

Atividade da Enzima Acetil-Hidrolase do Fator Ativador de Plaquetas (PAF-AH) em Pacientes com Diabetes Melito Tipo 1

Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase (PAF-AH) Activity in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus

Simone Henriques de Castro*, Hugo Caire de Castro Faria Neto**, Marília de Brito Gomes*

*Serviço de Diabetes do Hospital Pedro Ernesto - UERJ e **Laboratório de Imunofarmacologia da FIOCRUZ – Rio de Janeiro, RJ

Resumo

Objetivo: Avaliar a atividade da acetil-hidrolase do fator ativador de plaquetas (PAF-AH) e sua relação com variáveis clinicodemográficas, com o controle metabólico, os níveis de apolipoproteínas A e B e a suscetibilidade da lipoproteína de baixa densidade (LDL) à oxidação *in vitro* em pacientes com DM tipo 1 (DM 1).

Métodos: Foram avaliados 42 pacientes com DM1 (27 mulheres) e 48 não-diabéticos (16 mulheres), pareados por sexo, idade e índice de massa corporal (IMC). Os exames realizados foram: glicemia de jejum (GJ) e pós-prandial (GPP), lipidograma, ácido úrico (AU), hemoglobina glicosilada (HbA1c) e coeficiente de oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) por espectrofotometria. A análise da atividade da PAF-AH foi realizada por espectrofotometria (Cayman Chemical).

Resultados: A análise da atividade da PAF-AH mostrou haver maior atividade enzimática nos pacientes com DM 1 do que nos não-diabéticos ($0,0150 \pm 0,0051$ versus $0,0116 \pm 0,0041$; $p < 0,001$). Nos pacientes com DM 1, encontramos correlação direta entre a atividade da PAF-AH e a idade e a LDL, e inversa entre a PAF-AH e a HbA1c e a lipoproteína de alta densidade (HDL).

Conclusão: A PAF-AH, na amostra estudada, apresentou maior atividade nos pacientes com DM 1, fator que pode estar relacionado ao maior risco de desenvolver doenças cardiovasculares apresentados por portadores dessa doença. Ainda são necessários novos estudos para avaliar a real participação dessa enzima no risco de desenvolvimento das doenças ateroscleróticas nos pacientes com DM 1.

Palavras-chave: PAF-acetilhidrolase, diabetes tipo 1, doenças ateroscleróticas.

Summary

Objective: To evaluate platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity and its relationship with clinical and demographic variables, metabolic control, apolipoprotein A and B levels and the susceptibility of low-density lipoprotein (LDL) to *in vitro* oxidation in patients with type 1 diabetes mellitus (DM 1).

Methods: Forty two patients with DM 1 (27 females) and 48 control subjects (16 females) matched for gender, age and body mass index (BMI) were evaluated. The following tests were performed: fast plasma glucose (FG) and postprandial plasma glucose (PPG), lipid profile, uric acid (UA), glycosylated hemoglobin (HbA1c), and low-density lipoprotein (LDL) oxidation rate using colorimetric assay. The PAF-AH activity was analyzed using colorimetric assay (Cayman Chemical).

Results: The analysis of PAF-AH activity showed a higher enzyme activity in patients with DM 1 than in control subjects (0.0150 ± 0.0051 vs. 0.0116 ± 0.0041 ; $p < 0.001$). In patients with DM 1, a direct correlation between PAF-AH activity and age and LDL, and an inverse correlation between PAF-AH and HbA1c and high-density lipoprotein (HDL) were found.

Conclusion: In the sample studied, PAF-AH showed a higher activity in patients with DM 1, a factor that may be related to the higher risk of developing cardiovascular diseases observed in these patients. Further studies are necessary to evaluate the real participation of this enzyme in the risk of development of atherosclerotic diseases in patients with DM 1.

Key words: PAF-acetylhydrolase, type 1 diabetes, atherosclerotic diseases.

Correspondência: Simone Henriques de Castro •

Rua Maestro Vila Lobos 01/202

20260-220 – Rio de Janeiro, RJ

E-mail: sh.castro@uol.com.br

Artigo recebido em 15/12/05; artigo revisado recebido em 16/03/06; aceito em 11/04/06.

Artigo Original

Introdução

A doença cardiovascular é a principal causa de morbidade e mortalidade no diabetes melito tipo 1 (DM tipo 1), sendo responsável por 44% de todas as mortes de pacientes com DM tipo 1^{1,2}. Diversos métodos foram utilizados para avaliar a presença da doença aterosclerótica nos pacientes com DM tipo 1, evidenciando que a doença coronariana já pode estar presente mesmo em pacientes jovens³⁻⁵.

