peixes azuis. É bem sabido que os peixes azuis são ricos em ácidos gordos polinsaturados ómega 3, os quais exercem um efeito (dose-resposta) benéfico sobre o perfil lipídico, comprovado especialmente na redução da concentração de TG, mas também no aumento do c-HDL. Cooney *et al.* (2009) evidenciaram o efeito cardioprotetor do c-HDL em ambos os sexos, em qualquer estrato etário e para diferentes níveis de RCV.

Demonty *et al.* (2006) demonstraram que a combinação de fitoesteróis com ómega 3 tem um efeito aditivo sobre a melhoria dos níveis lipídicos circulantes de indivíduos dislipidémicos.

Tabela 4.7 - Correlações entre os marcadores do metabolismo do colesterol e fatores de RCV

Homens (N=100)	Idade †	IMC †	c-LDL †	c-HDL †	TG †	TG/c-HDL †	Nº refeições peixes azuis †
Marcadores da síntese do colesterol							
Desmosterol	0,164	0,065	- 0,345**	- 0,098	0,130	0,131	- 0,031
Latosterol	- 0,139	0,270**	- 0,121	- 0,324**	0,089	0,151	- 0,145
Marcadores da absorção do colesterol							
Campesterol	0,132	- 0,186	- 0,066	0,085	- 0,199*	- 0,173	0,132
Sitosterol	0,261**	- 0,136	- 0,081	0,075	- 0,201*	- 0,181	0,308**
Colestanol	0,006	- 0,103	0,032	0,002	- 0,099	- 0,073	- 0,120
Razão Síntese/Absorção							
Latosterol/campesterol	- 0,190	0,319**	- 0,028	- 0,290**	0,240	0,273**	- 0,217**
Latosterol/sitosterol	- 0,259**	0,263*	- 0,045	- 0,272**	0,297**	0,334**	- 0,335**
Latosterol/colestanol	0,004	0,270**	- 0,012	- 0,243*	0,173	0,197*	0,062
Mulheres (N=112)	Idade †	IMC †	c-LDL †	c-HDL †	TG †	TG/c-HDL †	Nº refeições peixes azuis †
Marcadores da síntese do colesterol							
Desmosterol	0,043	0,054	0,133	- 0,188	- 0,060	0,007	- 0,174
Latosterol	0,152	0,244**	- 0,137	- 0,182	0,123	0,124	- 0,183
Marcadores da absorção do colesterol							
Campesterol	0,152	- 0,203*	0,022	0,113	- 0,267**	- 0,247**	0,118
Sitosterol	0,353**	- 0,119	0,054	0,053	- 0,192*	- 0,178	0,201**
Colestanol	0,038	- 0,167	- 0,091	0,010	- 0,140	- 0,141	- 0,148
Razão Síntese/Absorção							
Latosterol/campesterol	- 0,012	0,340**	- 0,129	- 0,230*	0,299**	0,293**	- 0,247**
Latosterol/sitosterol	- 0,196*	0,269*	- 0,139	- 0,176	0,238*	0,226*	- 0,340**
Latosterol/colestanol	0,026	0,312**	- 0,088	- 0,067	0,121	0,120	- 0,001

† Coeficiente de correlação de Pearson; * P<0,05; ** P<0,01

IMC, índice de massa corporal; c-LDL, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; c-HDL, colesterol da lipoproteína de alta densidade; TG, triglicédeos; RCV, risco cardiovascular

4.1.5 Caracterização com base nos perfis de metabolismo do colesterol

Para a caracterização dos perfis de metabolismo do colesterol na população de estudo 1, efetuou-se a categorização dos indivíduos (em função do sexo) em perfis de absorção ou de síntese do colesterol (Tabela 4.8), a qual resultou da distribuição/classificação dos participantes em relação à mediana do rácio das concentrações normalizadas de latosterol ($37,8 \cdot 10^2$ mmol/mol de colesterol) e de sitosterol ($61,5 \cdot 10^2$ mmol/mol de colesterol), consoante estes apresentem um valor superior ou inferior.

Os participantes foram assim distribuídos em quatro grupos, com base nos respetivos valores dos referidos marcadores do metabolismo do colesterol (refletindo a homeostasia do colesterol):

- a) GRUPO 1 (N=55), síntese baixa/absorção baixa (60,0% mulheres);
- b) GRUPO 2 (N=56), síntese elevada/absorção elevada (51,8% mulheres);
- c) GRUPO 3 (N=51), síntese elevada/absorção baixa (70,6% homens);
- d) GRUPO 4 (N=50), síntese baixa/absorção elevada (70,0% mulheres).

Tabela 4.8 - Distribuição por perfis de metabolismo do colesterol

Variável	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
	SINT ↓	SINT ↑	SINT ↑	SINT ↓
	ABS ↓	ABS ↑	ABS ↓	ABS ↑
Mulheres	33 (60,0 %)	29 (51,8 %)	15 (29,4 %)	35 (70,0 %)
Homens	22 (40,0 %)	27 (48,2 %)	36 (70,6 %)	15 (30,0 %)
N/212	55 (25,9 %)	56 (26,4 %)	51 (24,1 %)	50 (23,6 %)
<i>p-value</i>	0,138	0,686	0,003	0,005

p-value com base no teste ANOVA.
ABS, Absorção do colesterol; SINT, Síntese do colesterol

Podemos destacar que foram observadas diferenças entre homens e mulheres, com significado estatístico apenas nos Grupos 3 e 4 ($p < 0,01$), tendo as mulheres uma maior expressão no perfil de metabolismo do colesterol síntese baixa/absorção alta (Grupo 4). Podemos assim dizer que o Grupo 4 inclui indivíduos que provavelmente respondem de forma lenta (ou não respondem) a monoterapia com estatinas, mas que potencialmente respondem bem a agentes com ação sobre a absorção do colesterol, como por exemplo o ezetimibe ou

matrizes enriquecidas com PS. Por outro lado, os homens apresentam-se maioritariamente representados no Grupo 3, o qual inclui indivíduos com taxas elevadas de síntese e taxas baixas de absorção gastrointestinal de colesterol, respondendo bem a estatinas.

A evidência existente sugere que alguns indivíduos em monoterapia com estatinas não conseguem atingir o valor alvo recomendado, daí resultando um RCV residual, situação que pode advir do facto de as estatinas causarem um aumento dos níveis de absorção do colesterol por compensação homeostática, o que eleva o risco particularmente em indivíduos que exibem uma taxa elevada de absorção. Face ao uso generalizado das estatinas, esta situação pode tornar-se preocupante (Goldstein *et al.*, 2008). Nesse sentido, o estudo prévio do perfil de metabolismo do colesterol preconizado neste estudo, poderá ser uma mais-valia na otimização da terapêutica.

Os Grupos 1 e 2 estão representados por indivíduos com um perfil misto, os quais deverão exibir uma resposta de grau intermédio à monoterapia, sendo portanto expectável que beneficiem de terapêuticas combinadas.

Foram ainda estudadas as eventuais associações existentes entre os 4 perfis de metabolismo do colesterol e fatores de RCV (Tabela 4.9), tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas com a idade, IMC e c-HDL ($p < 0,001$), bem como com os rácios aterogénicos ($p < 0,01$). Verifica-se que os grupos 2 e 4 incluem os indivíduos de idade mais elevada, sendo os grupos associados a uma maior taxa de absorção. O grupo 3 inclui aqueles com maior IMC, níveis mais elevados de lípidos e dos rácios lipídicos aterogénicos, bem como os valores mais baixos de c-HDL, fatores de risco que evidenciam uma tendência para a condição de obesidade, diabetes e prevalência da síndrome metabólica.

Cofán *et al* (2011) concluíram que os indivíduos dislipidémicos exibem uma maior tendência para desenvolver os componentes da síndrome metabólica do que indivíduos saudáveis, e que, nos dislipidémicos, é maior a prevalência da síndrome metabólica nos homens do que nas mulheres, o que vem reforçar os nossos resultados.

Miettinen e Gylling (2003) mostraram a existência de uma associação entre os níveis crescentes de latosterol e decrescentes de sitosterol com os componentes (obesidade visceral, pressão arterial elevada, concentrações elevadas de glucose e de TG, concentração baixa de c-HDL) da síndrome metabólica, em indivíduos dislipidémicos não tratados, confirmando o impacte negativo que a obesidade, a diabetes e a síndrome metabólica têm sobre a homeostasia do colesterol.

Tabela 4.9 - Perfis de metabolismo do colesterol e fatores de RCV

Variável	Grupo 1 (N=55)	Grupo 2 (N=56)	Grupo 3 (N=51)	Grupo 4 (N=50)	p-value*
Idade (anos)	43,6 ± 11,4	50,5 ± 8,9	46,1 ± 10,4	54,4 ± 9,3	0,000
IMC (kg/m ²)	25,2 ± 3,5	26,9 ± 3,9	28,2 ± 3,8	24,4 ± 2,8	0,000
Lípidos (mmol/L)					
CT	6,29 ± 1,33	6,01 ± 0,61	6,07 ± 0,88	6,15 ± 0,71	0,426
c-LDL	3,90 ± 0,71	3,83 ± 0,62	3,99 ± 0,95	3,98 ± 0,76	0,603
c-HDL	1,52 ± 0,39	1,35 ± 0,33	1,23 ± 0,25	1,49 ± 0,35	0,000
TG	1,76 ± 1,60	1,88 ± 1,31	2,41 ± 3,04	1,52 ± 0,78	0,107
Não-c-HDL	4,77 ± 1,34	4,65 ± 0,69	4,85 ± 0,96	4,68 ± 0,69	0,737
Rácios lipídicos					
CT/c-HDL	4,39 ± 1,35	4,66 ± 1,09	5,18 ± 1,49	4,33 ± 0,97	0,002
c-LDL/c-HDL	2,75 ± 0,99	2,95 ± 0,83	3,33 ± 1,18	2,80 ± 0,73	0,011
TG/c-HDL	2,89 ± 2,63	3,54 ± 2,97	5,17 ± 8,47	2,63 ± 1,84	0,031
Não-c-HDL/c-HDL	3,39 ± 1,35	3,66 ± 1,09	4,18 ± 1,49	3,33 ± 0,97	0,002

Os valores são expressos como média ± DP.

*p-value com base no teste ANOVA.

IMC, índice de massa corporal; CT, colesterol total; c-LDL, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; c-HDL, colesterol da lipoproteína de alta densidade; Não-c-HDL, colesterol não-HDL; TG, triglicéridos; RCV, risco cardiovascular.

Por último, o Grupo 4, que se caracteriza por níveis mais elevados de fitoesteróis séricos, pode dizer-se corresponder a um perfil associado a uma menor tendência para um *cluster* de fatores de risco metabólicos.

Em suma, a novidade deste estudo, para além de se tratar de um estudo pioneiro no nosso país, reside no facto de ser o primeiro estudo em que é feita a categorização dos perfis de metabolismo do colesterol na população portuguesa hipercolesterolémica não tratada, tendo por base os marcadores séricos da síntese e da absorção do colesterol. Por esta razão podemos afirmar que o objetivo foi concretizado.

Relativamente às limitações, apesar do número de indivíduos estudados corresponder a uma amostra representativa do ponto de vista estatístico da população da região Centro de Portugal, não podemos dizer que se trata de um estudo populacional. Por outro lado, um viés de seleção pode ter sido cometido, uma vez que o recrutamento/convite à participação no estudo foi feito por via telefónica. Para além de os dados serem auto-reportados pelos participantes no que diz respeito à caracterização (clínica e de estilos de vida) de base, as associações observadas podem ter sido influenciadas por fatores que não foram controlados, tais como por exemplo a variabilidade genética, a dieta em geral e o teor em PS da dieta em

particular (o qual não foi quantificado), o nível de exercício/atividade física, os fármacos em toma para o tratamento de comorbilidades.

Chan *et al.* (2006) apontaram diversos fatores tais como a idade, o sexo, a genética, a dieta, as comorbilidades e os agentes farmacológicos como influenciadores da estimativa dos níveis circulantes de NCS. Os referidos autores estimaram o contributo dos diferentes fatores, tal como se descreve seguidamente: 1) Metodologia analítica (22,5%); 2) Sexo (20,4%); 3) Diabetes mellitus e síndrome metabólica (16,1%); 4) Fenótipo ApoE (14,8%); 5) Fatores desconhecidos (14,4%); 6) Fenótipo ABCG5/G8 (7,8%); 7) Ingestão diária de PS (4,0%).

Em termos de pontos fortes deste estudo, a categorização dos indivíduos, classificando-os como tendo taxas de absorção gastrointestinal altas, intermédias ou baixas (e as taxas opostas de síntese hepática de colesterol) pode contribuir para a avaliação do correspondente nível de RCV e para a seleção ou monitorização de uma terapêutica hipocolesterolemiantes adequada a cada perfil, que se traduzirá pelo benefício da medicação prescrita, adicionando potencial translacional a este estudo.

4.2 ESTUDO 2

Os resultados do Estudo 2 foram alvo de publicação sob a forma de artigo original em revista científica internacional (ver Anexo 3.3). Este capítulo diz assim respeito a essa publicação científica.

4.2.1 Caracterização da população de estudo

A Tabela 4.10 contém a caracterização de base dos participantes do Estudo 2.

Catorze mulheres (45,2%) e um homem eram obesos. Aproximadamente 75% dos participantes tomavam estatinas lipofílicas de potência moderada; destes, a maioria (n=20) tomava sinvastatina, enquanto seis indivíduos tomavam atorvastatina. Os restantes tomavam pravastatina ou rosuvastatina. A grande maioria dos indivíduos fazia a toma da estatina na refeição do jantar, com a exceção de apenas três ao pequeno-almoço. Mais de 85% dos participantes faziam medicação dedicada ao tratamento de alterações do sistema cardiovascular, relacionadas com a idade, tais como isquémicas, hipertensivas e valvulares. No que se refere ao perfil lipídico basal, 68,6% dos doentes tinham uma concentração de c-LDL

<100 mg/dL e em média, os níveis de c-HDL variavam entre 40 e 50 mg/dL enquanto os TG eram inferiores a 150 mg/dL (Tabela 4.11).

Não se observaram diferenças significativas em termos do IMC ao longo de todo o estudo, em nenhum dos participantes, nem foram reportados efeitos secundários resultantes da intervenção com 2 g/ dia PS-FM. Nenhum participante desistiu do estudo.

Tabela 4.10 - Características dos participantes

Variável	Total (N=35)
Idade (anos)	81 ± 8
Mulheres	31 (88,6)
IMC (kg/m ²)	29,9 ± 6,0
Hipertensão	31 (88,6)
Diabetes	12 (34,3)
Acidente vascular cerebral	5 (14,3)
Doença arterial periférica	1 (2,9)
Enfarte do miocárdio	2 (5,7)
Estatina	
Lipofílica	26 (74,3)
Hidrofílica	9 (25,7)
Medicação concomitante	
Aspirina	13 (37,1)
ACEI ou ARB	20 (57,1)
Beta bloqueador	10 (28,6)
Bloqueador do canal de cálcio	6 (17,1)
Diuréticos	14 (40,0)
Fármacos antidiabéticos orais	12 (34,3)
Insulina	3 (8,6)

Os resultados são expressos como média±DP ou N (%).
 IMC, índice de massa corporal; ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitor/inibidor da enzima de conversão da angiotensina; ARB, angiotensin II receptor blocker/bloqueador do recetor da angiotensina

4.2.2 Efeito da intervenção com PS-FM sobre os marcadores do metabolismo do colesterol e o perfil lipídico

A Tabela 4.11 resume a variação observada (valor absoluto) nas concentrações dos parâmetros lipídicos tradicionais e dos NCS, resultante da intervenção, tendo sido calculada por subtração entre os níveis basais e os níveis pós-tratamento. O efeito máximo foi observado ao fim do segundo período de 3 semanas (t₂) de ingestão do PS-FM.

O consumo de 2 g/dia de PS-FM traduziu-se por uma redução dos níveis séricos de CT, c-LDL e TG ($p < 0,05$ para o c-LDL) relativamente aos níveis basais. A redução de c-LDL foi de 5,8 mg/dL e 10,4 mg/dL (0,15 mmol/L e 0,27 mmol/L) respetivamente após 3 e 6 semanas de toma do PS-FM. Observou-se ainda uma diminuição significativa dos rácios aterogénicos, CT/c-HDL e c-LDL/c-HDL, ao fim de t1 e t2 ($p < 0,001$). A concentração média de c-HDL aumentou durante a intervenção, mas sem significado estatístico (Tabela 4.11).

No presente estudo, após os dois períodos consecutivos de 3 semanas de intervenção, a redução em c-LDL confirmou o efeito hipocolesterolemiante da toma de 2 g/dia PS-FM em combinação com uma estatina, em indivíduos idosos com níveis basais de c-LDL < 130 mg/dL ($< 3,35$ mmol/L).

Tabela 4.11 - Efeito da intervenção sobre os marcadores do metabolismo do colesterol e perfil lipídico

Variável	t ₀ Basal	t ₁ 3 semanas	(0 - 1)	p-value*	t ₂ 6 semanas	(0 - 2)	p-value*	t ₃ Washout	(0 - 3)	p-value*
Marcadores da síntese do colesterol *10 ² mmol/mol colesterol										
Desmosterol	7,8 ± 8,6	8,9 ± 8,5	1,0 ± 1,4	0,001	9,9 ± 9,3	1,9 ± 1,6	0,000	12,4 ± 19,4	3,8 ± 9,6	NS
Latosterol	8,5 ± 3,7	9,5 ± 4,5	0,8 ± 1,9	NS	12,2 ± 5,9	2,8 ± 4,3	0,000	10,9 ± 4,9	1,9 ± 3,8	0,002
Marcadores da absorção do colesterol *10 ² mmol/mol colesterol										
Campesterol	28,3 ± 18,7	40,5 ± 18,8	7,8 ± 14,8	0,000	46,6 ± 21,2	20,5 ± 14,7	0,000	34,9 ± 20,8	6,4 ± 6,1	0,000
Sitosterol	23,6 ± 14,7	35,4 ± 16,9	11,5 ± 7,0	0,000	40,4 ± 18,9	19,9 ± 19,1	0,000	29,7 ± 17,4	6,0 ± 5,7	0,000
Colestanol	89,2 ± 25,4	82,3 ± 32,2	- 3,3 ± 41,8	NS	89,8 ± 29,7	- 2,1 ± 39,9	NS	97,2 ± 29,3	13,5 ± 24,9	NS
Razão Síntese/Absorção										
Latosterol/campesterol	0,44 ± 0,37	0,28 ± 0,18	- 0,15 ± 0,23	0,015	0,32 ± 0,22	- 0,16 ± 0,29	NS	0,42 ± 0,31	- 0,04 ± 0,24	NS
Latosterol/sitosterol	0,51 ± 0,38	0,32 ± 0,21	- 0,18 ± 0,22	0,003	0,38 ± 0,26	- 0,19 ± 0,34	0,05	0,49 ± 0,36	- 0,05 ± 0,30	NS
Latosterol/colestanol	0,13 ± 0,13	0,15 ± 0,11	0,01 ± 0,13	NS	0,16 ± 0,10	0,05 ± 0,19	NS	0,16 ± 0,24	- 0,009 ± 0,10	NS
Lípidos (mmol/L)										
CT	4,31 ± 0,48	4,15 ± 0,45	- 0,15 ± 0,47	NS	4,12 ± 0,51	- 0,22 ± 0,49	NS	4,41 ± 0,65	0,004 ± 0,56	NS
c-LDL	2,37 ± 0,45	2,20 ± 0,41	- 0,15 ± 0,31	0,041	2,14 ± 0,44	- 0,27 ± 0,38	0,020	2,39 ± 0,51	- 0,035 ± 0,45	NS
c-HDL	1,26 ± 0,33	1,29 ± 0,29	0,03 ± 0,13	NS	1,34 ± 0,37	0,09 ± 0,21	NS	1,33 ± 0,37	0,04 ± 0,17	NS
TG	1,48 ± 0,44	1,45 ± 0,42	- 0,07 ± 0,41	NS	1,40 ± 0,42	- 1,25 ± 0,39	NS	1,50 ± 0,33	0,005 ± 0,33	NS
Rácios lipídicos										
CT/c-HDL	3,57 ± 0,73	3,33 ± 0,63	- 0,23 ± 0,34	0,009	3,21 ± 0,61	- 0,42 ± 0,43	0,000	3,46 ± 0,71	- 0,08 ± 0,49	NS
c-LDL/c-HDL	1,99 ± 0,56	1,78 ± 0,47	- 0,19 ± 0,23	0,001	1,69 ± 0,48	- 0,33 ± 0,29	0,000	1,89 ± 0,53	- 0,08 ± 0,40	NS

Os resultados são expressos como média±DP.

* p-value calculado a partir do modelo linear geral com análise ANOVA e teste post-hoc de Bonferroni.

CT, colesterol total; c-LDL, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; c-HDL, colesterol da lipoproteína de alta densidade; TG, triglicerídeos.

Scholle *et al.* (2009) desenvolveram uma meta-análise baseada em oito RCT (N=306 doentes) em que caracterizaram o efeito de PS sobre os níveis séricos lipídicos de indivíduos hipercolesterolémicos tratados com estatinas (c-LDL entre 130 mg/dL e 190 mg/dL; 3,35 mmol/L e 4,90 mmol/L), tendo sido concluído por estes autores que a terapêutica combinada PS+estatinas reduziu significativamente as concentrações de c-LDL (-13,26 mg/dL ou -0,34 mmol/L; $p < 0,001$), mas não afetou os níveis de c-HDL ou de TG. Também no nosso caso, a variação observada nos níveis de c-HDL e TG face aos níveis basais não teve significado estatístico.

No nosso estudo, apesar da redução significativa em c-LDL, houve uma considerável variabilidade em termos da diferença observada nas concentrações de lípidos e NCS face aos valores basais, provavelmente devida às diferentes respostas farmacocinéticas e farmacodinâmicas de cada indivíduo estudado, *i.e.* à variabilidade farmacogenética.

McAuley *et al.* (2012) demonstraram, com base num modelo matemático, que dos dois principais mecanismos que têm sido apontados como estando na origem da desregulação do metabolismo do colesterol, com o avançar da idade – 1) alterações da absorção do colesterol e 2) alterações na taxa de remoção do c-LDL da circulação sanguínea/redução da expressão do LDLR, são as alterações no segundo mecanismo que têm um impacto mais significativo sobre o metabolismo, e sobretudo, pequenas alterações no número de LDLR podem resultar num aumento significativo da concentração de c-LDL. Estes autores concluíram que um aumento da taxa de absorção intestinal do colesterol de 50% para 80% (aos 65 anos de idade) pode resultar num aumento de até 34 mg/dL de c-LDL; por outro lado, a diminuição da taxa de *clearance* hepática do c-LDL gradualmente até 50% (aos 65 anos de idade) pode traduzir-se num aumento da concentração de c-LDL até 116 mg/dL.

Relativamente aos NCS, começando pelos marcadores de absorção do colesterol, verificou-se um aumento dos níveis séricos de campesterol e sitosterol ($p < 0,001$): os valores basais (valores normalizados para o colesterol) de $28,3 \pm 18,7$ e $23,6 \pm 14,7 \cdot 10^2$ mmol/mol de colesterol aumentaram para $46,6 \pm 21,2$ e $40,4 \pm 18,9 \cdot 10^2$ mmol/L de colesterol, respetivamente após 6 semanas de intervenção, contribuindo para a inibição da absorção do colesterol. Vários mecanismos moleculares têm sido propostos para explicação desse efeito hipocolesterolemizante, embora ainda não estejam totalmente esclarecidos em humanos. Por outro lado têm sido atribuídos efeitos aterogénicos aos PS, principalmente porque indivíduos com fitosterolemia/sitosterolemia têm risco elevado de desenvolver aterosclerose. Uma vez que permanece ainda insuficientemente esclarecido o impacto de concentrações elevadas de PS sobre o RCV, Genser *et al.* (2012) realizaram uma revisão sistemática com meta-análise (17 estudos; N=11182 indivíduos) para analisar a associação entre concentrações moderadamente

elevadas de campesterol e sitosterol e DCV. O estudo não revelou qualquer evidência de associação existente.

Também há que referir que numa intervenção dietética com PS, tal como foi apontado por Miettinen *et al.* (2011) e Mackay e Jones (2012), os níveis séricos de PS não refletem apenas a absorção de colesterol, mas também a ingestão dos PS, pelo que não devem ser utilizados como marcadores da absorção do colesterol. Em alternativa, durante a toma de alimentos enriquecidos com PS ou de suplementos, o colestanol pode ser usado como marcador da absorção do colesterol, pois, por um lado, não faz parte da composição das preparações de PS e por outro, porque vários estudos comprovaram a existência de uma associação entre os níveis séricos de colestanol (normalizado ao colesterol) e a absorção do colesterol (Miettinen *et al.*, 1989; Miettinen *et al.*, 1990; Jakulj *et al.*, 2013).

No nosso estudo, os níveis médios de colestanol diminuíram durante t1 e t2, em consequência da inibição da absorção do colesterol pelos PS. Embora essa redução não tenha tido significado estatístico, os participantes do estudo tinham níveis basais baixos de hipercolesterolemia e provavelmente, a inclusão de indivíduos com hipercolesterolemia moderada ou elevada teria resultado numa variação entre os níveis basais de colestanol e os níveis pós-tratamento muito mais pronunciada.

Relativamente aos precursores do colesterol, desmosterol e latosterol, comparativamente aos níveis basais, observou-se um aumento após t1 ($p < 0,01$ para o desmosterol) e após t2 ($p < 0,001$ para ambos).

Apesar de o latosterol ter sido apontado por Nissinen e colaboradores (2008) como sendo o marcador de síntese do colesterol mais fiável, no nosso estudo, apenas se verificou significado estatístico ao fim do período de intervenção t1, para o desmosterol. Esta situação poderá resultar do facto de um dos participantes ter exibido níveis elevados de desmosterol comparativamente aos restantes indivíduos, em cerca de 8,7 vezes superiores à média.

Waterham *et al.* (2001) observaram que indivíduos com níveis elevados de desmosterol, no plasma, tecidos e em células em cultura, eram portadores de uma deficiência na enzima 3β -hidroxiesterol-delta-24 redutase (DHCR24), a qual cataliza a redução da ligação dupla delta-24 em intermediários da biosíntese do colesterol.

No nosso estudo, a concentração média dos dois marcadores da síntese do colesterol continuou a aumentar após t1, observando-se assim um aumento dos respetivos níveis ao fim de t2 comparativamente a t0. A supressão da absorção do colesterol pelos PS traduziu-se por uma diminuição dos níveis circulantes de colesterol. Em resultado, a retroalimentação negativa do colesterol sobre a HMG-CoA redutase é inibida, levando a um aumento na síntese de colesterol. Assim, a elevação observada dos níveis séricos dos precursores do colesterol,

desmosterol e latosterol, relativamente aos níveis basais, é o resultado recíproco da intervenção com PS, baseado no facto de que ocorre uma sobre-regulação do mecanismo oposto, numa provável compensação homeostática do metabolismo do colesterol.

Ainda e quanto ao *washout*, a diferença observada entre os níveis dos NCS e parâmetros lipídicos entre o *washout* e os níveis basais (0-3) não teve significado estatístico, à exceção do latosterol ($p < 0,01$), campesterol e sitosterol ($p < 0,001$), indicando que provavelmente teria sido necessário prolongar a duração do período de *washout* para além das 6 semanas.

Foram ainda estudadas as correlações entre as variações observadas dos NCS e do c-LDL (valores absolutos). Observaram-se associações positivas (correlação moderada a forte) com a variação concomitante de c-LDL, para o desmosterol (0-1 e 0-2) e o colestanol (0-2) (Tabela 4.12).

Tabela 4.12 – Correlações entre a variação das concentrações de NCS e de c-LDL com o tratamento de PS-FM (N=35) *

NCS (Δ)	Δ c-LDL (0-1)		Δ c-LDL (0-2)	
	r	P	r	P
Desmosterol	0,452**	0,011	0,533**	0,002
Latosterol	0,237	NS	0,148	NS
Campesterol	0,159	NS	0,024	NS
Sitosterol	0,159	NS	0,027	NS
Colestanol	0,088	NS	0,602**	0,000

* Coeficiente de correlação de Pearson; ** $p < 0,01$
c-LDL, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; NCS, esteróis não colesterolémicos; NS, não significativo estatisticamente.

Diversos estudos têm sido publicados relatando a determinação dos marcadores de absorção e síntese do colesterol para analisar o efeito de diferentes alimentos suplementados com fitoesteróis (margarina, leite, queijo, iogurte sólido, leite fermentado, sumo de laranja) em indivíduos dislipidémicos não tratados (com c-LDL basal entre 130 mg/dL e 190 mg/dL), assim como o efeito de terapêuticas combinadas com estatinas, como por exemplo ezetimibe ou fitoesteróis.

Não obstante e tanto quanto sabemos, este nosso estudo será o primeiro estudo em idosos hipercolesterolémicos, com c-LDL ≤ 130 mg/dL, tratados com estatinas em combinação com PS-FM, o qual vem contribuir para aumentar o número de estudos dedicados a indivíduos idosos com esta patologia.

De facto ao efetuar-se uma pesquisa rápida na base de dados PubMed usando como termos de pesquisa “Hypercholesterolemia” versus “Hypercholesterolemia AND Aging”, pode concluir-

se o quão reduzido é o número de estudos dedicados a indivíduos com mais de 65 anos de idade (Tabela 4.13).

Tabela 4.13 - Estudos dedicados a agentes hipocolesterolêmicos e idosos

Agentes	Número de artigos publicados na PubMed (termo de pesquisa)		%
	<i>Hypercholesterolemia</i> (N=21769)	<i>Hypercholesterolemia and aging</i> (N=821)	
Estatinas	6315	89	1,4
Fibratos	874	8	0,9
Ezetimibe	730	7	1,0
Fitosteróis (PS)	563	5	1,0
Niacina	409	8	2,0
PCSK9	355	2	0,6
Ácidos gordos ómega 3	259	13	5,0
Flavonóides	254	5	2,0
Resina sequestrante	129	2	1,6
Estatinas + PS	115	1	0,9
Estatinas+Ezetimibe	532	4	0,8

O único estudo publicado até à data, de associação estatinas+PS em idosos, refere-se a indivíduos com c-LDL entre 130 e 190 mg/dL (Tilvis *et al.*, 2011) (Tabela 4.13).

Mais ainda, este sub-grupo de doentes, os idosos, não se encontra muitas vezes adequadamente representado nos ensaios clínicos, de forma a garantir que os resultados se lhes aplicam igualmente.

Em termos gerais, os doentes idosos absorvem os fármacos de forma semelhante aos mais jovens, ocorrendo as principais diferenças em termos de farmacocinética, sobretudo na distribuição e eliminação. Apesar de quer a concentração quer a ligação às proteínas plasmáticas não se alterar significativamente com a idade, diversas modificações fisiológicas ocorrem com o avançar da idade que podem exercer influência no processo farmacocinético, nomeadamente: a) substituição do músculo magro por gordura (mesmo sem ganho de peso), fenómeno que afeta o volume de distribuição dos fármacos e a sua semivida; b) modificações na atividade enzimática salivar, hepática e pancreática; c) hipocloridria e acloridria frequentes; d) tendência para a diminuição da tolerância à glicose; e) diminuição do fluxo sanguíneo e da massa hepática; f) redução do fluxo sanguíneo renal e velocidade de filtração glomerular, mesmo na ausência de doença renal (Moura e Reyes, 2002). Adicionalmente pode haver

alteração da sensibilidade dos órgãos-alvo a determinadas concentrações de fármacos (farmacodinâmica), o que pode provocar quer o aumento quer a diminuição do efeito em concentrações plasmáticas semelhantes. Os idosos podem ser propensos a variações dos picos de concentração e semivida dos fármacos.

Mais ainda, as reações adversas aos fármacos parecem ocorrer com frequência nos idosos (especialmente naqueles que se encontram institucionalizados), refletindo muito provavelmente o facto de estes tomarem muitos fármacos diferentes ao mesmo tempo. Adicionalmente, os fármacos podem interferir no estado nutricional: a má absorção primária resulta dos efeitos diretos sobre a mucosa ou o processo intraluminal; a má absorção secundária é causada pelo estado fisiológico deficitário, pela interferência do fármaco sobre o metabolismo de um nutriente, que pela sua deficiência poderá ocasionar a má absorção de outros (Ferry *et al.*, 2004).

O risco de má nutrição eleva-se consideravelmente com o avanço da idade, porém nos idosos participantes no nosso estudo era atendida a satisfação do equilíbrio nutricional (e as necessidades nutricionais fisiológicas) pelas instituições geriátricas onde se encontravam institucionalizados.

Os idosos do nosso estudo de intervenção efetuaram a toma diária (ao almoço) de um leite fermentado aromatizado (com adição de PS). Comumente é considerado que a fermentação pode melhorar a digestibilidade de alimentos e produzir vitaminas e co-fatores nos produtos alimentícios. Por outro lado, os fermentos lácticos vivos podem ter efeitos benéficos (nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos) na saúde do hospedeiro ao influenciar a composição da microbiota comensal, estimulando a motilidade intestinal, a melhor absorção de certos nutrientes, a melhor utilização de lactose e o alívio dos sintomas de intolerância a esse açúcar, a modulação do sistema imunológico pelo estímulo da produção de anticorpos e da atividade fagocítica contra patógenos intestinais e noutros tecidos, além da exclusão competitiva e da produção de compostos antimicrobianos (Oliveira *et al.*, 2002).

Não obstante os efeitos benéficos na saúde da toma do leite fermentado com PS, há que destacar o seu custo comercial, razão pela qual este agente hipolipemiante não-farmacológico poderá não estar acessível a todos os indivíduos (idosos). Porém cada vez mais se expande o mercado dos alimentos funcionais com alegações de saúde, aumentando a probabilidade do seu consumo.

Em termos de pontos fortes deste estudo, porque os participantes do estudo não residem na comunidade mas sim em instituições de apoio à terceira idade, foi possível obter informação precisa sobre variados aspetos, nomeadamente se os participantes efetivamente cumpriram a

toma da estatina e a ingestão diária do PS-FM, para além de terem mantido um padrão dietético regular ao longo da intervenção.

Por outro lado, podemos afirmar que este estudo corresponde a uma situação de “*worst case scenario*”, uma vez que o benefício terapêutico em termos de c-LDL foi obtido em indivíduos idosos, que se caracterizam por diminuição do metabolismo basal e por perda de homeostasia, fenómenos próprios do processo de senescência, a qual se traduz por alterações na composição bioquímica dos tecidos, uma capacidade reduzida de responder adaptativamente aos estímulos externos e uma vulnerabilidade aumentada a doenças, e ainda, polimedicados para várias comorbidades com as prováveis interações medicamentosas resultantes.

No que diz respeito às limitações, para além de se tratar de um estudo com um número pequeno de participantes, alguns fatores podem ter contribuído para a variabilidade observada nos níveis séricos de colesterol, fatores que não pudemos controlar, tais como a variabilidade genética e o uso de medicação prescrita para patologias concomitantes.

Em conclusão, em indivíduos idosos tratados com estatinas, com um nível basal de c-LDL <130 mg/dL, a co-administração de 2 g/dia PS-FM, ao longo de 6 semanas, efetivamente causou uma melhoria do perfil lipídico, o que se traduziu por uma redução significativa da concentração de c-LDL (e dos rácios lipídicos aterogénicos) e alterações nos níveis dos marcadores do metabolismo do colesterol, sugerindo que o mecanismo homeostático observado corresponde a uma compensação dos efeitos da intervenção dietética, tal como foi apontado noutros estudos.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

A DCV aterosclerótica, especialmente a doença coronária cardíaca, continua a ser a principal causa de morte prematura em todo o mundo. A hipercolesterolemia, resultante da perturbação da homeostasia do metabolismo do colesterol, continua a ser reconhecida como um forte preditor de RCV independente. Neste contexto torna-se importante aprofundar o conhecimento do metabolismo do colesterol, com o intuito da redução dos níveis circulantes de colesterol e por sua vez do RCV.

A síntese e a absorção do colesterol estão inter-relacionadas e desempenham um papel crucial na regulação da homeostasia. Deste modo os métodos que permitem a determinação simultânea de variações na absorção e na síntese do colesterol são de grande interesse, particularmente porque permitem investigar a relação recíproca entre estes dois vetores do metabolismo do colesterol.

Os precursores da biossíntese do colesterol e os fitoesteróis têm vindo a ser correntemente usados como marcadores relativos do metabolismo do colesterol, respetivamente da síntese e da absorção. A sua determinação sérica pode ser utilizada tanto no diagnóstico de alterações hereditárias como na monitorização de intervenções terapêuticas hipocolesterolemiantes, farmacológicas e não-farmacológicas. Dado que os métodos absolutos são complicados do ponto de vista metodológico e exigem um grande consumo de recursos e tempo, esta abordagem é a única que pode ser utilizada em ensaios clínicos de larga escala ou em estudos populacionais. Contudo, não existe ainda um método de referência para a quantificação dos NCS em amostras humanas, estando apenas validadas a análise por GC-FID e GC-MS. A falta de harmonização/padronização do método analítico (essencial em análises de rotina) acarreta diversas dificuldades, nomeadamente na comparabilidade de resultados entre estudos. Nesse sentido, têm vindo a ser promovidos ensaios interlaboratoriais com materiais de referência, à escala internacional, em que tem participado o laboratório onde foi desenvolvido este trabalho de investigação.

A crescente utilização dos marcadores relativos da absorção e da síntese do colesterol tem também refletido os avanços mais recentes em termos das metodologias analíticas que possibilitam a sua determinação.

Os marcadores relativos do metabolismo do colesterol que têm sido maioritariamente determinados em amostras séricas incluem o desmosterol e o latosterol (últimos precursores da via da biossíntese do colesterol), o campesterol e o sitosterol (fitoesteróis maioritariamente presentes na dieta) e o colestanol.

Foram estes os NCS usados no nosso estudo, tendo sido a primeira vez que estes marcadores foram determinados em indivíduos portugueses hipercolesterolémicos, sem terapêutica hipocolesterolemiantes.

A avaliação da associação entre estes marcadores e os fatores de RCV, tais como os parâmetros lipídicos tradicionais veio ainda permitir através do nosso estudo, contribuir para a promoção da utilização destes marcadores como uma ferramenta complementar do perfil lipídico.

De certa forma também relacionada com a falta de harmonização metodológica na determinação dos NCS, é de referir que ainda não existem valores de referência para estes marcadores, à semelhança das classes de risco definidas para os parâmetros lipídicos tradicionais. Podemos, assim, dizer que o nosso estudo, ao disponibilizar gamas de concentrações de NCS típicas dos adultos portugueses hipercolesterolémicos (não tratados), poderá ser um contributo para, em conjunto com o trabalho desenvolvido por outros grupos de investigação, se poder vir a perspetivar futuramente a criação de intervalos de referência para os marcadores de síntese e de absorção do colesterol, em complemento dos existentes valores de referência do perfil lipídico.

Igualmente, no nosso estudo, foram definidos pela primeira vez, perfis de metabolismo do colesterol em adultos hipercolesterolémicos. Essa informação pode ser útil na seleção de uma abordagem hipocolesterolemiantes em função do perfil individual de metabolismo do colesterol, potenciando o benefício da terapêutica prescrita. Por outro lado, a categorização dos perfis de metabolismo do colesterol, identificando os indivíduos hipercolesterolémicos com uma taxa elevada, intermédia ou baixa de absorção gastrointestinal de colesterol (ou a inversa taxa de síntese) poderá também permitir classificá-los em função de níveis de RCV.

Verificámos ainda que existem diferenças significativas em termos de sexo e de idade nos perfis de metabolismo do colesterol (através da determinação dos referidos marcadores bioquímicos), o que pode ter implicações na gestão do RCV e obviamente na escolha do agente hipocolesterolemiantes.

Apesar de não ter sido objetivo do estudo a avaliação da componente genética individual em termos do seu contributo nos perfis do metabolismo do colesterol identificado, este fator pode constituir uma limitação do estudo. Porém, novos polimorfismos com impacte sobre a eficácia de uma terapêutica hipocolesterolemiantes poderão sempre vir a ser identificados e descritos na literatura científica, e não obstante uma abordagem genética ao metabolismo do colesterol poder ser sem dúvida atrativa, os testes genéticos não podem ter em conta todos os polimorfismos (desconhecidos), nem todos os fatores epigenéticos e ambientais. Propomos assim a abordagem baseada nos marcadores relativos da eficiência da absorção e síntese do

colesterol, como uma estratégia a ter em conta na prescrição de regimes hipolipemiantes, a fim de maximizar melhores resultados em saúde e minimizar custos associados.

Como considerações de carácter geral, mas não de menor importância, gostaríamos de fazer ainda referência ao facto de menos de metade dos indivíduos estudados (Estudo 1) se terem identificado como hipercolesterolémicos, apesar de terem valores de CT ≥ 200 mg/dL e/ou c-LDL ≥ 100 mg/dL. O Estudo 1 ainda revelou outras situações relativas a estilos de vida que são certamente oportunidades de melhoria a implementar na população portuguesa, como por exemplo a prática não adequada de exercício físico regular e o baixo aporte hídrico diário. Conclui-se assim que a importância da avaliação multifatorial do risco e das alterações dos estilos de vida, incluindo dieta e exercício físico na prevenção e tratamento da hipercolesterolemia tem de continuar a ser enfatizada, nomeadamente apoiando os doentes numa base individualizada, utilizando estratégias e alvos terapêuticos definidos.

No que se refere ao **Estudo 2**, tanto quanto sabemos, este será o primeiro estudo em idosos hipercolesterolémicos, com c-LDL inferior a 130 mg/dL, tratados com estatinas em combinação com uma matriz alimentar (leite fermentado) enriquecida com fitoesteróis, o qual vem contribuir para aumentar o reduzido número de estudos dedicados a indivíduos idosos com esta patologia.

A incidência da hipercolesterolemia, grandemente associada ao envelhecimento, relaciona-se com a disrupção do metabolismo do colesterol causada pela progressiva perda de homeostasia característica do processo de senescência.

Muitas doenças relacionadas com o envelhecimento e o próprio envelhecimento *per se* têm associada uma condição inflamatória crónica, a qual pode dar origem a um “ciclo vicioso” no qual a senescência celular agrava a inflamação crónica, limita a regeneração tecidual e acelera o envelhecimento, mesmo na ausência de qualquer outro fator genético ou ambiental.

Uma intervenção anti-inflamatória de longo termo (farmacológica ou de modificação dos estilos de vida) poderia ter um potencial de “anti-envelhecimento” através da redução dos níveis de células senescentes, como por exemplo o padrão de dieta mediterrânica por favorecer o envelhecimento saudável. De facto a dieta influencia todos os estágios do ciclo da vida e a nutrição pode influenciar favoravelmente o envelhecimento natural e a qualidade de vida e reduzir a incidência de patologias ligadas à idade.

A toma do leite fermentado (enriquecido com PS) poderá ter contribuído para a melhoria do estado global de saúde dos idosos do nosso estudo, dado que comumente é considerado que pode ter efeitos benéficos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos ao influenciar a

composição da flora microbiota comensal, contribuindo com um aporte nutricional e modulando o sistema imunológico.

Adicionalmente, o mercado dos alimentos funcionais ou de suplementos dietéticos com uma alegação de saúde relativa à redução do colesterol está em franca expansão; consequentemente será plausível e expectável o aumento do número de pessoas a consumir estes produtos, bem como a combiná-los com a terapêutica farmacológica prescrita.

Nesta faixa etária, sem dúvida, a terapêutica farmacológica hipocolesteremiante mais prescrita, são as estatinas, porém uma grande faixa de idosos apresenta queixas de mialgias decorrentes da toma destes fármacos, para além de que tal como noutros adultos, alguns são intolerantes ou não conseguem atingir os objetivos terapêuticos, pelo que diversos estudos apontam no sentido da sua associação com agentes com ação sobre a via da absorção do colesterol.

A associação do inibidor da síntese de colesterol, sinvastatina, com o inibidor da absorção, ezetimibe, é já largamente utilizada na prática clínica, por forma a promover uma redução robusta da concentração de c-LDL, mesmo em idosos.

No nosso estudo, o benefício da terapêutica de associação de um inibidor não-farmacológico da absorção do colesterol (PS) a estatinas foi aparente na redução absoluta do c-LDL e verificou-se mesmo para uma concentração basal de c-LDL tão baixa quanto <100 mg/dL e para indivíduos idosos, faixa etária que se caracteriza pela desregulação da homeostasia, polimedicação e interações farmacocinéticas e farmacodinâmicas, ou seja, uma situação por si só desvantajosa (“worst case scenario”).

Mais ainda, neste Estudo 2, os marcadores relativos do metabolismo do colesterol permitiram evidenciar/comprovar a existência de um mecanismo recíproco de compensação para regulação da homeostasia do colesterol. A redução dos níveis de absorção do colesterol resultante do consumo do PS-FM não foi equivalente à elevação compensatória dos níveis de síntese do colesterol, daí resultando um diferencial *i.e.* um benefício nos níveis circulantes de colesterol.

Por último e em termos de perspetivas futuras, há que fazer referência ao facto de faltarem estudos de análise de dados de segurança agrupados, que comparem o perfil de eficácia e segurança da terapêutica de associação estatinas+PS com a da monoterapia com estatinas, bem como estudos que confirmem os benefícios clínicos da associação estatina+PS a nível dos eventos *major* da DCV, bem como da mortalidade.

Impõe-se ainda, a necessidade do desenvolvimento de ensaios clínicos prospetivos de avaliação do efeito de um tratamento de redução da hipercolesterolemia, com randomização

com base nos perfis de metabolismo do colesterol, em indivíduos com RCV sem terapêutica hipolipemiante.

Em suma, o conhecimento do perfil do metabolismo do colesterol de um indivíduo pode ser um contributo para a otimização do tratamento hipocolesterolemizante, à qual poderá estar associada a minimização dos efeitos adversos decorrentes de prescrição desnecessária/sub-ótima, bem como uma redução dos custos em cuidados de saúde.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

AbuMweis SS, Jones PJ (2008). Cholesterol-lowering effect of plant sterols. *Curr Atherosclerosis Report* 10(6):467-72.

AbuMweis SS, Barake R, Jones PJH (2008). Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Nutr Res* 52: doi:363 10.3402/fnr.v52i0.1811.

AbuMweis SS, Marinangeli CPF, Frohlich J, Jones PJ (2014). Implementing phytosterols into medical practice as a cholesterol-lowering strategy: overview of efficacy, effectiveness and safety. *Can J Cardiol*, doi: 10.1016/j.cjca.2014.04.022.

Acimovic J, Iovgren-Sandblom A, Monostory K, Rozman D, Golicnik M, Lutjohann D, Björkhem I (2009). Combined gas chromatographic/mass spectrometric analysis of cholesterol precursors and plant sterols in cultured cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877(2):2081-6.

Alaupovic P (1971). Apolipoproteins and lipoproteins. *Atherosclerosis* 13:141-6.

Altmann SW, Davis Jr HR, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 303:1201-1204.

Amhida HSM, Bertucci P, Franzò L, Massoud R, Cortese C, Lala A, Federici G (2006). Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas-chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with selective ion monitoring (SIM). *J Chromatogr B*, 842:43-47.

Andrade I, Santos L, Ramos F (2013). Advances in analytical methods to study cholesterol metabolism: the determination of serum noncholesterol sterols. *Biomed Chromatogr* 27:1234-42. DOI 10.1002/bmc.2840

Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R (Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators) (2005). Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 366:1267-78.

Baumgartner S., Mensink RP, Plat J (2011). Plant sterols and stanols in the treatment of dyslipidemia: new insights into targets and mechanisms related to cardiovascular risk. *Curr Pharm Des* 17(9):922-32.

Beairst SL (2000). HMG-CoA reductase inhibitors: assessing differences in drug interactions and safety profiles. *J Am Pharm Assoc* 40(5):637-44.

Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH (2000). Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290:1771-1775.

Bottorff M, Hansten P (2000). Long-term safety of hepatic hydroxymethyl-glutaril-coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Intern Med* 160:2273-80.

Briasoulis A, Agarwal V, Messerli FH (2012). Alcohol consumption and the risk of hypertension in men and women: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Hypertens* 14(11):792-8.

Brufau G, Groen AK, Kuipers F (2011). Reverse cholesterol transport revisited: contribution of biliary versus intestinal cholesterol excretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:1726-1733.

Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, Coburn BA, Bissada N, Staels B, Groen AK, Hussain MM, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR (2006). Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest*. 116: 1052-1062.

Calpe-Berdiel L, Escolà-Gil JC, Blanco-Vaca F (2006). Phytosterol-mediated inhibition of intestinal cholesterol absorption is independent of ATP-binding cassette transporter A1. *Br J Nutr* 95:618-22.

Calpe-Berdiel L, Escolà-Gil JC, Blanco-Vaca F (2007). Are LXR-regulated genes a major molecular target of plant sterols/stanols? *Atherosclerosis* 195:210-1.

Calpe-Berdiel L, Escolà-Gil JC, Blanco-Vaca F (2009). New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis* 203:18-31.

Cannon CP, Giugliano RP, Blazing MA, Harrington RA, Peterson JL, Sisk CM, Strony J, Musliner TA, McCabe CH, Veltri E, Braunwald E, Califf RM (2008). Rationale and design of IMPROVE-IT (IMProved Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy International Trial): comparison of ezetimibe/simvastatin versus simvastatin monotherapy on cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J* 156(5):826-32.

Chan YM, Varady KA, Lin Y, Trautwein E, Mensik RP, Plat J, Jones PJ (2006). Plasma concentrations of plant sterols: physiology and relationship with coronary heart disease. *Nutr Rev* 69:385-402.

Charlton-Menys V, Durrington PN (2008). Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp Physiol* 93(1):27-42.

Cho IJ, Ahn JY, Kim S, Choi MS, Ha TY (2008). Resveratrol attenuates the expression of HMG-CoA reductase mRNA in hamsters. *Biochem Biophys Res Commun* 367:190-4.

Cofán M, Escurriol V, García-Otín AL, Moreno-Iribas C, Larranaga N, Sánchez MJ, Tormo MJ, Redondo ML, González CA, Corella D, Pocoví M, Civeira F, Ros E (2011). Association of plasma

markers of cholesterol homeostasis with metabolic syndrome components. A cross-sectional study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21:651-7.

Cohn JS, Kamili A, Wat E, Chung RWS, Tandy S (2010). Reduction in intestinal cholesterol absorption by various food components: Mechanisms and implications. *Atherosclerosis Suppl* 11:45-8.

Collerton J, Martin-Ruiz C, Davies K, Hilkens CM, Isaacs J, Kolenda C, Parker C, Dunn M, Catt M, Jagger C, von Zglinicki T, Kirkwood TB (2012). Frailty and the role of inflammation, immunosenescence and cellular ageing in the very old: cross-sectional findings from the Newcastle 85+ Study. *Mec Ageing Dev* 133:456-66.

Cooney MT, Dudina A, De Bacquer D, Wilhelmsen L, Sans S, Menotti A, De Backer G, Jousilahti P, Keil U, Thomsen T, Whincup P, Graham IM (2009). HDL cholesterol protects against cardiovascular disease in both genders, at all ages and at all levels of risk. *Atherosclerosis* 206:611-616.

Corrao G, Bagnardi V, Zambon A, La Vecchia C (2004). A meta-analysis of alcohol consumption and the risk of 15 diseases. *Prev Med* 38(5):613-9.

Davis Jr HR, Zhu LJ, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J, Yao X, Iyer SP, Lam MH, Lund EG, Detmers PA, Graziano MP, Altmann SW (2004). Niemann-Pick C1 Like1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 279:33586-33592.

Davis Jr HR, Basso F, Hoos LM, Tetzloff G, Lally SM, Altmann SW (2008). Cholesterol homeostasis by the intestine: lessons from Niemann-Pick C1 Like1 (NPC1L1). *Atherosclerosis Suppl* 9:77-81.

Davis Jr HR, Altmann SW (2009). Niemann-Pick C1L1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. *Biochem Biophys Acta* 1791:679-683.

Demonty I, Chan YM, Pelled D, Jones PJH (2006). Fish oil esters of plant sterols improve the lipid profile of dyslipidemic subjects more than do fish oil or sunflower oil esters of plant sterols. *Am J Clin Nutr* 84:1534-42.

Demonty I, Ras RT, van der Knaap HCM, Duchateau GSMJE, Meijer L, Zock PL, Geleijnse JM, Trautwein EA (2009). Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol intake. *J Nutr* 139(2):271-84.

den Dekker WK, Cheng C, Pasterkamp G, Duckers HJ (2010). Toll like receptor 4 in atherosclerosis and plaque destabilization. *Atherosclerosis* 209(2):314-20.

Di Buono M, Jones PJ, Beaumier L, Wykes LJ (2000). Comparison of deuterium incorporation and mass isotopomer distribution analysis for measurement of human cholesterol biosynthesis. *J Lipid Re.* 41:1516-1523.

Dilis V, Katsoulis M, Lagiou P, Naska A, Trichopoulou A (2012). Mediterranean diet and CHD: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *Br J Nutr* 108:699-709.

Eckel RH, Jakicic JM, Ard JD, Hubbard VS, de Jesus JM, Lee IM, Lichtenstein AH, Loria CM, Millen BE, Houston Miller N, Nonas CA, Sacks FM, Smith SC, Svetkey LP, Wadden TW, Yanovski SZ (2013). AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology American/Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Card*, doi: 10.1016/j.jacc.2013.11.003.

Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventos RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Martínez-González MA (PREDIMED Study Investigators) (2013). Primary prevention of cardiovascular disease with Mediterranean diet. *N Engl J Med* 368:1279–90.

Eussen SR, de Jong N, Rompelberg CJ, Garssen J, Verschuren WM, Klungel OH (2011). Dose-dependent cholesterol-lowering effects of phytosterol/phytostanol-enriched margarine in statin users and statin non-users under free-living conditions. *Public Health Nutr* 14(10):1823-32.

Ferry M, Alix E, Brocker P, Constans T, Lesourd B, Mischlich D, Pfitzenmeyer P, Vellas B (2004). Alimentação e dietética, capítulo 2, pp. 9-17. In: *A Nutrição da pessoa idosa. Aspectos fundamentais, clínicos e psicossociais.* Lusociência-Edições Técnicas e Científicas, Lda., Loures, 2ª edição.

Fink M, Acimovic J, Rezen T, Tansek N, Rozman D (2005). Cholesterogenic lanosterol 14alpha-demethylase (CYP51) is an immediate early response gene. *Endocrinology* 146(2):5321-31.

Fontana L, Addante F, Copetti M, Paroni G, Fontana A, Sancarlo D, Pellegrini F, Ferrucci L, Pilotto A (2013). Identification of a metabolic signature for multidimensional impairment and mortality risk in hospitalized older patients. *Aging Cell* 12:459-66.

Forti N, Diament J (2004). Vastatinas na prevenção da doença aterosclerótica. *Arq Bras Cardiol.* 83:264-71.

Fransen HP, de Jong N, Wolfs M, Verhagen H, Verschuren WM, Lutjohann D, von Bergmann K, Plat J, Mensink RP (2007). Customary use of plant sterol and plant stanol enriched margarine is associated with changes in serum plant sterol and stanol concentrations in humans. *J Nutr* 137(5):1301-6.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18:499-502.

Fung TT, Rexrode KM, Mantzoros CS, Manson JE, Willett WC, Hu FB (2009). Mediterranean diet and incidence of and mortality from coronary heart disease and stroke in women. *Circulation*; 119:1093-1100.

García-Llatas G, Vidal C, Cilla A, Barberá R, Lagarda MJ (2012). Simultaneous quantification of serum phytosterols and cholesterol precursors using a single gas chromatographic method. *Eur J Lipid Sci Tech* 144:520-526.

Genest J, Libby P, Gotto AM (2005). Lipoprotein disorders and cardiovascular disease. In: Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E, eds. *Braunwald's Heart Disease. A textbook of cardiovascular disease*. Philadelphia: Elsevier Saunders, pp. 1013-33.

Genser B, Silbernagel G, De Backer G, Bruckert E, Carmena R, Chapman MJ, Deanfield J, Descamps OS, Rietzschel ER, Dias KC, März W (2012). Plant sterols and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J* 33:444-51.

Gill S, Stevenson J, Kristiana I, Brown AJ (2011). Cholesterol-dependent degradation of squalene monooxygenase, a control point in cholesterol synthesis beyond HMG-CoA reductase. *Cell Metab* 13:260-273.

Goldstein MR, Mascitelli L, Pezzetta F (2008). Point: Statins, plant sterol absorption, and increased coronary risk. *J Clin Lipidol* 2(4):304-5.

Goldstein JL, Brown MS (2009). The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(49):431-8.

Gremaud G, Piguet C, Baumgartner M, Pouteau E, Decarli B, Berger A, Fay LB (2001). Simultaneous assessment of cholesterol absorption and synthesis in humans using on-line gas chromatography/combustion and gas chromatography/pyrolysis/isotope-ratio mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 15:1207-1213.

Gremaud G, Dalan E, Piguet C, Baumgartner M, Ballabeni P, Decarli B, Leser ME, Berger A, Fay LB (2002). Effects of non-esterified stanols in a liquid emulsion on cholesterol absorption and synthesis in hypercholesterolemic men. *Eur J Nutr* 41: 54-60.

Grundty SM, Mok HY (1977). Determination of cholesterol absorption in man by intestinal perfusion. *J Lipid Res* 18:263-271.

Gudzune KA, Monroe AK, Sharma R, Ranasinghe PD, Chelladurai Y, Robinson KA (2014). Effectiveness of combination therapy with statin and another lipid-modifying agent compared with intensified statin monotherapy. *Ann Intern Med* 160(7):468-76.

Gylling H, Hallikainen M, Nissinen MJ, Miettinen TA (2010). The effect of a very high daily plant stanol ester intake on serum lipids, carotenoids, and fat-soluble vitamins. *Clin Nutr* 29(1):112-8.

Gylling H, Miettinen TA (2010). The effects of plant stanol ester in different subject groups. *Eur Cardiol Rev* 6(3):18-21.

Hendriks HF, Brink EJ, Meijer GW, Princen HM, Ntanios FY (2003). Safety of long-term consumption of plant sterol esters-enriched spread. *Eur J Clin Nutr* 57(5):681-92.

Hoevenaar-Blom M, Nooyens ACJ, Kromhout D, Spijkerman AMW, Beulens JWJ, van der Schouw YT, Bueno-de-Mesquita B, Verschuren WMM (2012). Mediterranean style diet and 12-year incidence of cardiovascular diseases: the EPIC-NL cohort study. *PLoS One* 7(9):e45458. doi:10.1371/journal.pone.0045458

Horvat S, McWhir J, Rozman D (2011). Defects in cholesterol synthesis genes in mouse and in humans: lessons from drug development and safer treatments. *Drug Metab Rev* 43:69-90.

Hu FB (2011). Do functional foods have a role in the prevention of cardiovascular disease? *Circulation* 124(5):538-40.

IHS, Instituto de Hidratação e Saúde. Disponível em http://www.ihs.pt/xms/files/newsletter_5/Estabelecimento_de_recomendações_de_ingestão_hídrica_para_os_portugueses.pdf [Acedido em 06-01-2014].

Ikeda I, Matsuoka R, Hamada T, Mistui K, Imabayashi S, Uchino A, Sato M, Kuwano E, Itamura T, Yamada K, Tanaka K, Imaizumi K (2002). Cholesterol esterase accelerates intestinal cholesterol absorption. *Biochim Biophys Acta* 1571(1):34-44.

Jakulj L, Mohammed H, van Dijk TH, Boer T, Turner S, Groen AK, Vissers MN, Stroes ES (2013). Plasma plant sterols serve as poor markers of cholesterol absorption in man. *J Lipid Res* 54:1144-50.

Jansson E, Anderssen SA. General recommendations regarding physical activity. In: *Physical Activity in the Prevention and Treatment of Disease*. Swedish National Institute of Public Health. Professional Associations for Physical Activity. Sweden; 2010:41-9.

Jones PJH, Pappu AS, Hatcher L, Li ZC, Illingworth DR, Connor WE (1996). Dietary cholesterol feeding suppresses human cholesterol synthesis measured by deuterium incorporation and urinary mevalonic acid levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16:1222-8.

Jones PJ, Raeini-Sarjaz M, Ntanos FY, Vanstone CA, Feng JY, Parsons WE (2000). Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytostanol esters. *J Lipid Res* 41:697-705.

Jurk D, Wilson C, Passos JF, Oakley F, Correia-Melo C, Greaves L, Saretzki G, Fox C, Lawless C, Anderson R, Hewitt G, Pender SLF, Fullard N, Nelson G, Mann J, van de Sluis B, Mann DA, von Zglinicki T (2014). Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nat Comms* 2. doi: 10.1038/ncomms5172.

Katan MB, Grundy SM, Jones P, Law M, Miettinen T, Paoletti R (2003). Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clinic Proc* 78(8):965-78.

Kerckhoffs DAJM, Brouns F, Hornstra G, Mensik RP (2002). Effects on the human serum lipoprotein profile of β -glucan, soy protein and isoflavones, plant sterols and stanols, garlic and tocotrienols. *J Nutr* 132(9):2494-2505.

Knoops KT, de Groot LC, Kromhout D, PerrinAE, Moreiras-Varela O, Menotti A, van Staveren WA (2004). Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *JAMA* 292:1433-9.

Kruit JK, Groen AK, van Berkel TJ, Kuipers F (2006). Emerging role of the intestine in control of cholesterol metabolism. *World J Gastroenterol* 2:6429-6439.

Kuksis, A. (2001). Plasma non-cholesterol sterols. *J Chromatogr A* 935:203-236.

Law M (2000). Plant sterol and stanol in margarines and health. *BMJ* 320:861-4.

Libby P, Ridker PM, Hansson GK (2009). Inflammation in atherosclerosis from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol* 54(23):2129-38.

Lin DS, Steiner RD, Flavell DP, Connor WE (2005). Intestinal absorption of cholesterol by patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Pediatr Res* 57:765-770.

Liu J, Sempos CT, Donahue RP, Dorn J, Trevisan M, Grundy SM (2006). Non-high-density lipoprotein and very-low-density lipoprotein cholesterol and their risk predictive values in coronary heart disease. *Am J Cardio*. 98:1363-1368.

Mackay D, Jones PJH (2011). Evaluation of methods for the determination of cholesterol absorption and synthesis in humans. *Atherosclerosis* 218:253-262.

Mackay DS, Jones PJH (2012). Plasma noncholesterol sterols: current uses, potential and need for standardization. *Curr Opin Lipidol* 23:241-247.

Mackay DS, Jones PJH, Myrie SB, Plat J, Lütjohann D (2014). Methodological considerations for the harmonization of non-cholesterol sterol bio-analysis. *J Chromatogr B* 957:116-22.

Marques da Silva P, Massano Cardoso S (2011). Persistent lipid abnormalities in patients treated with statins: Portuguese results of the Dyslipidemia International Study (DYSIS). *Rev Port Cardiol* 30(01):47-63.

Martinez-Gonzalez MA, Bes-Rastrollo M (2014). Dietary patterns, Mediterranean diet, and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 25:000-000. Doi:10.1097/MOL.0000000000000044.

Matthan NR, Lichtestein AH (2004). Approaches to measuring cholesterol absorption in humans. *Atherosclerosis* 174:197-205.

Matthan NR, Zhu L, Pencina M, D'Agostino RB, Schaefer EJ, Lichtenstein AH (2013). Sex-specific differences in the predictive value of cholesterol homeostasis markers and 10-year cardiovascular disease event rate in Framingham Offspring Study participants. *J Am Heart Assoc* 2:e005066 [doi:10.1161/JAHA.112.005066](https://doi.org/10.1161/JAHA.112.005066).

McAuley MY, Wilkinson DJ, Jones JLL, Kirkwood TBL (2012). A whole-body mathematical model of cholesterol metabolism and its age-associated dysregulation. *BMC Syst Bio* 6:130 [doi:10.1186/1752-0509-6-130](https://doi.org/10.1186/1752-0509-6-130).

Mel'nikov SM, Seijen ten Hoorn JW, Bertrand B (2004). Can cholesterol absorption be reduced by phytosterols and phytosterols via a cocrystallization mechanism? *Chem Phys Lipids* 127:15-33.

Mensik RP, Ebbing S, Lindhout M, Plat J, van Heugten MM (2002). Effects of plant stanol esters supplied in low-fat yoghurt on serum lipids and lipoproteins, non-cholesterol sterols and fat soluble antioxidant concentrations. *Atherosclerosis* 160:205-13.

Miettinen TA, Tilvis RS, Kesaniemi YA (1989). Serum cholestanol and plant sterol levels in relation to cholesterol metabolism in middle-aged men. *Metabolism* 38:136-40.

Miettinen TA, Tilvis RS, Kesaniemi YA (1990). Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am J Epidemiol* 131:20-31.

Miettinen TA, Gylling H (2000). Cholesterol absorption efficiency and sterol metabolism in obesity. *Atherosclerosis* 153:241-8.

Miettinen TA, Gylling H (2003). Cholesterol synthesis and absorption in coronary patients with lipid triad and isolated high LDL cholesterol in a 4S subgroup. *Atherosclerosis* 168:343-9.

Miettinen TA, Gylling H, Nissinen MJ (2011). The role of serum non-cholesterol sterols as surrogate markers of absolute cholesterol synthesis and absorption. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21:765-769.

Mitrou PN, Kipnis V, Thiebaut AC, Reedy J, Subar AF, Wirfält E, Flood A, Mouw T, Hollenbeck AR, Leitzmann MF, Schatzkin A (2007). Mediterranean dietary pattern and prediction of all-cause mortality in a US population: results from the NIH-AARP Diet and Health Study. *Arch Intern Med* 167:2461-8.

Moura MRL, Reyes FG (2002). Interação fármaco-nutriente: uma revisão. *Rev Nutr, Campinas* 15(2):223-38.

Mucha L, Stephenson J, Morandi N, Dirani R (2006). Meta-analysis of disease risk associated with smoking, by gender and intensity of smoking. *Gend Med* 3:279-91.

Musa-Veloso K, Poon TH, Elliot JA, Chung C (2011). A comparison of the LDL-cholesterol lowering efficacy of plant stanols and plant sterols over a continuous dose range: Results of a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 85(1):9-28.

Myrie SB, Mymin D, Triggs-Raine B, Jones PJ (2012). Serum lipids, plant sterols, and cholesterol kinetic responses to plant sterol supplementation in phytosterolemia heterozygotes and control individuals. *Am J Clin Nutr* 95(4):837-44.

NCEP-ATP III. Expert Panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). *JAMA* 2001; 285:2486-97.

Neese RA, Faix D, Kletke C, Wu K, Wang AC, Shackleton CH, Hellerstein MK (1993). Measurement of endogenous synthesis of plasma cholesterol in rats and humans using MIDA. *Am J Physiol* 264:E136-47.

Neuvonen PJ (2006). Drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors (statins): the importance of CYP enzymes, transporters and pharmacogenetics. *Curr Opin Investig Drugs* 11(3):323-32.

Nissinen MJ, Gylling H, Vuoristo M, Miettinen TA (2002). Micellar distribution of cholesterol and phytosterols after duodenal plant stanol ester infusion. *Am J Gastrointest Liver Physiol* 282:G1009-15.

Nissinen MJ, Gylling H, Miettinen TA (2008). 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*, 99:370-8.

Noakes M, Clifton P, Ntanos F, Shrapnel W, Record I, McLnerney J (2002). An increase in dietary carotenoids when consuming plant sterols or stanols is effective in maintaining plasma carotenoid concentrations. *Am J Clin Nutr* 5(1):79-86.

Noto D, Cefalù AB, Aversa MR (2014). Beyond statins: New lipid lowering strategies to reduce cardiovascular risk. *Curr Atheroscler Rep* 16(6):414.

Oliveira MN, Sivieri K, Alegro JHA, Saad SMI (2002). Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Rev Br C Farm* 38(1):1-21.

Olson R (2000). Disorders of lipoprotein metabolism. In: Gilbert-Barnes E, Barnes L, editors. *Metabolic diseases: foundations of clinical management, genetics and pathology, Vol. I.* Natick (MA): Eaton Publishing, pp. 283-322.

Organização Mundial de Saúde (OMS). WHO. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 854. Geneva: World Health Organization, 1995.

Organização Mundial de Saúde (OMS). WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894. Geneva: World Health Organization, 2000.

Organização Mundial de Saúde (OMS). Joint WHO/FAO expert consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO Technical Report Series 916. Geneva: World Health Organization, 2002.

Organização Mundial de Saúde (OMS, 2004). WHO, 2004. The international classification of adult underweight, overweight and obesity according to BMI. [consultado em fevereiro 2012].

Disponível em: http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html

Padrão P, Teixeira PJ, Padez C, Medina JL. Estabelecimento de recomendações de ingestão hídrica para os Portugueses. *Revista Semana Médica* 2011; 655 [consultado 06.01.2014]. http://www.ihs.pt/xms/files/newsletter_5/Estabelecimento_de_recomendações_de_ingestão_hídrica_para_os_portugueses.pdf

Paglia, G, D'Apolito O, Gelzo M, Russo AD, Corso G (2010). Direct analysis of sterols from dried plasma/blood spots by na atmospheric pressure thermal desorption chemical ionization mass spectrometry (APTDCI-MS) method for a rapid screening of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Analyst* 135:789-796.

Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren MWM, Albus C, Benlian P, Boysen G, Cifkova R, Deaton C, Ebrahim S, Fisher M, Germano G, Hobbs H, Hoes A, Karadeniz S, Mezzani A, Prescott E, Ryden L, Scherer M, Syva M, Scholte Op Reimer WJM, Vrints C, Wood D, Zamorano JL, Zannad F. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version

2012). The Fifth Joint task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Atherosclerosis* 2012;223:1-68.

Phillips KM, Ruggio DM, Bailey JA (1999). Precise quantitative determination of phytosterols, stanols, and cholesterol metabolites in human serum by capillary gas-liquid chromatography. *J Chromatogr B* 732:17-29.

Plat J, Mackay D, Baumgartner S, Clifton PM, Gylling H, Jones PJ (2012). Progress and prospective of plant sterol and plant stanol research: report of the Maastricht meeting. *Atherosclerosis* 225:521-33.

Plosch T, Kruit JK, Bloks VW, Huijkman NC, Havinga R, Duchateau GS, Lin Y, Kuipers F (2006). Reduction of cholesterol absorption by dietary plant sterols and stanols in mice is independent of the *abcg5/8* transporter. *J Nutr* 136:2135-40.

Pouteau E, Pigué-Welsch C, Berger A, Fay LB (2003). Determination of cholesterol absorption in humans: from radiolabel to stable isotopes studies. *Isot Environ Health Stud* 39:247-257.

Preiss D, Sattar N (2009). Lipids, lipid modifying agents and cardiovascular risk: A review of the evidence. *Clin Endocrinol (Oxf)* 70(6):815-28.

Prieur X, Roszer T, Ricote M (2010). Lipotoxicity in macrophages: Evidence from diseases associated with the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1801(3):327-37.

Radhakrishnan A, Goldstein JL, McDonald JG, Brown MS (2008). Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: A delicate balance. *Cell Metab* 8(6):512-21.

Rahman MM, Laher I (2007). Structural and functional alteration of blood vessels caused by cigarette smoking: an overview of molecular mechanisms. *Curr Vasc Pharmacol* 5:276-92.

Raeini-Sarjaz M, Ntanios FY, Vanstone CA, Jones PJ (2002). No changes in serum fat-soluble vitamin and carotenoid concentrations with the intake of plant sterol/stanol esters in the context of a controlled diet. *Metabolism* 51(5):652-6.

Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen M-R, Wiklund O, Agewall S, Alegria E, Chapman MJ, Durrington P, Erdine S, Halcox J, Hobbs R, Kjekshus J, Filardi PP, Riccardi G, Storey RF, Wood D (2011). ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J* 32(14):1769-1818.

<http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehr158>.

Rezen T, Rozman D, Pascussi J-M, Monostory K (2011). Interplay between cholesterol and drug metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1814:146-160.

Richelle M, Enslen M, Hager C, Groux M, Tavazzi I, Godin JP, Berger A, Métaïron S, Quaile S, Piguet-Welsch C, Sagalowicz L, Green H, Fay LB (2004). Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of beta-carotene and alpha-tocopherol in normocholesterolemic humans. *Am J Clin Nutr* 80(1):171-7.

Rozman D, Monastory K (2010). Perspectives of the non-statin hypolipidemic agents. *Pharmacol Ther* 127:19-40.

Rozner S, Garti N (2006). The activity and absorption relationship of cholesterol and phytosterols. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 282-283:435-56.

Santosa S, Varady KA, AbuMweis S, Jones PJH (2007). Physiological and therapeutic factors affecting cholesterol metabolism: Does a reciprocal relationship between cholesterol absorption and synthesis really exist? *Life Science* 80:505-514.

Saraiva D, Semedo R, Castilho MC, Silva JM, Ramos F (2011). Selection of the derivatization reagent – the case of human blood cholesterol, its precursors and phytosterols GC-MS analyses. *J Chromatogr B* 879:3806-3811.

Scholle JM, Baker WL, Talati R, Coleman CI (2009). The effect of adding plant sterols or stanols to statin therapy in hypercholesterolemic patients: systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Nutr* 28(5):517-24.

Serra-Majem L, Roman B, Estruch R (2006). Scientific evidence of interventions using the Mediterranean diet: a systematic review. *Nutr Rev* 64:S27-S47.

Shaghghi AM, Abumweis SS, Jones PJ (2013). Cholesterol-lowering efficacy of plant sterols/stanols provided in capsule and tablet formats: results of a systematic review and meta-analysis. *J Acad Nutr Diet* 113(11):1494-503.

Shai I, Schwarzfuchs D, Henkin Y, Shahar DR, Witkow S, Greenberg I, Golan R, Fraser D, Bolotin A, Vardi H, Tangi-Rozental O, Zuk-Ramot R, Sarusi B, Brickner D, Schwartz Z, Sheiner E, Marko R, Katorza E, Thiery J, Fiedler GM, Blucher M, Stumvoll M, Stampfer MJ, for the Dietary Intervention Randomized Controlled Trial (DIRECT) Group (2008). Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. *N Engl J Med* 359:229-41.

Silbernagel G, Fauler G, Hoffmann MM, Lütjohann Dm Winkelmann BR, Boehm, März W (2010). The associations of cholesterol metabolism and plasma plant sterols with all-cause and cardiovascular mortality. *J Lipid Res* 51:2384-93.

Silva, J.M.C. (2000). Metabolismo lipídico, capítulo 2, pp. 17-35. In: Colesterol, Lípidos e Doença Vascular, Lidel, Edições Técnicas Lda.

Simopoulos AP (2006). Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed & Pharmacoth* 60:502-7.

Sofi F, Abbate R, Gensini GF, Casini A (2010). Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 92(5):1189-96.

Stone NJ, Robinson J, Lichtenstein AH, Merz CNB, Blum CB, Eckel RH, Goldberg AC, Gordon D, Levy D, Lloyd-Jones DM, McBride P, Schwartz JS, Shero ST, Smith SC Jr, Watson K, Wilson PWF (2014). 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation* 129:S1-S45.

Strandberg TE, Gylling H, Tilvis RS, Miettinen TA (2010). Serum plant and other noncholesterol sterols, cholesterol metabolism and 22-year mortality among middle-age men. *Atherosclerosis* 210:282-7 doi [10.1016/j.atherosclerosis.2009.11.007](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.11.007)

Sudhop T, Lutjohann D, Kodal A, Igel M, Tribble DL, Shah S, Perevozskaya I, von Bergmann K (2002a). Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans. *Circulation* 106:1943-1948.

Sudhop T, Gottwald BM, von Bergmann K (2002b). Serum plant sterols as a potential risk factor for coronary heart disease. *Metabolism* 51:1519-21.

Tang W, Ma Y, Jia L, Iannou YA, Davies JP, Yu L (2009). Genetic inactivation of NPC1L1 protects against sitosterolemia in mice lacking ABCG5/ABCG8. *J Lipid Res* 50:293-300.

Temel RE, Sawyer JK, Yu L, Lord C, Degirolamo C, McDaniel A, Marshall S, Wang N, Shah R, Rudel LL, Brown JM (2010). Biliary sterol secretion is not required for macrophage reverse cholesterol transport. *Cell Metab* 12:96-102.

Tilvis RS, Miettinen TA (1986). Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr* 43:92-97.

Tilvos RS, Valvanne JN, Strandberg TE, Miettinen TA (2011). Prognostic significance of serum cholesterol, lathosterol, and sitosterol in old age; a 17-year population study. *Ann Med* 43:292-301.

Trapani L, Segatto M, Ascenzi P, Pallottini V (2011). Potential role of nonstatincholesterol lowering agents. *Life* 63(11):964-71.

Trautwein EA, Duchateau GSMJE, Lin Y, Mel'nikov SM, Molhuizen HOF, Ntanios FY (2003). Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols. *Eur J Lipid Sci Technol* 105:171-85.

Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D (2003). Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* 26:2599-608.

Tuikkala P, Hartikainen S, Korhonen MJ, Lavikainen P, Kettunen R, Sulkava R, Enlund H (2010). Serum total cholesterol levels and all-cause mortality in a home-dwelling elderly population: a six-year follow-up. *Scand J Prim Healthc* 28:121-7.

Tulenko TN, Sumner AE (2002). The physiology of lipoproteins. *J Nucl Cardiol* 9(6):638-49.

van der Veen JN, van Dijk TH, Vriens CL, van Meer H, Havinga R, Bijsterveld K, Tietge UJ, Groen, AK, Kuipers F (2009). Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *J Biol Chem* 284:19211-19219.

van der Wulp MYM, Verkade HJ, Groen AK (2013). Regulation of cholesterol homeostasis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 368:1-16.

Vanstone CA, Jones PJ (2004). Limitations of plasma plant sterols as indicators of cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr* 79:340-1.

Vaughan CJ, Gotto AM (2004). Update on statins (2003). *Circulation* 110:886-92.

Wang Y, Vanston CA, Parsons WD, Jones PJ (2004). Validation of a single-isotope-labeled cholesterol tracer approach for measuring human cholesterol absorption. *Lipids* 39:87-91.

Waterham H, Koster J, Romeijn GJ, Hennekam RCM, Vreken P, Andersson HC, FitzPatrick DR, Kelley RI, Wanders RJA (2001). Mutations in the 3 β -hydroxysterol-delta-24-reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis. *Am J Human Genet* 69(4):685-94.

Weingärtner O, Lütjohann D, Böhm M, Laufs U (2010). Relationship between cholesterol synthesis and intestinal absorption is associated with cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 210:362-5.

Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH (2002). Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest* 110:671-680.

ANEXOS

ANEXO 1

QUESTIONÁRIO

QUESTIONÁRIO

CÓDIGO N°: _____

☞ CONTRIBUTO PARA A AVALIAÇÃO DO PODER PREDITIVO DOS MARCADORES DE SÍNTESE E DE ABSORÇÃO DO COLESTEROL NA TERAPÊUTICA HIPOCOLESTEROLEMIANTE ☜

NO ÂMBITO DO PROJETO DE DOUTORAMENTO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA, PRETENDE REALIZAR-SE UM ESTUDO INTITULADO “CONTRIBUTO PARA A AVALIAÇÃO DO PODER PREDITIVO DOS MARCADORES DE SÍNTESE E DE ABSORÇÃO DO COLESTEROL NA TERAPÊUTICA HIPOCOLESTEROLEMIANTE”. PARA O EFEITO SOLICITA-SE A SUA COLABORAÇÃO NO PREENCHIMENTO DESTES QUESTIONÁRIO PARA PERMITIR A RECOLHA DE DADOS. ASSEGURAREMOS, DESDE JÁ, O ANONIMATO E A CONFIDENCIALIDADE DAS RESPOSTAS.

RESPONDA COM SINCERIDADE A TODAS AS QUESTÕES ENUNCIADAS. AGRADECEMOS POR ISSO A SUA COLABORAÇÃO.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: ISABEL MARIA A. C. ANDRADE RAMALHO

PARTE I – CARACTERIZAÇÃO SOCIOBIOGRÁFICA

1. SEXO:

Masculino ₁
Feminino ₂

2. NACIONALIDADE: _____

3. IDADE: _____ anos

4. QUAL É O SEU PESO? _____ kilograma

5. QUAL É A SUA ALTURA? _____ metro

6. HABILITAÇÕES LITERÁRIAS:

1° ciclo (4°ano)	<input type="checkbox"/> ₁	Bacharelato	<input type="checkbox"/> ₅
2° ciclo (6°ano)	<input type="checkbox"/> ₂	Licenciatura	<input type="checkbox"/> ₆
3° ciclo (9°ano)	<input type="checkbox"/> ₃	Mestrado	<input type="checkbox"/> ₇
Ensino secundário (12°ano)	<input type="checkbox"/> ₄	Doutoramento	<input type="checkbox"/> ₈
		Outra	<input type="checkbox"/> ₉

Qual: _____

7. PROFISSÃO/OCUPAÇÃO ACTUAL: _____

Empregado p/ conta outrem	<input type="checkbox"/> ₁	Doméstica	<input type="checkbox"/> ₅
Empregado p/ conta propria	<input type="checkbox"/> ₂	Reformado(a)	<input type="checkbox"/> ₆
Trabalho não remunerado (voluntário)	<input type="checkbox"/> ₃	Desempregado(a)	<input type="checkbox"/> ₇
Estudante	<input type="checkbox"/> ₄	Outra situação	<input type="checkbox"/> ₈

Qual: _____

PARTE II – CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA

8.1 TEM POR HÁBITO ANDAR A PÉ 30 MINUTOS POR DIA, EM PASSADA RÁPIDA, 5 VEZES/SEMANA?

Sim ₁

Não ₂

8.2 REALIZA OUTRAS ATIVIDADES EQUIVALENTES (INTENSIDADE MODERADA) 30 MINUTOS POR DIA?

(JARDINAGEM, CAVAR A HORTA, LIMPAR A CASA, ANDAR CARREGANDO OS SACOS DAS COMPRAS)

Sim ₁

Não ₂

9. PRATICA ALGUM DESPORTO/ATIVIDADE FÍSICA (INTENSIDADE VIGOROSA)?

Sim ₁

Não ₂ SE RESPONDEU NÃO, AVANCE PARA A QUESTÃO 10.

9.1 QUANTO TEMPO DE EXERCÍCIO FÍSICO GASTA NESSA ATIVIDADE DESPORTIVA?

_____ HORAS POR SEMANA

10. ACHA QUE A SUA ALIMENTAÇÃO PODE INFLUENCIAR O SEU ESTADO DE SAÚDE E RENDIMENTO LABORAL?

Sim ₁

Talvez ₂

Não ₃

11. QUANTAS REFEIÇÕES COSTUMA FAZER DIARIAMENTE?

Pequeno almoço ₁

Meio da manhã ₂

Almoço ₃

Merenda ₄

Jantar ₅

Ceia ₆

TOTAL DE REFEIÇÕES POR DIA: _____ POR DIA

CALCULE, AGORA, EM 1º LUGAR, O TOTAL DE REFEIÇÕES COMPLETAS POR SEMANA (INCLUINDO O FIM-DE-SEMANA). DE SEGUIDA, CALCULE QUANTAS DESSAS REFEIÇÕES SÃO DE CARNE (RESPOSTA À QUESTÃO 12) E QUANTAS SÃO DE PEIXE (RESPOSTA À QUESTÃO 14).

12. QUANTAS VEZES POR SEMANA CONSUME CARNE? _____

(DESSAS REFEIÇÕES, ASSINALE OS TIPOS DE CARNE QUE CONSUME MAIS FREQUENTEMENTE E O RESPECTIVO Nº VEZES POR SEMANA)

Porco	<input type="checkbox"/>	_____	Nº VEZES POR SEMANA
Bovino	<input type="checkbox"/>	_____	Nº VEZES POR SEMANA
Caprino	<input type="checkbox"/>	_____	Nº VEZES POR SEMANA
Ovino	<input type="checkbox"/>	_____	Nº VEZES POR SEMANA
Aves	<input type="checkbox"/>	_____	Nº VEZES POR SEMANA
Coelho	<input type="checkbox"/>	_____	Nº VEZES POR SEMANA

13. INGERE PRODUTOS DE CHARCUTARIA?

Frequentemente	<input type="checkbox"/>
Poucas vezes/raramente	<input type="checkbox"/>
Nunca	<input type="checkbox"/>

14. QUANTAS VEZES POR SEMANA CONSUME PEIXE? _____

(DESSAS REFEIÇÕES DE PEIXE, ASSINALE AQUELES QUE CONSUME MAIS FREQUENTEMENTE E O RESPECTIVO Nº DE VEZES POR SEMANA)

Pescada	<input type="checkbox"/>	_____	Nº VEZES POR SEMANA
Bacalhau	<input type="checkbox"/>	_____	Nº VEZES POR SEMANA
Solha, linguado	<input type="checkbox"/>	_____	Nº VEZES POR SEMANA
Dourada	<input type="checkbox"/>	_____	Nº VEZES POR SEMANA
Atum	<input type="checkbox"/>	_____	Nº VEZES POR SEMANA
Sardinha	<input type="checkbox"/>	_____	Nº VEZES POR SEMANA
Cavala	<input type="checkbox"/>	_____	Nº VEZES POR SEMANA
Carapau	<input type="checkbox"/>	_____	Nº VEZES POR SEMANA
Salmão	<input type="checkbox"/>	_____	Nº VEZES POR SEMANA
Truta	<input type="checkbox"/>	_____	Nº VEZES POR SEMANA
Peixe-espada	<input type="checkbox"/>	_____	Nº VEZES POR SEMANA
Outros	<input type="checkbox"/>	_____	Nº VEZES POR SEMANA
Quais:	_____	_____	Nº VEZES POR SEMANA

14.1 QUANTAS VEZES POR SEMANA CONSUME MOLUSCOS E/OU BIVALVES? _____

- Lulas ₁ _____ N° VEZES POR SEMANA
Polvo ₂ _____ N° VEZES POR SEMANA
Mexilhão ₃ _____ N° VEZES POR SEMANA
Ameijoas ₄ _____ N° VEZES POR SEMANA
Outro ₅

Quais: _____ N° VEZES POR SEMANA

15. QUANTAS VEZES POR SEMANA CONSUME OVOS? _____ POR SEMANA

**16. ASSINALE A GORDURA QUE UTILIZA MAIS FREQUENTEMENTE PARA COZINHAR OS ALIMENTOS.
(ASSINALE APENAS 1 OPÇÃO)**

- Margarina ₁
Banha ₂
Manteiga ₃
Óleos vegetais ₄
Azeite ₅

17. TEM A NOÇÃO DE QUANTO SAL INGERE POR DIA?

- Sim ₁
Não ₂

SE SIM, EM COLHERES DE CHÁ QUANTAS? _____ COLHERES DE CHÁ

18. QUE TIPO DE LÍQUIDOS INGERE HABITUALMENTE E EM QUE QUANTIDADE POR DIA?

- QUANTIDADE (1 COPO = 200 ML)**
- Água ₁ _____ N° DE COPOS
Sumo natural ₂ _____ N° DE COPOS
Refrigerante ₃ _____ N° DE COPOS
Bebidas brancas ₄ _____ N° DE COPOS
Vinho tinto ₅ _____ N° DE COPOS
Vinho branco ₆ _____ N° DE COPOS
Cerveja ₇ _____ N° DE COPOS
Cocktails ₈ _____ N° DE COPOS
Outro ₉ _____ N° DE COPOS

Qual: _____

19. QUANTOS CAFÉS (EXPRESSO/"BICA") COSTUMA BEBER POR DIA?

- Nenhum ₁
1 a 2 ₂
3 a 4 ₃
Mais de 4 ₄

20. É FUMADOR(A) ?

- Sim ₁
Não ₂

20.1 HÁ QUANTOS ANOS FUMA? _____ N° DE ANOS

21. POSSUI ALGUMA DAS DOENÇAS A SEGUIR INDICADAS?

- Sim ₁
Não ₂

SE RESPONDEU SIM, ASSINALE-A (AS) :

- Diabetes ₁
Hipertensão ₂
Dislipidemia ₃
Colesterolemia ₄
Sitosterolemia ₅
Doença cardiovascular ₆
Outras ₇

Quais: _____

22. CONSOME HABITUALMENTE ALGUM MEDICAMENTO POR PRESCRIÇÃO MÉDICA?

- Sim ₁
Não ₂
Por vezes ₃

EM CASO AFIRMATIVO, QUAL OU QUAIS: _____

23. CONSOME HABITUALMENTE ALGUM MEDICAMENTO OU SUPLEMENTO SEM PRESCRIÇÃO MÉDICA?

- Sim ₁
Não ₂
Por vezes ₃

EM CASO AFIRMATIVO, QUAL OU QUAIS: _____

DATA _____/_____/_____

MUITO OBRIGADA PELA SUA COLABORAÇÃO.

ANEXO 2

CROMATOGRAMAS

Pico #	Esteróis
1	5 α -colestano (IS)
2	Colesterol
3	Colestanol
4	Desmosterol
5	Latosterol
6	Campesterol
7	Campestanol
8	Estigmasterol
9	Sitosterol
10	Sitostanol

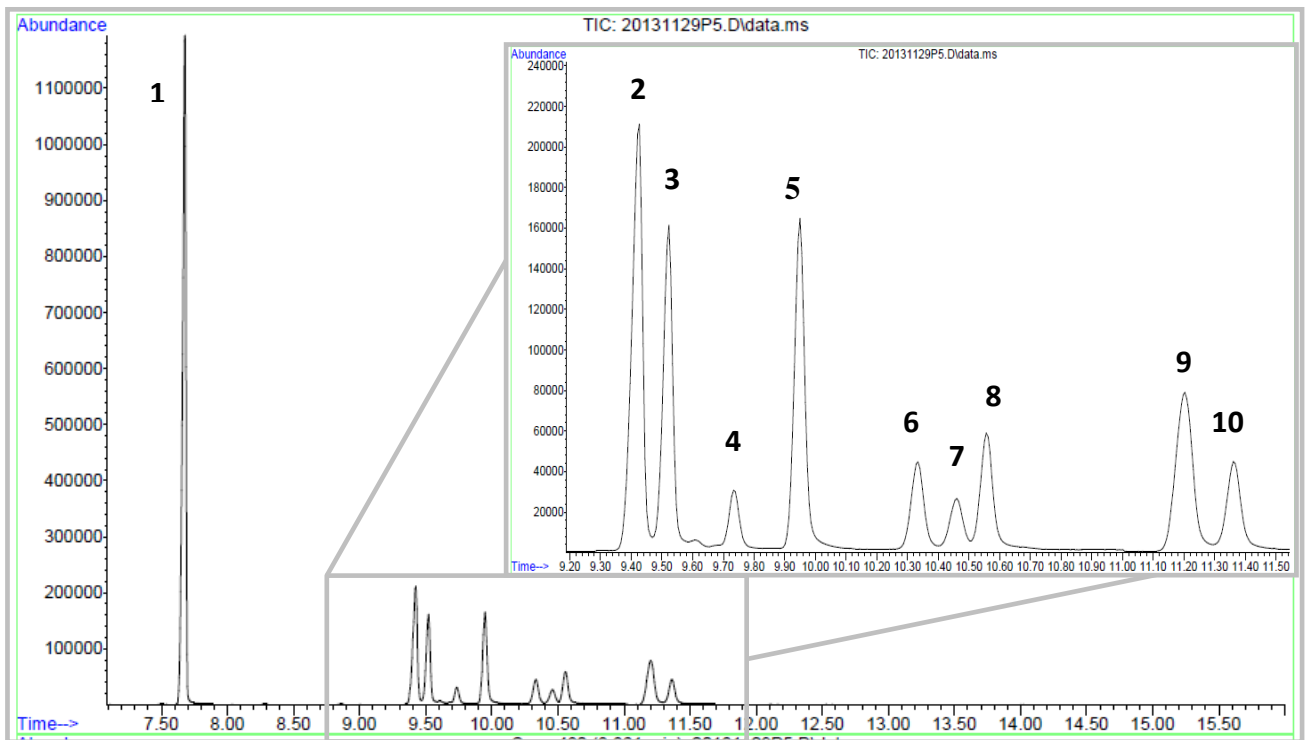


Figura 7 - Cromatograma de padrões de NCS (Estudo 1)

Pico #	Esteróis
1	5 α -colestano (IS)
2	Colesterol
3	Colestanol
4	Desmosterol
5	Latosterol
6	Não identificado
7	Campesterol
8	Sitosterol
9	Sitostanol

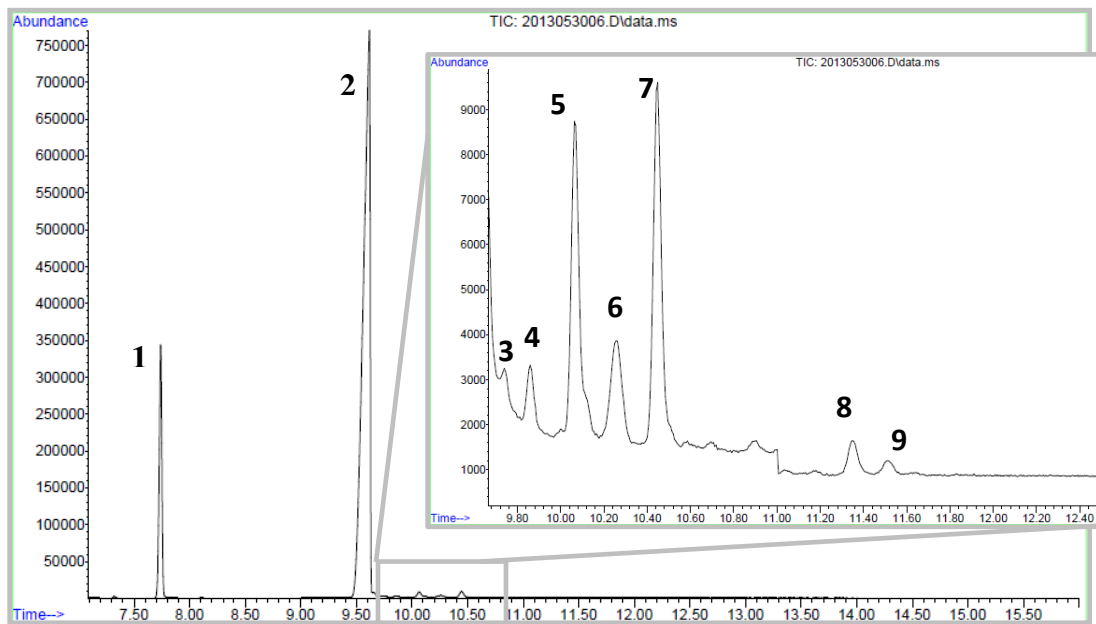


Figura 8 - Cromatograma de amostra sérica (Estudo 1)

ANEXO 3

Artigos científicos elaborados no âmbito do doutoramento

ANEXO 3.1

Andrade I, Santos L, Ramos F (2013). Advances in analytical methods to study cholesterol metabolism: the determination of serum noncholesterol sterols. *Biomed Chromatogr* 27:1234-42. DOI 10.1002/bmc.2840

Advances in analytical methods to study cholesterol metabolism: the determination of serum noncholesterol sterols

Isabel Andrade^{a,b}, Lelita Santos^c and Fernando Ramos^{b,*}

ABSTRACT: Cholesterol biosynthesis precursors and plant sterols are noncholesterol sterols currently used as relative surrogate markers of cholesterol synthesis and absorption, respectively. Its determination in serum samples is a way of diagnosing inherited disorders and also a tool for health evaluation during lipid-lowering lifestyle/drug therapy monitoring. This approach is the only one that can be used for large-scale clinical trials or population based studies, but, nevertheless, there is no reference method for the quantification of noncholesterol sterols in human serum samples and only analysis by GC-FID and GC-MS has been reported to be completely validated. Although there has been a wider use of noncholesterol sterols for the measurement and characterization of cholesterol metabolism, there is a lack of harmonization of measurements and of standardization of the methodology, which is essential for routine measurements of diagnostic utility. New recent advances in analytical methods for the determination of serum noncholesterol sterols are highlighted, focusing on the sample preparation, separation and detection techniques, which will enhance the range of applications in clinical practice. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: serum samples; cholesterol metabolism; analytical methods; noncholesterol sterols

Introduction

Atherosclerotic cardiovascular disease (CVD), especially coronary heart disease, remains the leading cause of premature death worldwide (Perk *et al.*, 2012). Hypercholesterolemia is recognized as a strong independent risk predictor of CVD, namely the low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) to high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) ratio, which indicates the balance between atherogenic and protective lipoproteins (Momiya *et al.*, 2012). Therefore a better understanding of whole-body cholesterol homeostasis is crucial in further refining approaches to modify circulating levels of cholesterol with the interest of decreasing cardiovascular risk.

Serum cholesterol concentrations are derived from endogenous cholesterol from hepatic and extra-hepatic synthesis, and exogenous cholesterol derived from intestinal absorption of dietary and biliary cholesterol. Cholesterol synthesis and absorption are interrelated and play a crucial role in regulating cholesterol homeostasis (Cohen, 2008; Lupattelli *et al.*, 2011).

Recent studies further add to the notion that whole-body cholesterol metabolism might be helpful in guiding hypolipidemic treatment strategies to ensure maximum clinical benefit (Weingärtner *et al.*, 2010). However, absolute measurement of human cholesterol absorption or synthesis is time consuming and methodologically complicated, although methods have evolved substantially since their inception in the late 1950s, from radioisotopes to stable isotopes, and from highly invasive to less invasive procedures.

Matthan and Lichtenstein (2004) reviewed all major methods available for measuring human absolute cholesterol absorption, highlighting the strengths, technical and interpretational limitations and their applicability for metabolic, small-scale outpatient population, and large-scale intervention studies. All earlier reviews either focused on the radiolabeled methods alone or

* Correspondence to: Fernando Ramos, CEF-Center for Pharmaceutical Studies, Health Sciences Campus, Azinhaga de Santa Comba, Pharmacy Faculty, Coimbra University, 3000-548 Coimbra, Portugal. Email: fjramos@uc.ci.pt

^a College of Health Technologies of Coimbra, Polytechnic Institute of Coimbra, Rua 5 Outubro, S. Martinho do Bispo, Apartado 7006, 3046-854 Coimbra, Portugal

^b CEF-Center for Pharmaceutical Studies, Health Sciences Campus, Azinhaga de Santa Comba, Pharmacy Faculty, Coimbra University, 3000-548 Coimbra, Portugal

^c Internal Medicine Department, Coimbra University Hospitals, Medicine Faculty, 3000-075 Coimbra, Portugal

Abbreviations used: ADI, ambient desorption ionization; APCI, atmospheric pressure chemical ionization; APPI-LC-MS/MS, atmospheric pressure photo-ionization-liquid chromatography with tandem mass spectrometry; APTDCI-MS, atmospheric pressure thermal desorption chemical ionization-mass spectrometry; BSTFA, N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide; CVD, cardiovascular disease; DART, direct analysis in real time; DESI, desorption electrospray ionization; DHC, dehydrocholesterol; ESI, electrospray ionization; GC-FID, gas chromatography-flame ionization detector; GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; HPLC-ECD, high-performance liquid chromatography with electrochemical detection; HPLC-ESI-MS/MS, high-performance liquid chromatography-electrospray ionization with tandem mass spectrometry; HPLC-FL, high-performance liquid chromatography with fluorescence; HPLC-MS, high-performance liquid chromatography-mass spectrometry; HPLC-RI, high-performance liquid chromatography with refractive index detection; HPLC-UV, high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection; HS-SPME, headspace-solid phase microextraction; IDMS, isotopic dilution mass spectrometry; LC-APCI-MS, liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry; LC-APPI-MS/MS, liquid chromatography-atmospheric pressure photo-ionization with tandem mass spectrometry; LC-ESI-MS/MS, liquid chromatography-electrospray ionization with tandem mass spectrometry; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol; LLE, liquid-liquid extraction; Mag-MIP, magnetic MIP; MIP, molecularly imprinted polymer; MSTFA:DE:TMIS, N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide-1,4-dithioerythritol-trimethylsilyl silane; NCSs, noncholesterol sterols; SFE, supercritical fluid extraction; SIM, selective ion monitoring; SLOS, Smith-Lemli-Opitz syndrome; SPE, solid-phase extraction; SPME, solid-phase microextraction.

those suitable for use in animal models. The available methods for absolute measurement of human cholesterol absorption can be broadly classified into those that use radiolabeled isotopes and those that do not.

More recently, Mackay and Jones (2011) described and systematically compared the various methods previously and currently used to monitor cholesterol synthesis and absorption in humans, highlighting their advantages, drawbacks and assumptions. The authors stated that the ability to simultaneously measure changes in cholesterol absorption and synthesis is a valuable asset, particularly in investigating the reciprocal relationship between absorption and synthesis, and the only approach that can be done in large-scale studies is the absorption surrogate method and the cholesterol synthesis precursors method, which is achieved by measuring the serum levels of noncholesterol sterols (NCSs). It is affordable, requires only one blood sample and can be performed on large populations. NCSs could refer to any sterols other than cholesterol; however generally serum NCSs encompass the sterol precursors on the cholesterol synthesis pathway, exogenous phytosterols and cholesterol metabolites (Kuksis, 2001). The current uses of NCSs and their potential in customizing dietary and pharmacological hypolipidemic therapies have recently been the focus of a review paper by Mackay and Jones (2012).

The use of serum plant sterols levels to predict cholesterol absorption was first proposed by Tilvis and Miettinen (1986); Miettinen (1970) introduced the initial determination of the cholesterol biosynthesis precursors by gas chromatography (GC), suggesting that they were related to cholesterol synthesis in normal and in many clinical conditions. Additional determinations indicated that serum plant sterols (Tilvis and Miettinen, 1986) and cholestanol (Miettinen *et al.*, 1989) levels, and especially their ratios to cholesterol, were positively related to absolute absorption (Miettinen *et al.*, 1990).

The number of NCSs reported by different research groups varies from just total phytosterols to upwards of 19 individual sterols (Honda *et al.*, 2008), but the most apparently reliable surrogate for cholesterol synthesis has been lathosterol (Nissinen *et al.*, 2008), while campesterol, cholestanol and *b*-sitosterol are currently the absorption surrogates most frequently assessed in serum samples (Lembcke *et al.*, 2005; Ahmida *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2010; Saraiva *et al.*, 2011; Garcfa-Llatas *et al.*, 2012), mainly during nutritional, control or lipid-lowering lifestyle/drug therapy monitoring. Also in the case of the rare inherited disorders of cholesterol metabolism, the diagnosis can be made by analysis of the sterol profiles in serum (Paglia *et al.*, 2010; Ruan *et al.*, 2001) and in amniotic fluid (Chevy *et al.*, 2005; Amaral *et al.*, 2010).

The reporting of NCSs has been somewhat variable, with some groups reporting exact values and others values normalized to cholesterol: to assess the overall balance of cholesterol metabolism, more currently, the ratio of serum NCSs to cholesterol or the ratio of cholesterol synthesis to cholesterol absorption surrogates is used.

However, while this method offers an alternative to other approaches, estimation of cholesterol absorption efficiency and synthesis inferred from surrogate markers may not reliably reflect the absolute variables of cholesterol metabolism. Most current studies and reviews accept serum NCSs to reflect the absolute synthesis and absorption of cholesterol, without any validation to the absolute variables (Miettinen *et al.*, 2011).

Miettinen *et al.* (2011) compared serum NCSs with absolute measurements of cholesterol metabolism, and recommended using several surrogate markers, together with absolute measures of cholesterol absorption and synthesis, whenever possible,

cautioning against the validity of the relative markers of cholesterol metabolism as self-evident. Further, the ability to reliably cross-compare NCSs data is also critical once NCSs are relative surrogates, subject to more variability (Mackay and Jones, 2012).

Notwithstanding some limitations, estimating cholesterol metabolism by this approach is the only method currently available that can be used in a practical sense for large-scale clinical trials or population based studies. Hence, measurement of NCSs as relative surrogate biomarkers for the efficiency of cholesterol absorption and synthesis is increasingly being used in different experimental settings, such as clinical as well as population-based studies.

Although chromatographic techniques have been the most popular analytical methods for the determination of sterols, new advances in the isolation, identification and quantification of NCSs have been published. It is thus the main focus of this paper to review the analytical aspects of the measurement of NCSs, highlighting recent advances, over the last decade, in the quantification of surrogate markers for cholesterol absorption and synthesis in humans.

Analytical methods for the determination of NCSs

In 2001, Kuksis reviewed the methods so far employed for the plasma NCS analysis, enhancing difficulties experienced at all stages of the analytical process. Earlier analyses, in the 1980s, were based on the methods developed by Miettinen and coworkers (Tilvis and Miettinen, 1980; Miettinen, 1985; Vuoristo and Miettinen, 1986), mainly accomplished by a combined application of classical solvent extraction, thin-layer chromatography and quantification by GC. Thereafter, during the next decade, GC appears to have been the most popular method for the assessment of NCSs, in part owing to small sample sizes and the low abundance of the sterol of interest (Kuksis, 2001).

The evolution of analytical techniques has resulted in a heterogeneous selection of methods to yield a picture of an individual's cholesterol metabolism. Extraction and derivatization of NCSs differ between research groups, as do separation techniques, which currently include GC and liquid chromatography (LC) systems. The quantification is divided between flame ionization detection (FID) and mass spectrometry (MS) detection, but with considerable variability between measurement techniques (Mackay and Jones, 2012). Only GC-FID (Phillips *et al.*, 1999) and GC-MS (Garcfa-Llatas *et al.*, 2012) has been reported to be completely validated for serum NCSs measurement, summed up by Ahmida *et al.* (2006) and Saraiva *et al.* (2011) using GC-MS in selective ion monitoring (SIM) mode, according to the guidelines of the International Conference on Harmonization for the validation of analytical methods (ICH, 2005).

Although more efficient techniques have emerged that are suitable for NCSs isolation, identification and quantification in biological matrices, there is still no reference method for human serum samples. Hereafter are outlined the recent advances, achieved over the last decade, in sample preparation, separation and detection techniques for serum NCSs analysis.

Advances in sample preparation

Sample pre-treatment. Common biological samples used for analysis of NCSs include mainly serum, plasma and amniotic fluid; the sample size generally ranges from a few microliters (as for blood spots) to 1 mL (Table 1). Typically, the conventional

Table 1. Advances in sample preparation for NCSs analysis in biological matrices

Sample type	Sample volume	Analyte	Saponification step	Extraction technique	Derivatization agent	Determination based system	Ref
Serum	1 mL	Desmosterol Lathosterol Lanosterol Sitosterol Sitostanol	KOH, 70 °C, 30'	HS-SPME (PA fiber)	BSTFA	GC	Do me no <i>et al.</i> , 2005
Serum	100µL	P-sitosterol Campesterol Desmosterol Lathosterol	KOH, 65 °C, 60'	No extraction	BSTFAiTMCS	GC	Garcia-Llatas <i>et al.</i> , 2012
Plasma	200µL	Desmosterol Lathosterol P-sitosterol Campesterol Cholestanol	KOH, 70 °C, 60'	LLE	BSTFAiTMCS	GC	Ahmida <i>et al.</i> , 2006
Serum	50µL	Stigmasterol P-sitosterol	Not applicable	P-sitosterol Mag-MIP beads	BSTFA	GC	Zhang <i>et al.</i> , 2011
Serum	100µL	Cholesterol Desmosterol Lathosterol Campesterol P-sitosterol	KOH, 60 °C, 120'	LLE	MTBSTFA:NH ₄ I BSTFAiTMCS MSTFA:DTE: TMIS	GC	Saraiva <i>et al.</i> , 2011
Serum	10µL	P-sitosterol Campesterol Brassicasterol Stigmasterol	KOH, n.a., n.a.	LLE	No derivatization	HPLC	Ito <i>et al.</i> , 2010
Serum	1µL	19 cholesterol precursors 2 plant sterols 2 plant stands	KOH, 37 °C, 60'	LLE	Picolinyl esters derivatization	LC	Honda <i>et al.</i> , 2008
Serum	20µL	(Free/esterified) P-sitosterol Campesterol Brassicasterol Stigmasterol	KOH, 68 C 60'	LLE	No derivatization	LC	Lembcke <i>et al.</i> , 2005
Dried plasma spot	spot	Cholesterol Lathosterol Desmosterol DHCs Sitosterol	Not applicable	Not applicable	Not applicable	Direct ionization	Paglia <i>et al.</i> , 2010

sample preparation (sterols extraction) and characterization (sterols separation) includes the extraction of lipids, alkaline (saponification) and/or acid hydrolysis, extraction of unsaponifiable compounds, extract clean-up, sterol derivatization and their final quantitative determination by capillary GC (Saraiva *et al.*, 2011). Extraction techniques are usually compound-specific and depend on the sample type, required sensitivity and throughput.

During the early ages of sterol analysis, liquid-liquid extraction (LLE) was the predominant technique for extraction of sterols from biological matrices; then over the last two decades the use of solid-phase extraction (SPE) has gained popularity, offering several benefits over LLE, such as improved recoveries, less solvent consumption, smaller sample volumes and increased sample throughput.

In addition to SPE (Sodeif and Dutta, 2006), supercritical fluid extraction (SFE) (Mendes *et al.*, 2005) and solid-phase microextraction (SPME; Eanes and Tek, 2008) have also been used as conventional sample preparation methods for the extraction of sterols from biological samples. Microextraction techniques are efficient and solvent-saving, but still possess limited extraction capacity and selectivity for trace sterols in complicated biological matrices. In order to increase the sample throughput for the analysis of serum samples, Domeno *et al.* (2005) applied headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) simultaneously with the derivatizing agent *N,O*-bis (trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA), yielding cleaner extracts as interference from high molecular mass components (such as proteins) is reduced (Table 1).

The development and evolution of new SPME devices such as needle trap, thin-film microextraction and cold-fiber headspace SPME have also offered significant improvements in performance characteristics compared with the conventional fiber-SPME arrangement (Risticvic *et al.*, 2009). Another technique with a potential of becoming part of an efficient sample preparation scheme is the use of molecular imprinted polymers (MIPs). MIPs packed in disks or syringes can be utilized as SPE devices, although these materials can also be packed in ordinary chromatography columns and thus used for direct injection of biological samples (Appelblad and Irgum, 2002).

Magnetic polymer beads are spherical- or particle-shaped magnetic cores with suitable material on the surface, which have been applied to the study of bio-separation of proteomics, catalysis, drug delivery, etc. (Chen *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2009). Combining the molecularly imprinted technique with magnetic polymer beads to produce magnetic MIP (mag-MIP) beads can achieve many advantages during sample preparation, such as higher selectivity, larger extraction capacity and prevention of cross-contamination.

A novel extraction technique based on β -sitosterol magnetic molecularly imprinted polymer (mag-MIP) beads, prepared by a rapid microwave synthesis method, has been developed for the simultaneous determination of trace sterols in biological samples (human serum and food samples - mushroom and watermelon), coupled with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) detection (Zhang *et al.*, 2011; Table 1).

Another approach (without sample preparation) was reported by Paglia *et al.* (2010) for the rapid screening of metabolic defects of cholesterol biosynthesis, analyzing directly in dried plasma/ blood (spotted on paper) the markers of the Smith-Lemli-Opitz syndrome (SLOS; cholesterol, 7- and 8- dehydrocholesterol, DHCs), two rare SLOS-like syndromes, lathosterolosis (lathosterol) and desmosterolosis (desmosterol), and also sitosterolemia (sitosterol);

Table 1). This method offers advantages such as simple sample collection, less invasive nature, reduced time of analysis (<3 min), longer lifespan with reduced need for refrigeration and minimal need for training, since the sample can be desorbed and ionized directly for quantitative assay.

Although little improvement has been made during the last decade, generally recent trends in sample preparation include miniaturization, automation, high-throughput performance, online coupling with analytical instruments and low-cost operation through extremely low or no solvent consumption.

Sterol derivatization. One of the most critical factors of the GC analytical determination is the step of derivatization, to decrease the polarity of the sterol, which in turn increases its volatility, yielding improved peak shape, resolution and sensitivity (Orozco-Solano *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2005). Zhang *et al.* (2011) and Domeno *et al.* (2005) selected BSTFA as the derivatization agent, respectively for the GC-MS and GC-FID determination of serum NCSs, while Garcia-Llatas *et al.* (2012) and Ahmida *et al.* (2006) employed the mixture *N,O*-bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide/trimethylchlorosine (BSTFA:TMCS) before the GC-FID determination.

Saraiva *et al.* (2011) compared three silylation mixtures (silylation is the most common derivatization reaction) for the GC-MS analysis of NCSs in human serum, namely *N*-methyl-*N*-(tert-butyl)dimethylsilyl)trifluoroacetamide/ammonium iodide (MTBSTFA:NH₄I), BSTFA:TMCS and *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide-1,4-dithioerythritol-trimethylidodisilane (MSTFA:DTE:TMIS), concluding that the last one was the most efficient derivative reagent based on the specificity/sensitivity ratio (Table 1).

Although LC-MS has proven to be a promising analytical technique, the detection limits attainable are sometimes insufficient for certain sterols, and derivatization may therefore still be required to enable quantitation. In ionization based systems, Honda *et al.* (2008) applied another derivatization technique, picolinyl ester derivatization (introduction of a picolinyl moiety into the hydroxyl group of sterols), prior to the determination of serum NCSs by LC, while Lembcke *et al.* (2005) and Paglia *et al.* (2010) did not use any derivatization step. Ito *et al.* (2010) employed HPLC (with electrochemical detection) without derivatization for the determination of phytosterols in human serum (Table 1). Table 1 summarizes the improvements made during the last decade in sample preparation (sample pre-treatment and derivatization techniques) for NCSs analysis in biological matrices.

Advances in separation and detection techniques

In what concerns the sterols quantification, sensitive analytical methods are necessary to detect physiological concentrations and even slightly increased concentrations in human serum. Determination methods for sterol quantification mainly include enzymatic photometric methods (Hu and Zhang, 2008), isotopic dilution mass spectrometry (IDMS; Briche *et al.*, 2002), electrochemical (Peng *et al.*, 1992) and chromatographic (Ortiz *et al.*, 2006) analysis, which accounts for GC and LC systems. As a general rule, sterol separations by GC are both faster and more efficient than by LC.

Gas chromatography. Gas chromatographic techniques combined with flame ionization detector (GC-FID) and with mass spectrometry (GC-MS) have been and remain the most popular analytical methods for the NCSs analysis, besides being the only

method validated. GC-FID, since the early work of method validation by Phillips *et al.* (1999), has been recently applied by Domeno *et al.* (2005) and *de novo* validated by Garcia-Llatas *et al.* (2012), for NCS analysis in serum samples, while GC-MS has shown a wider use (Ahmida *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011), having been validated by Saraiva *et al.* (2011; in SIM mode; Table 2). For diagnostic purposes, GC has been the standard method, to date, for the determination of NCSs of clinical interest (Kidambi and Patel, 2008).

Liquid chromatography. Methods using HPLC for the determination of phytosterol profiles in biological samples have been developed, including HPLC with ultraviolet detection (HPLC-UV; Hidaka *et al.*, 1990; Kuriyama *et al.*, 1991; Robins and Fasulo, 1997; Ruan *et al.*, 1997; Saldanha *et al.*, 2006), HPLC with evaporative light scattering detection (Nair *et al.*, 2006), HPLC with refractive index detection (HPLC-RI; Saldanha *et al.*, 2006) or HPLC with fluorescence (HPLC-FL; Lin *et al.*, 2007), all with a derivatization step for sensitive/selective detection.

During the last decade, HPLC-MS or HPLC-MS/MS (HPLC with tandem mass spectrometry) has also been used for sterol analysis (McDonald *et al.*, 2007). In the field of steroid analysis, in the last 15 years HPLC-MS/MS has become an important analytical technique widely used in clinical diagnostic laboratories (Kushnir *et al.*, 2011), leading to the assumption that this improvement might also be beneficial to NCS measurement. HPLC with electrochemical detection (HPLC-ECD) without derivatization was recently applied for the determination of phytosterols in human serum (Ito *et al.*, 2010) (Table 2).

LC was greatly improved in the 1990s with the introduction of atmospheric pressure ionization (API) techniques (i.e. electrospray and ion spray, ESI; Appelblad and Irgum, 2002). ESI and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) or atmospheric pressure photo-ionization (APPI) have become the standard ionization methods for HPLC-MS. Most of the derivatization techniques used for ESI employ incorporation of permanently charged or easily ionizable groups, whereas the derivatization techniques for APCI incorporate groups with high proton or electron affinity (Higashi *et al.*, 2008).

Honda *et al.* (2010) reviewed the HPLC analysis for the quantification of cholesterol and oxysterols, highlighting recent developments for the quantitative determination of NCSs by HPLC-electrospray ionization with MS/MS (HPLC-ESI-MS/MS), which with the inclusion of a picolinyl ester derivatization step, surpassed GC-MS sensitivity.

Recently, liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (LC-APCI-MS; Nagy *et al.*, 2006) and LC-APCI-MS/MS (Tian *et al.*, 2006) have been introduced as more sensitive, specific and rapid quantification methods for nonpolar compounds, such as sterols.

ESI can also be used as an ionization method for LC-MS/MS (LC-ESI-MS/MS); however, sterols are poorly ionized and the sensitivity does not reach that obtained by APCI. Honda *et al.* (2008) used LC-ESI-MS/MS for the quantitative analysis of the picolinyl esters of 11 serum sterols (in 1 μ L of dried serum; Table 2). LC-APPI-MS/MS has also been used for the simultaneous quantification of free and esterified phytosterols in serum samples, and the levels were in the same range as those reported by other authors using GC-MS (~150-fold higher sensitivity compared with GC-MS; Lembcke *et al.*, 2005; Table 2). The total time for sample pre-treatment and analysis was reduced from ~3 h (GC-MS) to 15 min.

Recently, different ambient desorption ionization (ADI) techniques have been introduced to analyze many compounds by direct sampling/ionization of the analytes from raw samples, leading to the development of high throughput analysis. ADI techniques are mainly based on two principles named desorption electrospray ionization (DESI; Takats *et al.*, 2004; Cooks *et al.*, 2006) and direct analysis in real time (DART; Cody *et al.*, 2005). ADI has been used to perform analysis in different fields for biological, forensic and pharmaceutical applications, but nevertheless, its performance has not yet been sufficiently investigated. Wu *et al.* (2009) successfully developed a DESI method for the analysis of free cholesterol in human serum and Paglia *et al.* (2010) employed the atmospheric pressure thermal desorption chemical ionization-MS technique (APTDCI-MS) for the analysis of sterols from three different human complex matrices - dried plasma/whole blood/ red cells spotted onto paper - and found a good correlation with GC-FID (Table 2). The APTDCI-MS method is an ADI technique able to ionize more lipophilic compounds. It is a potentially useful tool to screen SLOS by determining the DHCs and cholesterol levels, and in addition is also able to detect metabolic disorders of sterols such as sitosterolemia.

All of these recent techniques allow rapid determination using small serum volumes without extensive sample pre-treatment and offer sensitive/specific quantification of sterols in human serum. However, they require sophisticated and expensive instrumentation, and may be more useful for the investigation of sterol metabolism disorders than for routine analysis. Table 2 summarizes the most recent advances (after year 2000) in separation and detection techniques used for the determination of serum NCSs, as biomarkers of cholesterol absorption and synthesis, as well as for the serological diagnosis of inherited disorders of cholesterol metabolism.

Conclusions

Although serum NCS have been frequently reported in the last two decades as surrogate markers of the cholesterol metabolism efficiency, there is no reference method for their analysis in human samples. Only systems that comprise efficient sample pre-treatment and separation steps in combination with positive identification can be regarded as state-of-the-art. Accordingly, GC-MS and LC-MS qualify as general platforms on which rugged methods can be developed and used for NCSs analysis. Furthermore GC-MS or GC-FID is the only validated available method to date. Applicability is a key issue; therefore, there is still a need to consider the most suitable analytical methods for each case, whether for serological diagnosis of inherited disorders, in-patient metabolic studies and small outpatient studies, or large-scale outpatient- and population-based studies.

For routine analyses, such as the case of the health evaluation during lipid-lowering lifestyle/drug therapy monitoring, the key option would be GC-MS or GC-FID, given the fact that it is the only validated available method at present. Well-developed and validated tandem mass spectrometry-based methods are more specific than most other analytical techniques, having the advantage of the ability to assess the specificity of analysis in every sample. Therefore LC-MS/MS may become a valuable alternative for NCS separations. In addition, new advances in ionization techniques have enlarged the number of NCSs studies with HPLC. More sophisticated instrumentation based on ADI techniques, enabling direct sampling/ionization of the analytes

Table 2. Advances in separation and detection techniques for NCSs analysis in biological matrices

Matrix	Analyte [internal standard]	Method	Stationary phase [mobile phase] (supplier)	Mass transition (m/z)	LOD/LOQ	Reference
Serum	Desmosterol Lathosterol Lanosterol Sitosterol Sitostanol	GC-FID	FHP-5 30 m X 0.25 mm x 0.25 pm (Flewlett-Packard)	Not applicable	0.55/0.70 1.10/1.30 0.25/0.30 0.65/0.71 0.61/0.70 (pg/mL)	Domeno <i>et al.</i> (2005)
Serum	[5 α -cholestane] /[β -Sitosterol Campesterol Desmosterol Lathosterol	GC-FID	CP-Sil 8/MS 50 m x 0.25 mm x 0.25 pm (Chrompack-Varian)	Not applicable	86/287 42/141 4/15 44/147 (ng/mL)	Garcia-Llatas <i>et al.</i> (2012)
Plasma	[Epicoprostanol] Desmosterol Lathosterol /[β -sitosterol Campesterol Cholestanol	GC-MS (SIM)	Rtx-1701 60 x 0.25 mm x 0.25 pm (Restek)	351/456 443/458 129/486 382/472 305/445	0.30/0.90 0.40/1.30 0.20/0.70 0.50/1.50 0.40/1.30	Ahmida <i>et al.</i> (2006)
Serum	[5 α -cholestane] Stigmasterol	GC-MS	DB-5MS 30 m x 0.25 mm x 0.25 pm (Agilent Scientific)	217/357 378 363	(pmol/L) NA	Zhang <i>et al.</i> (2011)
Serum	/[β -Sitosterol [Not applicable] Cholesterol Desmosterol Lathosterol Campesterol /[β -Sitosterol [5 α -Cholestane]	GC-MS (SIM)	FIP-5MS 30 m x 0.25 mm x 0.25 pm (Flewlett-Packard)	443/458 343/456 255/458 343/472 357/486 217/372	NA	Saraiva <i>et al.</i> (2011)
Serum	/[β -Sitosterol Campesterol Brassicasterol Stigmasterol	HPLC-ECD	Develosil C30-UG-3 (150 x 4.6 mm) [acetonitrile—LiClO ₄] (Nomura Chemical)	Not applicable	NA	Ito <i>et al.</i> (2010)
Serum	[6-Ketocholestanol] 19 Cholesterol precursors 2 Plant sterols	LC-ESI-MS/MS	FHypersilGold 150 x 2.1 mm [acetonitrile-MeOFI-water (45:45:10)] (Thermo Electron)	NA	^a	Flonda <i>et al.</i> (2008)
Serum	2 Plant stands [Coprostanol] (Free/esterified) /[β -Sitosterol Campesterol	LC-APPI-MS/MS	Chromolith/SpeedRod RP-18c 50 m x 4.6 mm [MeOFI-water (75:25)] (Merck)	397/257 383/161	Free/ester LOQ 0.32/.068	Lembcke <i>et al.</i> (2005)

(Continues)

Table 2. (Continued)

Matrix	Analyte [internal standard]	Method	Stationary phase [mobile phase] (supplier)	Mass transition (m/z)	LOD/LOQ	Reference
Dried plasma spot	Brassicasterol Stigmasterol	APTDCI-MS	Not applicable	381/297	0.55/1.41	Paglia et al. (2010)
	[[² H ₇] cholesterol]			395/297	0.10/0.014	
	Cholesterol			376/161	0.16/0.47 (mg/L)	
	Lathosterol			350/450	NA	
	Desmosterol					
	DHCS					
	Sitosterol					
	[d6-Cholesterol];					
	5 α -cholestane]					

NA, Not available.

LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification.

^aOwing to the high number of analytes, please see reference.

from raw samples, might become a potential useful tool to screen inherited/metabolic disorders of sterols, based on LC.

One pitfall in serum NCS assessment is associated with the lack of widespread application of these techniques, owing to the absence of harmonization and standardization, which is necessary for use for routine measurements.

References

- Ahmida HSM, Bertucci P, Franzo L, Massoud R, Cortese C, Lala A and Federici G. Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with selective ion monitoring (SIM). *Journal of Chromatography B* 2006; **842**: 43-47.
- Amaral C, Gallardo E, Rodrigues R, Pinto Leite R, Quelhas D, Tomaz C and Cardoso ML. Quantitative analysis of five sterols in amniotic fluid by GC-MS: Application to the diagnosis of cholesterol biosynthesis defects. *Journal of Chromatography B* 2010; **878**: 2130-2136.
- Appelblad P and Irgum K. Separation and detection of neuroactive steroids from biological matrices. *Journal of Chromatography. A* 2002; **955**: 151-182.
- Briche C, Carter D and Webb KS. Comparison of gas chromatography and liquid chromatography mass spectrometric measurements for high accuracy analysis of cholesterol in human serum by isotope dilution mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2002; **16**: 848-853.
- Chen HM, Deng CH and Zhang XM. Synthesis of Fe₃O₄-SiO₂-PMMA core-shell-shell magnetic microspheres for highly efficient enrichment of peptides and proteins for Maldi-ToF MS analysis. *Angewandte Chemie International Edition* 2010; **49**(3): 607-611.
- Chevy F, Humbert L and Wolf C. Sterol profiling of amniotic fluid: a routine method for the detection of distal cholesterol synthesis deficit. *Prenatal Diagnosis* 2005; **25**:1000-1006.
- Cody RB, Laramée JA and Durst HD. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Analytical Chemistry* 2005; **77**(7): 2297-2302.
- Cohen DE. Balancing cholesterol synthesis and absorption in the gastrointestinal tract. *Journal of Clinical Lipidology* 2008; **2**: S1 -3.
- Cooks RG, Ouyang Z, Takats Z and Wiseman JM. Ambient mass spectrometry. *Science* 2006; **311**: 1566-1570.
- Domeno C, Ruiz B and Nerin C. Determination of sterols in biological samples by SPME with on-fiber derivatization and GC/FID. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2005; **381**: 1576-1583.
- Eanes RC and Tek N. Solid-phase microextraction (SPME) followed by on-fiber derivatization of solasodine and solasodine aglycones of steroidal glycoalkaloids. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology* 2008; **31**:1132-1146.
- García-Llatas G, Vidal C, Cilla A, Barbera R and Lagarda MJ. Simultaneous quantification of serum phytosterols and cholesterol precursors using a simple gas chromatographic method. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2012; **144**: 520-526.
- Hidaka H, Nakamura T, Aoki T, Kojima H, Nakajima Y, Kosugi K, Hatanaka I, Harada M, Kogayashi M, Tamura A, Fujii T and Shigeta Y. Increased plasma plant sterol levels in heterozygotes with sitosterolemia and xanthomatosis. *Journal of Lipid Research* 1990; **31**: 881-888.
- Higashi T, Nishio T, Uchida S, Shimada K, Fukushi M and Maeda M. Simultaneous determination of 17 α -hydroxypregnenolone and 17 α -hydroxyprogesterone in dried blood spots from low birth weight infants using LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008; **48**: 177-182.
- Honda A, Yamashita K, Miyazaki H, Shirai M, Ikegami T, Xu G, Numazawa M, Hara T and Matsuzaki Y. Highly sensitive analysis of sterol profiles in human serum by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Lipid Research* 2008; **49**: 2063-2073.
- Honda A, Miyazaki T, Ikegami T, Iwamoto J, Yamashita K, Numazawa M and Matsuzaki Y. Highly sensitive and specific analysis of sterol profiles in biological samples by HPLC-ESI-MS/MS. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2010; **121**: 556-564.
- Hu YF and Zhang ZJ. Determination of free cholesterol based on a novel flow-injection chemiluminescence method by immobilizing enzyme. *Luminescence* 2008; **23**(5): 338-343.

- Huang SS, Fan Y, Cheng ZY, Kong DY, Yang PP, Quan ZW, Zhang CM and Lin J. Magnetic mesoporous silica spheres for drug targeting and controlled release. *Journal of Physical Chemistry C* 2009; **113**(5): 1775-1784.
- ICH. International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (2005, step 4 version). ICH Harmonized Tripartite Guideline. Available from: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step_4/Q2_R1_Guideline.pdf (accessed May 2012).
- Itô N, Hakamata H and Kusu F. Simultaneous determination of b-sitosterol, campesterol, stigmasterol, and brassicasterol in serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytical Methods* 2010; **2**: 174-179.
- Kidambi S and Patel SB. Sitosterolaemia: pathophysiology, clinical presentation and laboratory diagnosis. *Journal of Clinical Pathology* 2008; **61**: 588-594.
- Kuksis A. Plasma non-cholesterol sterols. *Journal of Chromatography. A* 2001; **935**: 203-206.
- Kuriyama M, Fujiyama J, Kasama T and Osame M. High levels of plant sterols and cholesterol precursors in cerebrotendinous xanthomatosis. *Journal of Lipid Research* 1991; **32**: 223-229.
- Kushnir MM, Rockwood AL, Roberts WL, Yue B, Bergquist J and Meikle AW. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of sterols in clinical laboratories. *Clinical Biochemistry* 2011; **44**: 77-88.
- Lembcke J, Ceglarek U, Fiedler GM, Baumann S, Leichtle A and Thiery J. Rapid quantification of free and esterified phytosterols in human serum using APPI-LC-MS/MS. *Journal of Lipid Research* 2005; **46**: 21-26.
- Lin YT, Wu SS and Wu HL. Highly sensitive analysis of cholesterol and sitosterol in foods and human biosamples by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography. A* 2007; **1156**: 280-287.
- Lupattelli G, De Vuono S and Mannarino E. Patterns of cholesterol metabolism: pathophysiological and therapeutic implications for dyslipidemias and the metabolic syndrome. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease* 2011; **21**: 620-627.
- Mackay D and Jones PJH. Evaluation of methods for the determination of cholesterol absorption and synthesis in humans. *Atherosclerosis* 2011; **218**(2): 253-262.
- Mackay DS and Jones PJH. Plasma noncholesterol sterols: current uses, potential and need for standardization. *Current Opinion in Lipidology* 2012; **23**(3): 241-247.
- Matthan NR and Lichtenstein AH. Approaches to measuring cholesterol absorption in humans. *Atherosclerosis* 2004; **174**: 197-205.
- McDonald JG, Thompson BM, McDrum EC and Russell DW. Extraction and analysis of sterols in biological matrices by high performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Methods in Enzymology* 2007; **432**: 145-170.
- Mendes MF, Pessoa FP, Coelho GV and Uller AC. Recovery of the high aggregated compounds present in the deodorizer distillate of the vegetable oils using supercritical fluids. *Journal of Supercritical Fluids* 2005; **34**: 157-162.
- Miettinen TA. Detection of changes in human cholesterol metabolism. *Annals of Clinical Research* 1970; **2**: 300-320.
- Miettinen TA. Cholesterol precursors and their diurnal rhythm in lipoproteins of patients with jejuno-ileal bypass and ileal dysfunction. *Metabolism* 1985; **34**(5): 425-430.
- Miettinen TA, Tilvis RS and Kesaniemi YA. Serum cholestanol and plant sterol levels in relation to cholesterol metabolism in middle-aged men. *Metabolism* 1989; **38**: 136-140.
- Miettinen TA, Tilvis RS and Kesaniemi YA. Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol synthesis and absorption in volunteers of a randomly selected male population. *American Journal of Epidemiology* 1990; **131**: 20-31.
- Miettinen TA, Gylling H and Nissinen MJ. The role of serum non-cholesterol sterols as surrogate markers of absolute cholesterol synthesis and absorption. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases* 2011; **21**: 765-769.
- Momiyama Y, Ohmori R, Fayad Z, Tanaka N, Kato R, Taniguchi H, Nagata M and Osuzu F. The LDL-cholesterol to HDL-cholesterol ratio and the severity of coronary and aortic atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2012; **222**: 577-580.
- Nagy K, Jakab A, Pollreis F, Bongiorno D, Ceraulo L, Averna MR, Noto D and Vekey K. Analysis of sterols by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry combined with chemometrics. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2006; **20**: 2433-2440.
- Nair VP, Kanfer I and Hoogmartens J. Determination of stigmasterol, b-sitosterol and stigmasterol in oral dosage forms using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006; **41**(3): 731-737.
- Nissinen MJ, Gylling H and 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. *British Journal of Nutrition* 2008; **99**: 370-378.
- Orozco-Solano M, Ruiz-Jimenez J and Luque De Castro MD. Ultrasound-assisted extraction and derivatization of sterols and fatty alcohols from olive leaves and drupes prior to determination by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A* 2010; **1217**: 1227-1235.
- Ortiz L, Moya P and Navarro B. A rapid chromatographic method for simultaneous determination of b-sitosterol and tocopherol homologues in vegetable oils. *Journal of Food Composition Analysis* 2006; **19**: 141-149.
- Paglia G, D'Apollito O, Gelzo M, Russo AD and Corso G. Direct analysis of sterols from dried plasma/blood spots by an atmospheric pressure thermal desorption chemical ionization mass spectrometry (APTDCI-MS) method for a rapid screening of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Analyst* 2010; **135**: 789-796.
- Peng TZ, Li HP and Lu RS. Direct measurement of cholesterol based on anodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta* 1992; **257**: 15-19.
- Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner, Z, Verschuren, M, Albus, C, Benlian, P, Boysen, G, Cifkova, R, Deaton, C, Ebrahim, S, Fisher, F, Germano, G, Hobbs, R, Hoes, A, Karadeniz, S, Mezzani, A, Prescott, E, Ryden, L, Scherer, M, Svanne, M, Scholte Op Reimer, WJM, Vrints, C, Wood, D, Zamorano, JL and Zannad, F. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). *European Heart Journal* 2012; **33**: 1635-1701.
- Phillips KM, Ruggio DM and Bailey JA. Precise quantitative determination of phytosterols, stanols, and cholesterol metabolites in human serum by capillary gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 1999; **732**: 17-29.
- Risticic V, Niri VH, Vuckovic D and Pawliszyn J. Recent developments in solid-phase microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2009; **393**(3): 781-795.
- Robins SJ and Fasulo JM. High density lipoproteins, but not other lipoproteins, provide a vehicle for sterol transport to bile. *Journal of Clinical Investigation* 1997; **99**: 380-384.
- Ruan B, Gerst N, Emmons GT, Shey J and Schroepfer GJ Jr. Sterol synthesis. A timely look at the capabilities of conventional and silver ion high performance liquid chromatography for the separation of C27 sterols related to cholesterol biosynthesis. *Journal of Lipid Research* 1997; **38**: 2615-2626.
- Ruan B, Wilson WK, Pang J, Gerst N, Pinkerton FD, Tsai J, Kelley RI, Whitby FG, Milewick DM, Garbern J and Schroepfer GJ Jr. Sterols in blood of normal and Smith-Lemli-Opitz subjects. *Journal of Lipid Research* 2001; **42**: 799-812.
- Saldanha T, Sawaya AC, Eberlin MN and Bragagnolo N. HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: comparative study of RI, UV, and APCI-MS detectors. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2006; **54**: 4107-4113.
- Saraiva D, Semedo R, Castilho MC, Silva JM and Ramos F. Selection of the derivatization reagent - the case of human blood cholesterol, its precursors and phytosterols GC-MS analyses. *Journal of Chromatography B* 2011; **879**: 3806-3811.
- Sodeif AD and Dutta PC. Novel solid-phase extraction method to separate 4-desmethyl-4-monomethyl- and 4,4'-dismethylsterols in vegetable oils. *Journal of Chromatography. A* 2006; **1108**(2): 183-187.
- Takats Z, Wiseman JM, Gologan B and Cooks RG. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science* 2004; **306**: 471-473.
- Tian Q, Failla ML, Bohn T and Schwartz SJ. High-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry determination of cholesterol uptake by Caco-2 cells. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2006; **20**: 3056-3060.
- Tilvis RS and Miettinen TA. A lack of esterification of lanosterol and other methyl sterols in human serum in vitro. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 1980; **40**(7): 671-674.

- Tilvis RS and Miettinen TA. Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption. *American Journal of Clinical Nutrition* 1986; **43**:92-97.
- Vuoristo M and Miettinen TA. Serum cholesterol precursor sterols in coeliac disease: effects of gluten free diet and cholestyramine. *Gut* 1986; **27**(11): 1312-1319.
- Weingärtner O, Lütjohann D, Böhm M and Laufs U. Relationship between cholesterol synthesis and intestinal absorption is associated with cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2010; **210**: 362-365.
- Wu C, Ifa DR, Manicke NE and Cooks RG. Rapid, direct analysis of cholesterol by charge labeling in reactive desorption electrospray ionization. *Analytical Chemistry* 2009; **81**(18): 7618-7624.
- Zhang Z, Tan W, Hu Y and Li G. Simultaneous determination of trace sterols in complicated biological samples by gas chromatography-mass spectrometry coupled with extraction using β -sitosterol magnetic molecularly imprinted polymer beads. *Journal of Chromatography. A* 2011; **1218**: 4275-4283.

ANEXO 3.2

Andrade I, Santos L, Ramos F (2014). Cholesterol metabolism profiles in Portuguese hypercholesterolemic adults: a cross-sectional study.
(artigo submetido para publicação na revista científica European Journal of Internal Medicine)

Cholesterol metabolism profiles in Portuguese hypercholesterolemic adults: a cross-sectional study

Isabel Andrade ^{a,b}, Lèlita Santos ^c, Fernando Ramos ^{b,d*}

^aInstituto Politécnico de Coimbra, ESTESC-Coimbra Health School, Ciências Complementares, Rua 5 Outubro, S. Martinho do Bispo, Apartado 7006, 3046-854 Coimbra, Portugal

^bCEF-Center for Pharmaceutical Studies, Health Sciences Campus, Pharmacy Faculty, University of Coimbra, Azinhaga de Santa Comba, 3000-548 Coimbra, Portugal

^cDepartment of Internal Medicine, Coimbra University Hospitals, Medicine Faculty, University of Coimbra, 3000-075 Coimbra, Portugal

^dCNC-Center for Neuroscience and Cell Biology, Pharmacy Faculty, University of Coimbra, Azinhaga de Santa Comba, 3000-548 Coimbra, Portugal

*Corresponding author:

Phone number: + (351) 239 488492

Fax number: + (351) 239 488 503

Email: framos@ff.uc.pt

ABSTRACT

Objective. The dynamics of cholesterol homeostasis and the development of cardiovascular disease (CVD) are complex and multifactorial, to which adds individual variability in the proportion of cholesterol from exogenous versus endogenous sources. The aim of this study was to undertake the first characterization/categorization of cholesterol absorption and synthesis profiles in Portuguese hypercholesterolemic adults through the quantification of surrogate markers and the analysis of their association with CVD risk factors.

Methods. Serum samples for the measurement of lipid profiles and cholesterol homeostasis markers were obtained for 100 men and 112 women, aged 30 to 65, with TC ≥ 5.2 mmol/L (~ 200 mg/dL) and/or LDL-C ≥ 2.6 mmol/L (~ 100 mg/dL), none of whom were on any lipid-lowering therapy.

Results. Overall, sex-specific significant differences were observed in the cholesterol homeostasis markers and lipid profiles; women had lower cholesterol synthesis marker concentrations ($P < 0.01$ for lathosterol) and lipid parameters (except for HDL-C concentrations). Age-related significant differences were also found, including higher concentrations of cholesterol absorption markers in association with increasing age. The categorization into cholesterol metabolism profiles showed sex-specific significant differences. Men had a higher tendency to be included in the low cholesterol absorption/high cholesterol synthesis trait, which is associated with a higher prevalence of obesity, diabetes and metabolic syndrome, as evidenced by their higher BMI, higher atherogenic lipid concentrations and lower HDL-C.

Conclusion. This study of the profile distributions of cholesterol metabolism markers extends the analytical basis for phenotype-driven clinical assessments to guide lipid-lowering therapy.

Keywords: cholesterol absorption markers; cholesterol synthesis markers; cholesterol metabolism profile

Abbreviations: BMI, body mass index; CAD, coronary artery disease; CVD, cardiovascular disease; GC/MS-SIM, gas-chromatography/mass spectrometry-selective ion monitoring; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HMGR, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; MetS, metabolic syndrome; NCS, noncholesterol sterols; TC, total cholesterol; TG, triglycerides.

Introduction

Atherosclerosis, which leads to cardiovascular diseases (CVD), is usually caused by a combination of interacting risk factors. Some of these factors are related to lifestyle, while other risk factors, also modifiable, are, elevated blood pressure, type 2 diabetes, and dyslipidemias, or non-modifiable, such as age and male sex.

The role of lifestyle patterns in the prevention/treatment of CVD has been extensively reviewed with most evidence showing that dietary factors, levels and types of physical activity, and tobacco cessation influence atherogenesis directly or through their effects on traditional risk factors, and can also be used in the management of hypercholesterolemia. Total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels have been the primary targets of dyslipidemia therapy, precisely because they can be modified by lifestyle changes and drug therapies [1].

Although the 2013 American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA) guidelines recommends moderate- or high-intensity statin monotherapy as the first-line strategy for atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) risk reduction [2], some patients are statin-intolerant or statin-unresponsive. Also, statin efficacy may be affected by pharmacogenetic variability, therefore higher-intensity statin monotherapy may not be appropriate for all patients [3].

Therefore, analyzing whole-body cholesterol homeostasis may represent a novel strategy to optimize lipid-lowering treatment with the intent of decreasing cardiovascular risk [4].

Cholesterol metabolism can be studied by using noncholesterol sterols (NCS) as surrogate markers of cholesterol synthesis and absorption efficiency, because the circulating levels of NCS have been shown to correlate with the absolute cholesterol synthesis and absorption levels measured by the standard gold radio and stable isotopic methods [5-7].

The ease with which NCS can be measured compared to the complicated nature of more

invasive isotopic methods has led to its wide use for the measurement and characterization of cholesterol metabolism across studies [8-10].

Among the cholesterol precursors, squalene, desmosterol and lathosterol can be used as surrogate markers of cholesterol synthesis efficiency [6, 7, 11], and, serum phytosterols, mainly campesterol and sitosterol, are used as surrogate markers of cholesterol absorption efficiency [12]. Cholestanol, a 5 α -saturated cholesterol derivative, can also be used because it is poorly absorbed in the gut and rapidly eliminated via bile, thereby indicating intestinal cholesterol uptake. Serum cholestanol has been shown to correlate positively with serum plant sterols (campesterol and sitosterol) and fractional cholesterol absorption, as well as, inversely, with cholesterol synthesis, as assessed by desmosterol and lathosterol [6].

Furthermore, markers of cholesterol metabolism were found to be highly significant predictors of CVD risk relative to established cardiovascular risk factors [4, 13].

The aim of this study was to undertake the (first) characterization/categorization of the cholesterol metabolism profiles in the adult (untreated) hypercholesterolemic Portuguese population through the quantification of serum cholesterol absorption and synthesis surrogate markers. This will enable the classification of individuals as having high, intermediate or low rates of gastrointestinal cholesterol absorption (and the inverse rates of hepatic synthesis), resulting in better understanding of one of the main risk factors for CVD.

Material and methods

Study population and experimental design

The study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine of the University of Coimbra and its institutional scientific review board, as well as by the Ethics

Committee for Health of the Regional Governmental Office for Primary Health Care of the Central Region of Portugal. All procedures adhered to the guidelines of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all individuals before they were enrolled into the study. By design, all participants were Caucasian, Portuguese, living/working in the Central Region of Portugal, included in the active working-age population. Individuals included in the study were selected at primary health care units in the Central Region of Portugal, on the basis of the last check-up registered in the medical database of patients coded for lipid metabolism alterations. The recruitment was conducted individually by phone invitation to participate in the study. A fasting serum sample was collected from each individual who agreed to participate. The fasting serum lipid criteria for enrollment were TC \geq 5.2 mmol/L (~ 200 mg/dL) and/or LDL-C \geq 2.6 mmol/L (~ 100 mg/dL)]. Exclusion criteria were as follows: diagnosis of sitosterolemia, history of liver or kidney chronic disease, mental illness, pregnancy and the current use of lipid-lowering medications, dietary supplements or functional foods active on plasma lipid levels for at least 3 months before the study.

For a confidence level of 95%, a margin of error of 5%, and a 55% prevalence of hypercholesterolemia, a statistical sample of N=201 individuals was calculated, based on the population of the Central Region of Portugal (2 381 068 individuals on the basis of the last 2011 census register).

In total, fasting serum samples for measurement of lipid profile and cholesterol homeostasis markers were obtained for 100 men and 112 women, aged 30 to 65 years old. These participants were also evaluated to obtain clinical data such as body mass index (BMI) and use of concurrent medication that might influence cholesterol levels. The covariates included were sex, age, BMI, TC, LDL-C, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), triglyceride (TG), non-HDL-C and lipid ratios.

Anthropometric and biochemical analyses

BMI was calculated (kg/m^2) using height and weight, as measured by a trained nurse in each health care unit following standardized and appropriate technique. A properly calibrated (by professional service) electronic digital scale (200x0.1 kg) with stadiometer (110 to 200 cm) (Prodoc PD 300, Detecto, Webb City, MO, USA) was utilized for accurate weighing and height measuring of the study participants.

Fasting serum TC, HDL-C and TG concentrations were measured using standardized enzymatic techniques. LDL-C concentrations were calculated by Friedewald's equation [14].

The cholesterol homeostasis markers analyzed included campesterol, β -sitosterol, and cholestanol as absorption markers, and, desmosterol and lathosterol, as synthesis markers. Serum concentrations of the absorption and synthesis markers were quantified using gas chromatography-mass spectrometry-selective ion monitoring (GC/MS-SIM), as previously described [15]. Because NCS are transported in the plasma by lipoproteins, their concentration are expressed relative to the concentration of total cholesterol (mmol/mol of cholesterol) to correct for the differing number of lipoprotein acceptor particles.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using IBM SPSS statistics version 22.0 Inc. (IBM Corporation, New York, USA) and *P* values < 0.05 were considered statistically significant. Independent-samples *t*-test was used to compare the lipid, lipoprotein and NCS values between women and men, and also to explain differences on the basis of sex that were not explained by differences in BMI. Differences among groups were determined using one-way ANOVA with Tukey's post-hoc comparison test for localizing statistically significant effects. Prior to statistical analysis, normal distribution and homogeneity were

checked. The study variables fulfilled the prerequisites for using parametric tests.

Untransformed data are presented in the text and tables as mean \pm SD.

Results

Participants characterization

Table 1 contains the participants' characteristics.

Twenty-seven (12.7%) of the participants were obese (BMI \geq 30) and thirty-seven (17.5%) were taking medication for concomitant diseases that may have influenced their cholesterol levels, such as angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEI); angiotensin II receptor blocker (ARB); beta-blocker; calcium channel blocker; diuretics.

[Insert Table 1 here]

The study participants had borderline high hypercholesterolemia [89 (42.0%) had TC \geq 6.21 mmol/L (\geq 240 mg/dL); 70 (33.0%) had LDL-C \geq 4.15 mmol/L (\geq 160 mg/dL); and 43 (20.3%) had TG \geq 2.26 mmol/L (\geq 200 mg/dL)] (data not shown).

Serum cholesterol homeostasis markers and lipid profiles by sex

In our cross-sectional analysis, the average concentrations of the cholesterol absorption markers were higher than those of the synthesis markers (Table 2). On average, compared with men, women had lower cholesterol synthesis marker concentrations ($P < 0.01$ for lathosterol) and higher concentrations of campesterol and sitosterol ($P < 0.05$), but not of cholestanol. On the basis of these differences, men had higher synthesis/absorption ratios than women ($P < 0.001$ for both lathosterol to campesterol and sitosterol ratios).

With regard to serum lipid profiles and lipid ratios, sex-specific differences were also observed. Women had lower concentrations of almost all parameters ($P < 0.01$ for TG; $P <$

0.001 for non-HDL-C and all the ratios), whereas only HDL-C was lower in men ($P < 0.001$) (Table 2).

[Insert Table 2 here]

Serum cholesterol homeostasis markers and lipid profiles by age

Age-related differences were also found. All cholesterol homeostasis markers assessed (except cholesterol) were higher with increasing age, although statistical significance was only found for campesterol ($P < 0.05$), sitosterol ($P < 0.001$) and lathosterol/sitosterol ratio ($P < 0.001$) (within- and between-groups) (Table 3). Higher concentrations of TC, LDL-C, and non-HDL-C and higher ratios of TC/ HDL-C and LDL-C/HDL-C, all of which are atherogenic parameters, were observed with increasing age, in opposition to TG, HDL-C, non-HDL-C/HDL-C and TG/HDL-C, although no significant differences were found (Table 3).

[Insert Table 3 here]

Characterization based on cholesterol metabolism profiles

To further characterize the cholesterol metabolism distribution, we categorized the individuals (on the basis of sex) into profiles of cholesterol synthesis or absorption. Table 4 classifies the participants according to whether their lathosterol and sitosterol concentrations were higher or lower than the corresponding median values (37.8 and 61.5×10^2 mmol/mol of cholesterol, respectively). Therefore, the individuals were distributed into four groups, based on the relative levels of the cholesterol markers: a) Group 1 (N = 55), low synthesis/low absorption (60 % of women); b) Group 2 (N = 56), high synthesis/high absorption (51.8 % of women); c) Group 3 (N = 51), high synthesis/low absorption (70.6 % of men); and d) Group 4 (N = 50), low synthesis/high absorption (70 % of women). Sex-specific differences were observed in Groups 3 and 4 ($P < 0.01$).

[Insert Table 4 here]

Statistically significant differences among the 4 profiles of cholesterol metabolism were found in terms of age, BMI, HDL-C ($P < 0.001$), and all lipid ratios ($P < 0.01$) (Table 5). Groups 2 and 4 include individuals with higher age, while group 3 individuals had higher BMI, higher levels of atherogenic lipids and lipid ratios, and lower HDL-C concentrations.

[Insert Table 5 here]

Discussion

The cross-sectional analyses revealed significant differences in cholesterol homeostasis markers by sex, age, BMI and lipids/lipoproteins concentrations.

In our study, the average concentrations of the cholesterol absorption markers were higher than those of the synthesis markers, in accordance with Matthan et al [16].

Consistent with some of the prior data available [17,18], on average, compared with men, women had lower concentrations of all synthesis markers assessed; indicating that, in women, the neo-synthesis of cholesterol is physiologically lower. These findings should also indicate a lower activity and expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGR), the rate-limiting enzyme in cholesterol biosynthesis. In accordance with prior reports, the markers of cholesterol synthesis and absorption showed the expected inverse associations, reflecting an apparent compensatory change in the cholesterol homeostasis metabolism [4, 12, 18, 19]. Compared with men, women had significantly higher concentrations of campesterol and sitosterol, but not of cholestanol; the exact physiological mechanisms that account for this association between serum cholestanol level and the fractional cholesterol absorption are not yet fully understood [6]. These differences on the basis of sex have not been explained by differences in BMI, except for campesterol and LDL-C.

Increasing age (30 to 60 years old) was associated with higher levels of cholesterol synthesis markers (although without statistical significance) and also of cholesterol absorption markers (with statistical significance for campesterol and sitosterol); this finding is consistent with some, but not all of the prior data available [16], which could be explained by the fact that serum plant sterol levels vary substantially within and across different populations. The greatest of this variability is attributed to the method used to measure these levels; however, the data are also affected by genetics, sex, diet and disease [20].

Among those aged 60 to 65 years, compared to middle-aged subjects, there is some indication of an apparent attenuation of cholesterologenesis in both serum NCS and lipid profiles, which is a logical age-related diminishing anabolic process, also closely associated with multimorbidity, as observed by Tilvis et al [21].

Age- and sex-related profiles variations may reflect changes in hormone levels and hormone sensitivity inducing a decreased ability to maintain lipid homeostasis. Although the mechanisms are incompletely characterized, some evidence demonstrates that the causes of age-related disruption of lipid homeostasis include the gradual decline in clearance of LDL-C with increasing age (a 50% reduction in the rate of hepatic clearance may translate into an increase of LDL-C level up to 116 mg/dL [22]), and the progressively reduced ability to remove cholesterol through conversion to bile acids, the decreased activity of the rate-limiting enzyme in bile acid biosynthesis, cholesterol-7- α -hydroxylase (C7 α OH) [23].

To further characterize the metabolism of cholesterol in our study population, we categorized the individuals into cholesterol metabolism profiles. Sex-specific differences were observed, with statistical significance emerging particularly in Groups 3 and 4; women were found to show a higher expression in the low synthesis/high absorption cholesterol profile (Group 4). Group 4 includes individuals who are hypo-responders (or

non-responders) to statin monotherapy but good responders to cholesterol absorption inhibitors, such as ezetimibe or plant sterol-enriched foods. Men are highly represented in Group 3, which includes individuals with high rates of hepatic cholesterol synthesis and low rates of gastrointestinal absorption; thus, they are hyper-responders to statins.

Evidence also suggest that some of the residual coronary risk seen with statin monotherapy is a consequence of statins actually increasing coronary risk in patients who are hyperabsorbers, which is worrisome in the present day of widespread statin monotherapy, particularly because statins increase absorption [24]. Groups 1 and 2 are represented by individuals with a mixed phenotype, who are expected to show an intermediate response to monotherapy, and therefore benefit from mixed/combined therapies.

Our results also show that individuals with higher age are included in Groups 2 and 4 which are associated with a higher expression of cholesterol absorption. More, the profile of Group 3 included individuals with higher BMI, higher atherogenic lipid concentrations and lipid ratios, and lower HDL-C, a pattern typical of individuals with a tendency towards obesity, type 2 diabetes, and prevalence of the metabolic syndrome (MetS) and its components (with insulin resistance (IR) as a major contributor). Collectively, a number of studies have addressed a possible link between cholesterol metabolism and IR in humans and have shown that low cholesterol absorption can be an additional feature of the MetS, as determined through the use of NCS [24-28].

Despite the fact that the treatment of the MetS should encode a “multi-risk factor” approach, and dyslipidemia is only one component, the association of IR (and obesity) with diminished cholesterol absorption (and increased cholesterol synthesis) underscores a greater importance of lifestyle changes such as dietary modification [29], weight reduction, increased physical activity and moderated alcohol consumption as first line interventions to improve lipid abnormalities (increase insulin sensitivity) in the MetS. It is

therefore tempting to conclude that the early identification of individuals sharing the cholesterol metabolism profile of Group 3 could enable the preventive management of the MetS.

Group 4, which is associated with higher levels of serum phytosterols, corresponds to a profile with a lower frequency of clustered metabolic risk factors.

In sum, the novelty of this study, besides its status as pioneering research in our country, is that it is the first to categorize the cholesterol metabolism profiles in our adult (untreated) hypercholesterolemic population on the basis of cholesterol absorption and synthesis surrogate markers. The increased use of these markers and, also the emerging concept of variations in cholesterol absorption profile between patient groups should translate into more individualized dietary and/or pharmacological interventions.

In terms of the study's limitations, although the number of individuals studied is a sample statistically representative of the population of the Central Region of Portugal, it cannot be argued that it is a population-based study. Moreover, the associations observed could have been influenced by factors we could not control, such as genetic variability/genotype, the cholesterol and phytosterol content of diets and the level of physical activity. Also, a selection bias may have been committed, since the invitation to participate in the study was made by a telephone call.

Despite the study's limitations, the strength of this study is that useful information might derive from this categorization of cholesterol metabolism profiles, *e.g.* the selectivity of the different pharmacological and non-pharmacological therapies according to the profile of cholesterol metabolism could increase the benefit of the prescription.

In conclusion, the results of the present study extend the analytical basis for the clinical assessment of cholesterol homeostasis surrogate markers, promoting their utility as a complementary tool to the traditional plasma lipid profile, and may have translational

potential in helping clinicians to better understand the age- and sex-related response to therapeutic options for lipid lowering among untreated hypercholesterolemic individuals.

Author contributions

IA, LS and FR designed the research protocol; IA recruited participants and conducted the study; IA, LS and FR analyzed data; IA wrote the manuscript and had primary responsibility for its final content. All authors contributed to preparation of the final manuscript.

Funding

No funding.

Acknowledgments

We wish to thank the study subjects for their participation (Unidades de Saúde Familiar Biosa, CelaSaúde, Mondego and Eiras, Coimbra, Portugal). We also thank all those who contributed to the completion of the study, namely for the support in the blood sampling (Ana Filipa Cardoso and Ana Valado), determination of lipid profiles (Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, Coimbra, Portugal), and statistical data analysis (Telmo Pereira).

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest.

REFERENCES

[1] Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen M-R, Wiklund O, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J* 2011;32(14):1769-1818
<http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehr158>.

[2] Stone NJ, Robinson J, Lichtenstein AH, Merz CNB, Blum CB, Eckel RH, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation* 2014;129:S1-S45.
<http://dx.doi.org/10.1161/01.cir.0000437738.63853.7a>

[3] Gudzone KA, Monroe AK, Sharma R, Ranasinghe PD, Chelladurai Y, Robinson KA. Effectiveness of combination therapy with statin and another lipid-modifying agent compared with intensified statin monotherapy. *Ann Intern Med* 2014;160(7):468-76.

[4] Weingärtner O, Lütjohann D, Böhm M, Laufs U. Relationship between cholesterol synthesis and intestinal absorption is associated with cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2010;210:362-5.

[5] Tilvis RS, Miettinen TA. Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr* 1986;43:92-7.

[6] Miettinen TA, Tilvis RS, Kesaniemi 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.

- [7] Miettinen TA, Gylling H, Nissinen MJ. The role of serum noncholesterol sterols as surrogate markers of absolute cholesterol synthesis and absorption. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011;21:765-9.
- [8] Mackay D, Jones PJH. Evaluation of methods for the determination of cholesterol absorption and synthesis in humans. *Atherosclerosis* 2011;218:253-62.
- [9] Mackay DS, Jones PJH. Plasma noncholesterol sterols: current uses, potential and need for standardization. *Curr Opin Lipidol* 2012;23:241-7.
- [10] Andrade I, Santos L, Ramos F. Advances in analytical methods to study cholesterol metabolism: the determination of serum noncholesterol sterols. *Biomed Chromatogr* 2013;27:1234-42.
- [11] Kuksis A. Plasma non-cholesterol sterols. *J Chromatogr A* 2001;935:203-6.
- [12] Trautwein EA, Duchateau GSMJE, Lin Y, Mel'nikov SM, Molhuizen HOF, Ntanos FY. Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols. *Eur J Lipid Sci Technol* 2003;105:171-85.
- [13] Matthan NR, Giovanni A, Schaefer EJ, Brown BG, Lichtenstein AH. Impact of simvastatin, niacin, and/or antioxidants on cholesterol metabolism in CAD patients with low HDL. *J Lipid Res* 2003;44:800-6.
- [14] 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; 18:499-502.

[15] Andrade I, Santos L, Ramos F. "Add-on" effect of phytosterols-enriched fermented milk on lipids and markers of cholesterol metabolism in statin-treated elderly patients. *Steroids* 2015 <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2015.03.007>.

[16] Matthan NR, Zhu L, Pencina M, D'Agostino RB, Schaefer EJ, Lichtenstein AH. Sex-specific differences in the predictive value of cholesterol homeostasis markers and 10-year cardiovascular disease event rate in Framingham Offspring Study participants. *J Am Heart Assoc* 2013;2:e005066 doi: 10.1161/JAHA.112.005066.

[17] Sudhop T, Gottwald BM, von Bergmann K. Serum plant sterols as a potential risk factor for coronary heart disease. *Metabolism* 2002;51:1519-21.

[18] Silbernagel G, Fauler G, Hoffmann MM, Lütjohann D, Winkelmann BR, Boehm BO, et al. The associations of cholesterol metabolism and plasma plant sterols with all-cause and cardiovascular mortality. *J Lipid Res* 2010;51:2384-93.

[19] Strandberg TE, Gylling H, Tilvis RS, Miettinen TA. Serum plant and other noncholesterol sterols, cholesterol metabolism and 22-year mortality among middle-age men. *Atherosclerosis* 2010;210:282-7 doi 10.1016/j.atherosclerosis.2009.11.007

[20] Chan YM, Varady KA, Lin Y, Trautwein E, Mensink RP, Plat J, et al. Plasma concentrations of plant sterols: physiology and relationship with coronary heart disease. *Nutr Rev* 2006;69:385-402.

[21] Tilvis RS, Valvanne JN, Strandberg TE, Miettinen TA. Prognostic significance of serum cholesterol, lathosterol, and sitosterol in old age; a 17-year population study. *Ann Med* 2011;43:292-301.

[22] Mc Auley TC, WilkinsonDJ, Jones J JL, Kirkwood TBL. A whole-body mathematical model of cholesterol metabolism and its age-associated dysregulation. *BMC Systems Biology* 2012;6:130 doi:10.1186/1752-0509-6-130.

[23]Trapani L, Pallotini V. Age-related hypercholesterolemia and HMG-CoA reductase dysregulation: sex does matter (a gender perspective). *Curr Geront Geriatrics Res* 2010 doi:10.1155/2010/420139.

[24] Miettinen TA, Gylling H. Cholesterol absorption efficiency and sterol metabolism in obesity. *Atherosclerosis* 2000;153:241-8.

[25] Simonen P, Gylling H, Howard AN, Miettinen TA. Introducing a new component of the metabolic syndrome: low cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr* 2000;72:82-8.

[26] Smahelova A, Hyspler R, Haas T. Relation of cholesterol metabolism and non-cholesterol sterols to insulin resistance. *Physiol Res* 2007;56:749-55.

[27] Paramsothy P, Knopp RH, Kahn SE, Retzlaff BM, Fish B, Ma L, Ostlund Jr RE. Plasma sterol evidence for decreased absorption and increased synthesis of cholesterol in insulin resistance and obesity. *Am J Clin Nutr* 2011;94:1182-8.

[28] Cofán M, Escuriol V, García-Otín AL, Moreno-Iribas C, Larranaga 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;21:651-7.

[29] Wolff E, Vergnes M-F, Portugal H, Defoort C, Amiot-Carlin M-J, Lairon D, Nicolay A. Cholesterol-absorber status modifies the LDL cholesterol-lowering effect of a Mediterranean-type diet in adults with moderate cardiovascular risk factors. *J Nutr* 2011;141:1791-8.

Table 1 - Study population: Clinical characterization (N=212)

Variable	30 to 39 y	40 to 49 y	50 to 59 y	60 to 65 y	P Value
	(N=56)	(N=59)	(N=52)	(N=45)	
BMI, kg/m ²					
Women	24.0 ± 3.7	25.3 ± 3.9	25.4 ± 2.7	25.0 ± 5.1	NS
Men	26.9 ± 3.2	27.2 ± 3.9	27.6 ± 2.6	27.4 ± 3.9	NS
Overall	25.5 ± 3.8	26.2 ± 4.0	26.5 ± 2.8	26.6 ± 4.6	NS
Concomitant medication*, N (%)					
Women	0 (0)	2 (6.3)	7 (25.9)	8 (32.0)	0.002
Men	2 (7.1)	3 (11.1)	8 (32.0)	7 (35.0)	0.026
Overall	2 (3.6)	5 (8.5)	15 (28.8)	15 (33.3)	0.000

Values are expressed as mean±SD or N (%).

BMI, body mass index; NS, not statistically significant.

*Concomitant medication that may affect cholesterol level (ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin II receptor blocker; β-blocker; calcium channel blocker; diuretics).

Table 2 - Serum cholesterol homeostasis markers and lipid profiles by sex

Variable	Women (n=112)	Men (n=100)	P Value*	BMI Adjusted P Value**
Cholesterol synthesis markers, *10 ² mmol/mol of cholesterol				
Desmosterol	23.4 ± 9.5	24.3 ± 4.6	0.391	0.542
Lathosterol	35.5 ± 8.8	40.7 ± 11.2	0.000	0.006
Cholesterol absorption markers, *10 ² mmol/mol of cholesterol				
Campesterol	47.4 ± 13.6	43.2 ± 13.6	0.026	0.155
Sitosterol	63.6 ± 19.8	55.3 ± 20.6	0.003	0.020
Cholestanol	61.6 ± 16.2	65.1 ± 21.2	0.175	0.069
Synthesis/absorption ratio				
Lathosterol/campesterol	0.78 ± 0.27	1.02 ± 0.42	0.000	0.000
Lathosterol/sitosterol	0.60 ± 0.23	0.84 ± 0.41	0.000	0.000
Lathosterol/cholestanol	0.61 ± 0.26	0.68 ± 0.26	0.062	0.490
Fasting lipids, mmol/L				
TC	6.07 ± 0.71	6.22 ± 1.12	0.235	0.263
LDL-C	3.84 ± 0.67	4.03 ± 0.74	0.046	0.070
HDL-C	1.58 ± 0.35	1.20 ± 0.23	0.000	0.000
TG	1.47 ± 0.72	2.37 ± 2.55	0.000	0.004
Non-HDL-C	4.49 ± 0.70	5.02 ± 1.12	0.000	0.000
Lipid ratios				
TC/HDL-C	4.01 ± 0.91	5.30 ± 1.26	0.000	0.000
LDL-C/HDL-C	2.55 ± 0.76	3.43 ± 0.97	0.000	0.000
TG/HDL-C	2.31 ± 1.45	4.94 ± 6.51	0.000	0.000
Non-HDL-C/HDL-C	3.01 ± 0.91	4.34 ± 1.26	0.000	0.000

Values are expressed as mean±SD.

*P value based on 2-sample t-test.

** P value based on 2-sample t-test from the general linear model with body mass index (BMI).

TC, total cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; TG, triglyceride.

Table 3 - Serum cholesterol homeostasis markers and lipid profiles by age

Variable	30 to 39 y	40 to 49 y	50 to 59 y	60 to 65 y	P Value*	BMI Adjusted P Value**
	(N=56)	(N=59)	(N=52)	(N=45)		
Cholesterol synthesis markers, *10 ² mmol/mol of cholesterol						
Desmosterol	23.1 ± 12.4	23.6 ± 5.8	24.9 ± 4.5	24.0 ± 3.9	0.678	0.724
Lathosterol	37.3 ± 12.3	39.1 ± 12.0	39.1 ± 7.9	36.2 ± 7.6	0.409	0.351
Cholesterol absorption markers, *10 ² mmol/mol of cholesterol						
Campesterol	41.8 ± 10.2	45.7 ± 17.2	47.9 ± 14.3	46.7 ± 11.5	0.112	0.037
Sitosterol	49.3 ± 14.3	58.8 ± 24.9	67.1 ± 18.9	65.4 ± 17.6	0.000	0.000
Cholestanol	61.0 ± 15.7	66.3 ± 23.9	62.1 ± 16.9	63.5 ± 16.8	0.468	0.427
Synthesis/absorption ratio						
Lathosterol/campesterol	0.95 ± 0.46	0.94 ± 0.39	0.87 ± 0.30	0.83 ± 0.30	0.279	0.056
Lathosterol/sitosterol	0.83 ± 0.41	0.77 ± 0.38	0.64 ± 0.27	0.61 ± 0.28	0.004	0.000
Lathosterol/cholestanol	0.66 ± 0.34	0.62 ± 0.22	0.67 ± 0.23	0.63 ± 0.25	0.754	0.595
Fasting lipids, mmol/L						
TC	6.09 ± 1.29	6.17 ± 0.74	6.17 ± 0.75	6.12 ± 0.82	0.969	0.964
LDL-C	3.76 ± 0.69	3.95 ± 0.76	4.01 ± 0.65	3.97 ± 0.71	0.262	0.308
HDL-C	1.47 ± 0.45	1.40 ± 0.34	1.32 ± 0.30	1.41 ± 0.27	0.174	0.277
TG	2.17 ± 3.07	1.93 ± 1.46	1.81 ± 1.21	1.60 ± 0.63	0.487	0.298
Non-HDL-C	4.63 ± 1.33	4.77 ± 0.83	4.86 ± 0.76	4.71 ± 0.78	0.651	0.740
Lipid ratios						
TC/HDL-C	4.50 ± 1.49	4.66 ± 1.37	4.89 ± 1.11	4.49 ± 0.99	0.348	0.387
LDL-C/HDL-C	2.74 ± 0.99	2.98 ± 1.13	3.17 ± 0.83	2.92 ± 0.81	0.155	0.255
TG/HDL-C	4.19 ± 8.03	3.59 ± 3.53	3.48 ± 2.76	2.79 ± 1.45	0.546	0.334
Non-HDL-C/HDL-C	3.50 ± 1.49	3.67 ± 1.37	3.89 ± 1.10	3.49 ± 0.99	0.342	0.380

Values are expressed as mean±SD.

*P value based on ANOVA.

** P value based on ANOVA from the general linear model with body mass index (BMI).

TC, total cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; TG, triglyceride.

Table 4 - Subjects distribution based on cholesterol metabolism profiles

Variable	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
	SYNT ↓	SYNT ↑	SYNT ↑	SYNT ↓
	ABS ↓	ABS ↑	ABS ↓	ABS ↑
Women	33 (60.0 %)	29 (51.8 %)	15 (29.4 %)	35 (70.0 %)
Men	22 (40.0 %)	27 (48.2 %)	36 (70.6 %)	15 (30.0 %)
N/212	55 (25.9 %)	56 (26.4 %)	51 (24.1 %)	50 (23.6 %)
<i>P value</i>	0.138	0.686	0.003	0.005

P value based on ANOVA.
ABS, Cholesterol absorption; SYNT, Cholesterol synthesis

Table 5 - Cholesterol metabolism profiles by CVD risk factors

Variable	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	<i>P Value</i> *
	(N=55)	(N=56)	(N=51)	(N=50)	
Age, years	43.6 ± 11.4	50.5 ± 8.9	46.1 ± 10.4	54.4 ± 9.3	0.000
BMI, kg/m ²	25.2 ± 3.5	26.9 ± 3.9	28.2 ± 3.8	24.4 ± 2.8	0.000
Fasting lipids, mmol/L					
TC	6.29 ± 1.33	6.01 ± 0.61	6.07 ± 0.88	6.15 ± 0.71	0.426
LDL-C	3.90 ± 0.71	3.83 ± 0.62	3.99 ± 0.95	3.98 ± 0.76	0.603
HDL-C	1.52 ± 0.39	1.35 ± 0.33	1.23 ± 0.25	1.49 ± 0.35	0.000
TG	1.76 ± 1.60	1.88 ± 1.31	2.41 ± 3.04	1.52 ± 0.78	0.107
Non-HDL-C	4.77 ± 1.34	4.65 ± 0.69	4.85 ± 0.96	4.68 ± 0.69	0.737
Lipid ratios					
TC/HDL-C	4.39 ± 1.35	4.66 ± 1.09	5.18 ± 1.49	4.33 ± 0.97	0.002
LDL-C/HDL-C	2.75 ± 0.99	2.95 ± 0.83	3.33 ± 1.18	2.80 ± 0.73	0.011
TG/HDL-C	2.89 ± 2.63	3.54 ± 2.97	5.17 ± 8.47	2.63 ± 1.84	0.031
Non-HDL-C:/HDL-C	3.39 ± 1.35	3.66 ± 1.09	4.18 ± 1.49	3.33 ± 0.97	0.002

Values are expressed as mean±SD.
*P value based on ANOVA.
BMI, body mass index; TC, total cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; TG, triglyceride.

ANEXO 3.3

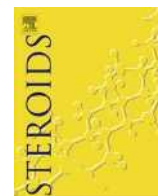
Isabel Andrade, Lèlita Santos, Fernando Ramos (2015). Effect of “add-on” phytosterols-enriched fermented milk on lipids and markers of cholesterol metabolism in statin-treated elderly patients. *Steroids* 99: 293-298.



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Steroids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/steroids

“Add-on” effect of phytosterols-enriched fermented milk on lipids and markers of cholesterol metabolism in statin-treated elderly patients

Isabel Andrade^{a,b,*}, Lèlita Santos^c, Fernando Ramos^{b,d}^a Instituto Politécnico de Coimbra, ESTESC-Coimbra Health School, Ciências Complementares, Rua 5 Outubro, S. Martinho do Bispo, Apartado 7006, 3046-854 Coimbra, Portugal^b CEF - Center for Pharmaceutical Studies, Health Sciences Campus, Pharmacy Faculty, University of Coimbra, Azinhaga de Santa Comba, 3000-548 Coimbra, Portugal^c Department of Internal Medicine, Coimbra University Hospitals, Medicine Faculty, University of Coimbra, 3000-075 Coimbra, Portugal^d CNC - Center for Neuroscience and Cell Biology, Pharmacy Faculty, University of Coimbra, Azinhaga de Santa Comba, 3000-548 Coimbra, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 November 2014
 Received in revised form 4 March 2015
 Accepted 5 March 2015
 Available online 18 March 2015

Keywords:

Elderly
 Cholesterol absorption markers
 Cholesterol synthesis markers
 Plant sterols
 Statin

ABSTRACT

The effect of plant sterol (PS) enriched matrices on lipid profile has been evaluated in statin-treated individuals, with LDL-C concentrations between 3.35 mmol/L and 4.90 mmol/L, but studies in the elderly are scarce. In this study the additional effect of a low-fat PS-enriched fermented milk (PS-FM) on cholesterol metabolism markers and serum lipids was evaluated in the elderly on stable statin therapy with baseline LDL-C < 3.35 mmol/L. Thirty-five individuals (88.6% women; 81 ± 8 years old; BMI 29.9 ± 6.0 kg/m²), living in elderly nursing care facilities were placed on a daily intake of 2g PS-FM for 6 weeks, in addition to their statin monotherapy. A fasting blood sample was collected at baseline (t0), after 2 consecutive periods of 3 weeks intake (t1 and t2), and after 6 weeks of washout (t3), for the analysis of serum lipid profile and cholesterol synthesis (lathosterol, desmosterol) and absorption (sitosterol, campesterol and cholestanol) markers. PS-FM consumption led to a LDL-C reduction of 0.15 mmol/L (t1) and 0.27 mmol/L (t2) from baseline (P < 0.05). Serum campesterol and sitosterol (P < 0.001) increased (t0-t1; t0-t2), reflecting PS intake and contributing to the inhibition of cholesterol intestinal absorption, leading to a decrease in cholestanol-to-cholesterol ratio. There was a reciprocal homeostatic rise of serum cholesterol precursors, desmosterol and lathosterol (P < 0.001) from baseline, based on the up-regulation of the opposing pathway. Statin-treated elderly individuals, with baseline LDL-C < 3.35 mmol/L, may still have therapeutic benefit from strategies that reduce cholesterol absorption, such as 2 g/day PS-FM.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Hypercholesterolemia is one of the primary risk factors for coronary artery, carotid artery, and brain vessel diseases, whose incidence is highly related to aging [1]. Disruption of cholesterol

metabolism can be caused by progressive loss of homeostasis characteristic of aging; although the mechanisms are still incompletely understood, experimental data indicate a gradual decline in the fractional clearance of LDL cholesterol (LDL-C) from the circulation and a reduced expression of hepatic LDL receptor with increasing age [2,3].

The strategies used to reduce plasma cholesterol levels in elderly people are mainly targeted at the inhibition of the rate limiting enzyme of the cholesterol biosynthetic pathway, HMG-CoA reductase; therefore, current therapies are mostly based on the prescription of statins [1].

The 2013 American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA) guidelines recommend moderate- or high-intensity statin monotherapy as the first-line strategy for atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) risk reduction among patients with LDL cholesterol (LDL-C) levels of 4.91 mmol/L or greater (≥ 190 mg/dL), preexisting ASCVD, diabetes mellitus, or estimated 10-year ASCVD risk of 7.5% or greater [4].

Abbreviations: ACC, American College of Cardiology; AHA, American Heart Association; ASCVD, atherosclerotic cardiovascular disease; BMI, body mass index; CVD, cardiovascular disease; DYSIS, Dyslipidemia International Study; GC/MS-SIM, gas-chromatography/mass spectrometry-selective ion monitoring; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; MSTFA:DTE:TMIS, N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide/1,4-dithioerythritol/trimethylsilylosilane; NCS, noncholesterol sterols; PS-FM, plant sterol-fermented milk; TC, total cholesterol; TG, triglyceride.

* Corresponding author at: Instituto Politécnico de Coimbra, ESTESC-Coimbra Health School, Ciências Complementares, Rua 5 Outubro, S. Martinho do Bispo, Apartado 7006, 3046-854 Coimbra, Portugal. Tel.: +351 239 802430; fax: +351 239 813395. E-mail address: imandrade@estesc.coimbra.pt (I. Andrade).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2015.03.007>

0039-128X/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

However some patients are statin-intolerant or statin-unresponsive. Pharmacogenetic variability may also decrease statin efficacy. Therefore higher-intensity statin monotherapy may not be appropriate for all patients.

Lower-intensity statin combined with nonstatin medication may be an alternative and can lead to superior lipid outcomes, but the benefits and risks compared with those of higher-intensity statin monotherapy are unclear, and studies have not shown decreased rates of CV death, myocardial infarction, revascularization, or stroke [5].

Data from the Portuguese sub-study of the Dyslipidemia International Study (DYSIS) showed that even though all enrolled patients (N = 916) were under statin therapy, most still failed to attain the therapeutic LDL-C goal, and in particular those at high cardiovascular risk (66.7%) are vulnerable to developing cardiovascular complications. Around 22% of patients had low high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels and 39% had elevated triglyceride (TG) concentrations, illustrating the need for combined therapy targeted at various lipid parameters. Only 15.3% were simultaneously taking other lipid-lowering agents, the most common being ezetimibe (10.2% of all patients) [6].

The combination of the cholesterol synthesis inhibitor simvastatin with the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe is widely used in everyday clinical practice in order to induce a robust decrease in LDL-C concentrations. Okada et al. [7] reported that ezetimibe-plus-statin therapy provides greater reduction in LDL-C level than statin monotherapy, irrespective of baseline levels of cholesterol absorption and synthesis markers, while Blair et al. [8] observed that the magnitude of the additional decrease in LDL-C is slightly greater than that which would be expected from doubling the dose of statin.

Gudzune et al. [5] conducted a systematic review (a total of 36 trials) in order to compare clinical benefits, adherence, and harms of lower-intensity statin combination therapy with those of higher-intensity statin monotherapy among adults at high risk for ASCVD. Low-intensity statin plus bile acid sequestrant decreased LDL-C level 0-14% more than mid-intensity monotherapy among high-risk hyperlipidemic patients. Mid-intensity statin plus ezetimibe decreased LDL-C level 5-15% and 3-21% more than high-intensity monotherapy among patients with ASCVD and diabetes mellitus, respectively. Evidence was insufficient to evaluate LDL-C for fibrates, niacin, and ra-3 fatty acids.

There is also evidence that several food matrices enriched with plant sterols (PS), or supplements, are equally effective in lowering serum LDL-C concentrations, when used alone as part of the diet or when used as an adjuvant to ongoing statin therapy [9]. In addition, the market for functional foods and dietary supplements with a health claim (for lipid-lowering) is expanding rapidly worldwide and consequently an increasing number of persons will use these products and combine them with their prescribed drugs [9].

Several studies have investigated the effect on lipids and also on serum surrogate cholesterol metabolism markers of a variety of PS-enriched food matrices (or PS supplements) in hypercholesterolemic patients and in statin-treated individuals with mean fasting LDL-C concentrations between 3.35 mmol/L and 4.90 mmol/L (130 mg/dL and 190 mg/dL) [8-15]. Nevertheless, the number of studies on the use of cholesterol-lowering agents in the elderly population is very scarce, not only among the active elderly, but also in the elderly population with disabilities and several diseases [16].

Therefore, it is the aim of this study to evaluate the additional effect of a low-fat plant sterol-enriched fermented milk (PS-FM) on cholesterol homeostasis surrogate markers and serum lipids in the elderly on stable statin therapy with baseline LDL-C < 3.35 mmol/L (<130 mg/dL).

2. Experimental

2.1. Patients

Eligible patients were men and women, aged ≥ 65 years old, in a clinically stable condition, on stable statin monotherapy, with baseline LDL-C < 3.35 mmol/L (<130 mg/dL), and living in nursing care units for the elderly, to meet the criteria of compliance to a regular dietary pattern. Participants were excluded if they were on concurrent use of other lipid-lowering agents, at least for 3 months before entering the study.

Written informed consent was obtained from the study participants or their relatives.

2.2. Study design

The intervention study was an open-label trial that was conducted at 3 nursing care facilities for the elderly, in the Center region of Portugal. The investigational review board and the Ethics Committee of the Faculty of Medicine of the University of Coimbra approved the study protocol. The study conforms to the Declaration of Helsinki.

A total of 47 statin-treated individuals were recruited and were assigned eligible, but twelve patients dropped out for health complications not allocated to the study. A total of 35 subjects completed the study and were therefore on a daily intake (lunch time) of a 2g/100g PS-FM (96 mL) in addition to their statin monotherapy, for two consecutive periods of 3 weeks (a total of 6 weeks), followed by a 6-week washout period.

Body weight was recorded at the beginning and end of the study. Body mass index (BMI) was calculated (kg/m^2) using height and weight, as measured with the participant standing. BMI data were analyzed according to the recommendations of the World Health Organization for individuals aged ≥ 65 years [17].

Participants maintained their usual dietary pattern as well as physical activity throughout the study. Dietary intake was not calculated nor PS intake, but it is plausible that there were no differences in dietary cholesterol or PS intake because as participants are institutionalized, they all have the same daily regular dietary intake.

2.3. Study product

The PS-FM study product (Becel Pro.activ mini drinks) was provided by Unilever Jerónimo Martins Lda. (Lisbon, Portugal). It was dispensed in 96 mL (100 g) portions (one pack contains 6 portions) for individual daily use (exactly as commercially available). The nutritional composition of the PS-FM is given in Table 1. One portion of PS-FM supplied 2 g PS equivalent as free sterol.

Content uniformity of PS in the portion packs was checked throughout production runs according to Unilever standard operating procedures.

The PS-FM mini drinks were distributed (under refrigeration) at the start of each treatment period by the manufacturer.

Supervision staff from the nursing care facilities for the elderly was instructed to follow manufacturer's recommendations for refrigeration of the study product and to give the participants one portion per day after lunch.

2.4. Blood sampling, serum lipids and noncholesterol sterols

A blood sample was collected (after overnight fast) at baseline (t0) (e.g. before intake of the PS-FM), as well as after 3 and 6 weeks of daily intake of a PS-FM (respectively week 3 (t1)

Table 1
Nutritional information.

	100g	% Per portion**
Energy	190 kJ/45 kcal	2
Fat (excluding sterols)***	1.5g	2
Saturates	<0.5 g	1
Monounsaturates	<0.5 g	
Polyunsaturates	0.9 g	
Carbohydrates	4.5 g	2
Sugars	4.5 g	6
Protein	2.5 g	5
Salt	0.1 g	2
Plant sterols	2.0g	

Ingredients: Fermented low-fat milk (80%), water, plant sterol esters* (3.4%), dietary fiber, dextrose (1.1%), sugar (1.1%), fruit (1.1%) (raspberries (0.8%), pomegranate (0.3%)), antioxidant (tocopherol rich extract), color (anthocyanins), flavourings, sweetener (sucralose), emulsifiers (mono- and di-glycerides of fatty acids).

* Equivalent to plant sterols (2%).

** % of reference intake of an average adult (8400 kJ/2000 kcal) 1 portion = 100 g (pack contains 6 portions).

*** Excluding plants sterols which do not contribute to the energy value.

and week 6 (t2)), and also at the end of the 6-week washout period (t3).

The fasting serum samples were analyzed for lipid profile (TC, total cholesterol; LDL-C; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; TG, triglyceride) and also for cholesterol synthesis (lathosterol and desmosterol) and absorption (sitosterol, campesterol and cholestanol) surrogate markers. TC, HDL-C and TG serum concentrations were determined by enzymatic methods [18-20] on an automated analyzer (Olympus AU400, Beckman Coulter, Lisbon, Portugal), with the exception of LDL-C, which was calculated using Friedewald's equation [21]. Serum concentrations of the absorption and synthesis markers were quantified using gas chromatography-mass spectrometry-selective ion monitoring (GC/ MS-SIM). An internal standard containing 50 μ L of 5- α -cholestane 100 μ g/mL was added to 100 μ L of serum and saponified with 2 mol/L ethanolic KOH 90% for 2h at 60 °C, followed by an extraction procedure of the nonsaponifiable layer with 1 mL of n-hexane. The extract was dried under nitrogen, resuspended in 50 μ L of the derivatization agent [(N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide/1,4-dithioerythritol/trimethylidodisilane (MSTFA:DTE:TMIS, 5 mL:10 mg:10 μ L)], and heated for 1 h at 60 °C. The selection of the derivatization agent and the validation of this analytical method have been previously described by our group of researchers [22]. Briefly, a sample volume of 2 μ L was injected into a GC equipped with an inert mass selective detector (Agilent Technologies 6890 N Network GC System, supplied by Soquimica, Lisbon, Portugal) and a 30 m x 250 μ m x 0,25 μ m capillary column (Supelco SLB-5MS, supplied by Reagente 5, Oporto, Portugal). The injector and detector temperatures were 250 °C and 280 °C, respectively. A multi-ramp oven temperature program was used. The initial column temperature of 200 °C was held for 1 min, followed by an increase of 20 °C/min to 300 °C and a final isothermal hold of 10 min. The total run time was 16 min. Peaks of interest were identified by comparison with standards (Sigma, Madrid, Spain) and expressed relative to the internal standard.

As noncholesterol sterols (NCS) (cholesterol biosynthetic precursors and phytosterols/plants sterols and stanols) are transported in the plasma by lipoproteins, their concentrations are expressed relative to the concentration of total cholesterol (mmol/mol of cholesterol) to correct for the differing number of lipoprotein acceptor particles. In our study, the cholesterol level used in this normalization was obtained from the same serum sample, based on the TC measured by enzymatic methods for the assessment of the respective plasma lipid profile.

2.5. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using IBM SPSS statistics version 22.0 Inc. (IBM Corporation, New York, USA).

A sample size of 18 individuals was calculated to be necessary to have 80% power to detect a 0.27 mmol/L LDL-C reduction from the PS treatment (5% significance level).

Numerical data are expressed as mean \pm SD for normally distributed variables.

The primary outcome of the study was the difference in LDL-C concentration between intervention at week 3 (t1) and week 6 (t2), and baseline (t0). Secondary outcomes were the change in NCS, TC, HDL-C and TG levels between intervention at week 3 and 6 and baseline. Differences were assessed from the general linear model, using ANOVA, with Bonferroni's post hoc comparison test for localizing significant effects. Correlation analysis was used to investigate associations among outcome measures. $P < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

3. Results

3.1. Participants characterization

Table 2 contains the participants' baseline characteristics.

Fourteen (45.2%) women and one man were obese. Nearly 75% of the participants were prescribed lipophilic statins of moderate-intensity; the majority (N = 20) was taking simvastatin, while six patients were on atorvastatin. Over 85% of the participants were taking antihypertensive medication.

In terms of baseline lipid profile, 68.6% of the patients had LDL-C < 2.59 mmol/L (< 100 mg/dL) (data not shown); in average HDL-C concentrations were between 40 and 50 mg/dL and TG levels below 150 mg/dL (Table 3).

There were no significant differences in BMI values throughout the study in all participants. No side effects were reported resulting from the intake of the PS-FM.

3.2. Effect of intervention treatment on serum cholesterol metabolism markers and lipids

Table 3 presents the absolute change in serum cholesterol metabolism markers and lipid profiles during the intervention period.

Table 2
Baseline participants characteristics.

Variable	All (N = 35)
Age, years	81 \pm 8 (68-92)
Women/Men	31 (88.6)/4 (11.4)
BMI, kg/m ²	29.9 \pm 6.0 (20.1-42.1)
Hypertension	31 (88.6)
Diabetes	12 (34.3)
Stroke	5 (14.3)
PAD	1 (2.9)
MA	2 (5.7)
Statin	
Lipophilic	26 (74.3)
Hydrophilic	9 (25.7)
Concomitant medication	
Aspirin	13 (37.1)
ACEI or ARB	20 (57.1)
Beta blocker	10 (28.6)
Calcium channel blocker	6(17.1)
Diuretics	14 (40.0)
Oral antidiabetic drug	12 (34.3)
Insulin	3 (8.6)

Values are expressed as mean \pm SD, N (%) or range (min-max).

BMI, body mass index; PAD, peripheral arterial disease; MA, (prior) myocardial infarction; ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin II receptor blocker.

Table 3
Absolute change in serum cholesterol homeostasis markers and lipid profiles.

Variable	t0 Baseline	t1 Week 3	Absolute change (0-1)	P value*	t2 Week 6	Absolute change (0-2)	P value*	t3 Washout	Absolute change (0-3)	P value*
Cholesterol synthesis markers, *10 ² mmol/mol of cholesterol										
Desmosterol	7.8 ± 8.6	8.9 ± 8.5	1.0 ± 1.4	0.001	9.9 ± 9.3	1.9 ± 1.6	0.000	12.4 ± 19.4	3.8 ± 9.6	NS
Lathosterol	8.5 ± 3.7	9.5 ± 4.5	0.8 ± 1.9	NS	12.2 ± 5.9	2.8 ± 4.3	0.000	10.9 ± 4.9	1.9 ± 3.8	0.002
Cholesterol absorption markers, *10 ² mmol/mol of cholesterol										
Campesterol	28.3 ± 18.7	40.5 ± 18.8	7.8 ± 14.8	0.000	46.6 ± 21.2	20.5 ± 14.7	0.000	34.9 ± 20.8	6.4 ± 6.1	0.000
Sitosterol	23.6 ± 14.7	35.4 ± 16.9	11.5 ± 7.0	0.000	40.4 ± 18.9	19.9 ± 19.1	0.000	29.7 ± 17.4	6.0 ± 5.7	0.000
Cholestanol	89.2 ± 25.4	82.3 ± 32.2	-3.3 ± 41.8	NS	89.8 ± 29.7	-2.1 ± 39.9	NS	97.2 ± 29.3	13.5 ± 24.9	NS
Synthesis/absorption ratio										
Lathosterol/campesterol	0.44 ± 0.37	0.28 ± 0.18	-0.15 ± 0.23	0.015	0.32 ± 0.22	-0.16 ± 0.29	NS	0.42 ± 0.31	-0.04 ± 0.24	NS
Lathosterol/sitosterol	0.51 ± 0.38	0.32 ± 0.21	-0.18 ± 0.22	0.003	0.38 ± 0.26	-0.19 ± 0.34	0.05	0.49 ± 0.36	-0.05 ± 0.30	NS
Lathosterol/cholestanol	0.13 ± 0.13	0.15 ± 0.11	0.01 ± 0.13	NS	0.16 ± 0.10	0.05 ± 0.19	NS	0.16 ± 0.24	-0.009 ± 0.10	NS
Fasting lipids, mmol/L										
TC	4.31 ± 0.48	4.15 ± 0.45	-0.15 ± 0.47	NS	4.12 ± 0.51	-0.22 ± 0.49	NS	4.41 ± 0.65	0.004 ± 0.56	NS
LDL-C	2.37 ± 0.45	2.20 ± 0.41	-0.15 ± 0.31	0.041	2.14 ± 0.44	-0.27 ± 0.38	0.020	2.39 ± 0.51	-0.035 ± 0.45	NS
HDL-C	1.26 ± 0.33	1.29 ± 0.29	0.03 ± 0.13	NS	1.34 ± 0.37	0.09 ± 0.21	NS	1.33 ± 0.37	0.04 ± 0.17	NS
TG	1.48 ± 0.44	1.45 ± 0.42	-0.07 ± 0.41	NS	1.40 ± 0.42	-1.25 ± 0.39	NS	1.50 ± 0.33	0.005 ± 0.33	NS
Lipid ratios										
TC/HDL-C	3.57 ± 0.73	3.33 ± 0.63	-0.23 ± 0.34	0.009	3.21 ± 0.61	-0.42 ± 0.43	0.000	3.46 ± 0.71	-0.08 ± 0.49	NS
LDL-C/HDL-C	1.99 ± 0.56	1.78 ± 0.47	-0.19 ± 0.23	0.001	1.69 ± 0.48	-0.33 ± 0.29	0.000	1.89 ± 0.53	-0.08 ± 0.40	NS

Values are expressed as mean ± SD.

TC, total cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; TG, triglyceride.

Bold values highlight data with statistical significance.

* P value based on ANOVA from the general linear model.

There was a significant increase of the serum cholesterol precursors, desmosterol and lathosterol, from their baseline levels, after t2 ($P < 0.001$ for both). After t1, only the change in desmosterol levels showed significance ($P < 0.01$ only for desmosterol). One patient showed elevated levels of desmosterol (8.7 times plus in average) comparatively to the rest of the participants (data not shown).

Serum campesterol and sitosterol level ($P < 0.001$) increased from a baseline mean level of 28.3 ± 18.7 and of $23.5 \pm 14.7 \times 10^2$ mmol/mol of cholesterol to 46.6 ± 21.2 and $40.4 \pm 18.9 \times 10^2$ mmol/mol of cholesterol (t0-t2), respectively, after 6 weeks of intervention with 2 g/day of PS-FM.

The mean cholestanol-to-cholesterol ratio decreased during t1 and t2 periods of intake, although without statistical significance.

PS-FM consumption led to an absolute reduction from baseline in serum LDL-C ($P < 0.05$). LDL-C was reduced by 0.15 mmol/L and 0.27 mmol/L (5.8 and 10.4 mg/dL) from baseline, respectively after 3 and 6 weeks of intake. Atherogenic lipid ratios (TC/HDL-C and LDL-C/HDL-C) were also significantly lower after 3 ($P < 0.01$) and 6 weeks ($P < 0.001$) of PS-FM intake. HDL-C levels increased during treatment, but the absolute change from baseline had no statistical significance (Table 3).

Changes between the washout period and baseline were not statistically significant, except for lathosterol ($P < 0.01$), campesterol and sitosterol ($P < 0.001$ for both).

Absolute changes in cholesterol metabolism markers, desmosterol (0-1 and 0-2) and cholestanol (0-2), were positively associated (moderate-to-strong correlation) with concomitant absolute change in LDL-C concentrations (Table 4).

4. Discussion

In this intervention study, the incremental effect on the reduction of serum lipids/lipoproteins with the association PS + statin was calculated by subtracting baseline levels from levels after treatment. The maximum effect was not observed at the end of the first 3-week period (t1), but after six weeks (t2) of 2 g/day of PS-FM intake.

Table 4

Correlations between the absolute change in NCS and the absolute change in serum LDL-C with PS-FM treatment (N = 35).*

NCS (Δ)	Δ LDL-C (0-1)		Δ LDL-C (0-2)	
	r	P	r	P
Desmosterol	0.452**	0.011	0.533**	0.002
Lathosterol	0.237	NS	0.148	NS
Campesterol	0.159	NS	0.024	NS
Sitosterol	0.159	NS	0.027	NS
Cholestanol	0.088	NS	0.602**	0.000

LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; NCS, noncholesterol sterols; NS, not significant.

Bold values highlight data with statistical significance.

* Pearson correlation coefficient.

** Correlation is significant at the 0.01 level.

In terms of the cholesterol synthesis markers, desmosterol and lathosterol, despite the finding by Nissinen and colleagues [23] that lathosterol appeared to be the most reliable surrogate marker for cholesterol synthesis, in our study, the increase in these serum cholesterol precursors only had statistical significance for desmosterol, after the first 3-week period (t1). This situation might arise from the fact that one individual in our study showed surprisingly elevated (8.7 times plus in average) levels of desmosterol, comparatively to the rest of the participants. Waterham et al. [24] found that patients with elevated levels of the cholesterol precursor desmosterol, in plasma, tissue, and cultured cells, have a deficiency of the enzyme 3p-hydroxysterol-delta-24-reductase (DHCR24), which, in cholesterol biosynthesis, catalyzes the reduction of the delta-24 double bond of sterol intermediates.

In our study, the mean concentration of both cholesterol synthesis markers continued to increase after the second 3-week period of intervention (t2), with statistical significance for both desmosterol and lathosterol. Suppression in cholesterol absorption by PS results in lower circulating cholesterol concentrations. As a result, negative feedback of cholesterol on HMG-CoA reductase is inhibited leading to increases in cholesterol synthesis. Thus, the increase of the mean serum levels of the cholesterol precursors,

desmosterol and lathosterol, from their baseline levels, was a reciprocal result from the intervention treatment with PS, based on the fact that there is up-regulation of the opposing pathway, in an apparent compensatory change in cholesterol homeostasis.

In our study, serum campesterol and sitosterol levels ($P < 0.001$) increased from baseline after 3 and 6 weeks of intervention, contributing to the inhibition of cholesterol intestinal absorption. Several molecular mechanisms underlying the lipid-lowering effects of PS have been proposed, but are not yet fully elucidated in humans.

PS have been ascribed atherogenic effects, mainly because atherosclerosis has been encountered in patients with phytosterolemia which is accompanied by extremely high concentrations of PS. Due to the fact that the impact of increased serum concentrations of PS on cardiovascular risk is unclear, Genser et al. [25] conducted a systematic review and meta-analysis (17 studies involving 11 182 subjects) aimed to investigate whether there is an association between (moderately elevated) serum concentrations of campesterol and sitosterol (which together constitute $> 90\%$ of the sterols occurring in diet and circulating blood) and CVD. The study did not yield any evidence of such an association.

PS levels not only reflect cholesterol absorption but also PS intake [26,27] therefore, when intake levels of PS are being manipulated, as in our study, PS should not be used as markers of cholesterol absorption. As an alternative during PS consumption, cholestanol can be used as a marker of cholesterol absorption, as it is not found in PS preparations, and also because serum cholestanol-to-cholesterol ratio correlates with cholesterol absorption [28,29]. In our study, mean cholestanol-to-cholesterol ratio decreased when cholesterol absorption was inhibited with PS. Although this reduction lacked statistical significance, our participants had low baseline levels of hypercholesterolemia and probably, the inclusion of individuals with mild or severe hypercholesterolemia would have resulted in a more pronounced difference between cholestanol baseline levels and levels after treatment.

In the present study, LDL-C reduction, after the two consecutive 3-week periods of combined treatment, confirmed the lipid-lowering effect of the 2 g/day of PS-FM in addition to a statin, in the elderly, with baseline LDL-C levels < 3.35 mmol/L (< 130 mg/dL). Scholle et al. [14] conducted a meta-analysis of randomized controlled trials (8 studies; $n = 306$ patients) to characterize the effect of PS on serum lipids in hypercholesterolemic patients on concurrent statin therapy. Upon meta-analysis, the PS + statin therapy significantly lowered LDL-C (-0.34 mmol/L or -13.26 mg/dL [95% CI, -17.34 to -9.18], $P < 0.001$), but not HDL-C or triglycerides. In our study, serum TC, HDL-C or TG concentrations were not significantly altered by PS-treatment as compared with baseline levels.

Overall, despite the significant LDL-C benefit, there was considerable broad range of variability in observed changes in NCS and lipid concentrations, probably due to the different pharmacokinetic and pharmacodynamic responses of the individual patients, e.g. the pharmacogenetic variability.

Using their own mathematical model (hypothetical male model), McAuley et al. [30] demonstrated that among the two main mechanisms that are at the origin of the cholesterol metabolism dysregulation in aging, (1) alterations in the absorption of cholesterol, and (2) changes in the removal rate of LDL-C from plasma, the second one has a higher impact over the metabolism. In addition, small changes to the number of LDL receptors may result in a significant rise in LDL-C concentration. These authors concluded that a 50–80% increase in the rate of cholesterol intestinal absorption (at the age of 65 years) may result in a 34 mg/dL increase in LDL-C; additionally, a gradual 50% reduction of the rate of hepatic clearance may translate into an increase of LDL-C level up to 116 mg/dL.

In regard to the 6-week washout period, the absolute changes from baseline were not statistically significant, for NCS (with the exception of lathosterol, campesterol and sitosterol), lipid classical parameters and atherogenic lipid ratios. Extended washout duration would have probably been necessary for patients to attain their baseline levels for lathosterol, campesterol and sitosterol.

To our knowledge this is the first study with elderly hypercholesterolemic patients on statin monotherapy in combination with PS-FM treatment, which adds to the small number of studies dedicated to individuals ≥ 65 years old.

Due to the fact that the participants live in elderly nursing units, the strengths of the present study are based on the fact that precise information could be obtained whether statin and PS-FM were actually taken and also the guarantee that patients were on a regular/controlled dietary pattern. In addition, it is plausible to say that this study corresponds to a “worst case scenario”, because LDL-C benefit was accomplished in elderly patients, which are individuals currently polymedicated for several comorbidities commonly associated with drug interactions, and have probable loss of homeostasis, common in later life.

In terms of the study's limitations, besides the fact that it is a study with a small number of participants, there could have been factors contributing to variations in serum NCS levels that were not controlled, such as genetic variability/genotype, and also the use of medication for concomitant diseases that could have influenced cholesterol levels.

In conclusion, in elderly statin-treated patients with baseline LDL-C level < 130 mg/dL, co-administration of a 2 g/day PS-FM effectively improved lipid profiles, e.g. a decrease in LDL-C, and changes in cholesterol metabolism markers levels also suggest that homeostatic mechanisms attempt to compensate for the effects of drug intervention, as proposed by other studies.

Despite the contribution of this study to increase the number of studies on elderly with hypercholesterolemia, it is important to note that there is still a lack of studies in terms of grouped analysis of safety data, for the comparison of efficacy and safety of the association therapy statin + PS versus statin monotherapy, as well as studies confirming clinical positive outcomes from this combined therapy in terms of CVD *major* events, and mortality.

Author contributions

IA, LS and FR designed the research protocol; IA recruited participants, conducted the study and did the GC-MS analyses; IA, LS and FR analyzed data; IA wrote the manuscript and had primary responsibility for its final content. All authors contributed to preparation of the final manuscript.

Funding

No funding.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest.

Acknowledgements

We express our gratitude to the elderly nursing home patients for their participation in the study. We are grateful to Unilever-Jerónimo Martins Lda. (Lisbon, Portugal) for providing the plant sterol-enriched fermented milk in-kind, and in particular to Helena Cid for her assistance. We also thank the lab staff of Laboratório de Análises Clínicas, Pharmacy Faculty, University of Coimbra for their

technical assistance in the determination of lipid profiles, and Ana Valado for the support in blood sampling.

References

- [1] [Trapani L, Segatto M, Pallottini V. New compounds able to control hepatic cholesterol metabolism: is it possible to avoid statin treatment in aged people? World J Hepatol 2013;5\(12\):676-84.](#)
- [2] [Gudmundsson H, Gudbjartsson DF, Frigge M, Gulcher JR, Stefansson K. Inheritance of human longevity in Iceland. Eur J Hum Genet 2000;8:743-9.](#)
- [3] [Korpelainen H. Fitness, reproduction and longevity among European aristocratic and rural Finnish families in the 1700s and 1800s. Proc Biol Sci 2000;267:1765-70.](#)
- [4] Stone NJ, Robinson J, Lichtenstein AH, Merz CNB, Blum CB, Eckel RH, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines. *Circulation* 2014;129:S1-S45. <http://dx.doi.org/10.1161/01.cir.0000437738.63853.7a>.
- [5] [Gudzune KA, Monroe AK, Sharma R, Ranasinghe PD, Chelladurai Y, Robinson KA. Effectiveness of combination therapy with statin and another lipid-modifying agent compared with intensified statin monotherapy. Ann Intern Med 2014;160\(7\):468-76.](#)
- [6] [Marques da Silva P, Massano Cardoso S. Persistent lipid abnormalities in patients treated with statins: Portuguese results of the Dyslipidemia International Study \(DYSIS\). Rev Port Cardiol 2011;30\(01\):47-63.](#)
- [7] [Okada K, Kimura K, Iwahashi N, Tsutomu E, Hideo H, Kazuki F, et al. Clinical usefulness of additional treatment with ezetimibe in patients with coronary artery disease on statin therapy - from the viewpoint of cholesterol metabolism. Circ J 2011;75:2496-504.](#)
- [8] [Blair SN, Capuzzi DM, Gottlieb SO, Nguyen T, Morgan JM, Cater NB. Incremental reduction of serum total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol with the addition of plant stanol ester-containing spread to statin therapy. Am J Cardiol 2000;86:46-52.](#)
- [9] [Eussen SRBM, de Jong N, Rempelberg CJM, Garssen J, Verschuren WMM, Klungel OH. Dose-dependent cholesterol-lowering effects of phytosterol/phytostanol-enriched margarine in statin users and statin nonusers under free-living conditions. Public Health Nutr 2011;14\(10\):1823-32.](#)
- [10] [Simons LA. Additive effect of plant sterol-ester margarine and cerivastatin in lowering low-density lipoprotein cholesterol in primary hypercholesterolemia. Am J Cardiol 2002;90:737-40.](#)
- [11] [Ketomaki A, Gylling H, Miettinen TA. Non-cholesterol sterols in serum, lipoproteins, and red cells in statin-treated FH subjects off and on plant stanol and sterol ester spreads. Clin Chim Acta 2005;353:75-86.](#)
- [12] [de Jong A, Plat J, Lutjohann D, Mensik R. Effects of long-term plant sterol or stanol ester consumption on lipid and lipoproteins metabolism in subjects on statin treatment. Br J Nutr 2008;100:937-41.](#)
- [13] [deJong A, Plat J, Bast A, Godschalk RW, Basu S, Mensik RP. Effect of plant sterol and stanol ester consumption on lipid metabolism, antioxidant status and markers of oxidative stress, endothelial function and low-grade inflammation in patients on current statin treatment. Eur J Clin Nutr 2008;62:263-73.](#)
- [14] [Scholle JM, Baker WL, Talati R, Coleman CI. The effect of adding plant sterols or stanols to statin therapy in hypercholesterolemic patients: systematic review and meta-analysis. J Am Coll Nutr 2009;28\(5\):517-24.](#)
- [15] [Hallikainen M, Kurl S, Laakso M, Miettinen TA, Gylling H. Plant stanol esters lower LDL cholesterol in statin-treated subjects with type 1 diabetes by interfering the absorption and synthesis of cholesterol. Atherosclerosis 2011;217:473-8.](#)
- [16] [Tuikkala P, Hartikainen S, Korhonen MJ, Lavikainen P, Kettunen R, Sulkava R, et al. Serum total cholesterol levels and all-cause mortality in a home-dwelling elderly population: a six-year follow-up. Scand J Prim Health Care 2010;28:121-7.](#)
- [17] WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894. Geneva: World Health Organization; 1998.
- [18] [Allain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin Chem 1974;20:470-5.](#)
- [19] [Jacobs NJ, Van Denmark PJ. The purification and properties of the \$\alpha\$ -glycerophosphate-oxidizing enzyme of *Streptococcus faecalis* 10C1. Arch Biochem Biophys 1960;88:250-5.](#)
- [20] [Riesen WF. Lipid metabolism. In: Thomas I, editor. Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results. Frankfurt/Main: TH Books Verlagsgesellschaft; 1998. p. 171-3.](#)
- [21] [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;18:499-502.](#)
- [22] [Saraiva D, Semedo R, Castilho MC, Silva JM, Ramos F. Selection of the derivatization reagent - the case of human blood cholesterol, its precursors and phytosterols GC-MS analyses. J Chromatogr B 2011;879:3806-11.](#)
- [23] [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;99:370-8.](#)
- [24] [Waterham H, Koster J, Romeijn GJ, Hennekam RCM, Vreken P, Andersson HC, et al. Mutations in the 3 \$\beta\$ -hydroxysterol D²⁴-reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis. Am J Hum Genet 2001;69\(4\):685-94.](#)
- [25] [Genser B, Silbernagel G, De Backer G, Bruckert E, Carmena R, Chapman MJ, et al. Plant sterols and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. Eur Heart J 2012;33:444-51.](#)
- [26] [Miettinen TA, Gylling H, Nissinen MJ. The role of serum noncholesterol sterols as surrogate markers of absolute cholesterol synthesis and absorption. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2011;21:765-9.](#)
- [27] [Mackay DS, Jones P. Limitations of lathosterol to plant sterol ratios and serum plant sterols as surrogate markers for cholesterol absorption during plant sterol supplementation. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2012;22\(9\):e21.](#)
- [28] [Miettinen TA, Tilvis RS, Kesaniemi YA. Serum cholestanol and plant sterol levels in relation to cholesterol metabolism in middle-aged men. Metabolism 1989;38:136-40.](#)
- [29] [Jakulj L, Mohammed H, van Dijk TH, Boer T, Turner S, Groen AK, et al. Plasma plant sterols serve as poor markers of cholesterol absorption in man. J Lipid Res 2013;54:1144-50.](#)
- [30] [McAuley MY, Wilkinson DJ, Jones JLL, Kirkwood TBL. A whole-body mathematical model of cholesterol metabolism and its age-associated dysregulation. BMC Syst Biol 2012;6:130. <http://dx.doi.org/10.1186/1752-0509-6-130>.](#)