O processo oxidativo é considerado um componente importante no estágio inicial e na progressão da doença aterosclerótica. A atividade da enzima PAF-AH pode ser protetora nesse processo, já que a associação dessa enzima com a LDL e a HDL previne a formação da molécula de LDL minimamente oxidada *in vitro* e sua internalização pelos macrófagos⁶⁻⁸.

Recentemente, a aterosclerose tem sido considerada uma doença inflamatória crônica. O processo inflamatório contribui significativamente para o início, a progressão e a ruptura das placas ateroscleróticas ricas em lipídios^{9,10}. As células responsáveis pelo dano tecidual associado à inflamação são recrutadas e ativadas por uma série de mediadores, sendo o fator ativador de plaquetas (PAF) um fosfolípido envolvido nesse processo. Pode haver geração de fosfolípidos com atividade pró-inflamatória por meio da fragmentação oxidativa do ácido graxo fosfatidilcolina, o qual é chamado de PAF-like. A atividade biológica do PAF e dos fosfolípidos PAF-like é atenuada pelas enzimas fosfolipases A2 (FLA2)¹¹.

Estudos mostram que as FLA2 estão envolvidas no processo inflamatório e na aterogênese, e que tanto a do tipo II secretória quanto a associada à lipoproteína (PAF-acetilhidrolase/PAF-AH) podem estar relacionadas com risco de doença coronariana^{12,13}. Teoricamente, essa enzima pode promover a aterogênese, se os produtos que ela liberar dos fosfolípidos da LDL tiverem efeito deletério na parede arterial¹⁴; ou pode ser protetora, se ao hidrolisar o PAF reduzir a tendência inflamatória e trombótica do sangue¹⁵. A PAF-AH no plasma está principalmente associada com a LDL (preferencialmente subfração 5); entretanto, uma pequena parcela (< 20% da atividade enzimática) está associada com a HDL (preferencialmente subfração 1)^{16,17}.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade

da PAF-AH e sua relação com variáveis clinicodemográficas, com o controle metabólico, os níveis de apolipoproteínas A e B e a suscetibilidade da lipoproteína de baixa densidade (LDL) à oxidação *in vitro* em pacientes com DM tipo 1, a fim de observar a interferência de variáveis classicamente relacionadas com maior risco de doença cardiovascular nos pacientes com diabetes e esse novo fator estudado.

Métodos

Pacientes - Foram avaliados 50 pacientes com DM1, acompanhados regularmente no ambulatório de Diabetes do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) – UERJ, e 48 não-diabéticos, pareados por sexo, idade e índice de massa corporal (IMC), após assinatura do termo de consentimento previamente aprovado pelo comitê de ética do HUPE. As características clinicodemográficas das duas amostras no momento da coleta dos exames são apresentadas na tabela 1.

Os critérios de exclusão para os diabéticos foram: tabagismo, etilismo, infecção sistêmica e/ou uso de medicamentos que pudessem alterar os resultados da determinação da suscetibilidade do LDL à oxidação, como os inibidores da ECA, sulfato ferroso e complexos vitamínicos e de sais minerais contendo vitaminas C e E e Zn, Se, Fe e Cu, e presença de eventos cardiovasculares prévios, retinopatia e nefropatia diabéticas e neuropatia diabética clínica. No grupo dos não-diabéticos, esses critérios incluíam também a presença de familiares diretos portadores de diabetes melito.

De acordo com os critérios de exclusão, 8 pacientes com diabetes tipo 1 foram excluídos do estudo por apresentarem nefropatia diabética incipiente e/ou retinopatia diabética.

Os participantes foram submetidos a coleta de sangue após 12 horas de jejum e 2 horas após café da manhã, com 400 kcal padronizado em relação à concentração de carboidrato, proteína e gordura. Os exames realizados foram: glicemia de jejum (GJ) e pós-prandial (GPP) (glicose oxidase); colesterol total (CT), colesterol HDL, triglicerídeos (TG) e ácido úrico (AU) por meio de reações colorimétricas com leitura pelo aparelho Cobas-Mira (Roche); hemoglobina glicosilada (HbA1c – HPLC com leitura pelo aparelho Merck Hitachi 9100 – VR 2,6% a 6,2%, e coeficientes de variação intra- e interensaio menor que 1%). A LDL foi calculada pela fórmula de Friedwald¹⁸.

Variáveis	DM 1	Não-diabéticos	p
N	42	48	
Sexo (F/M)	16/26	27/21	-
Idade (anos)	24,3 ± 9,6	24,9 ± 7,8	-
Idade no diagnóstico (anos)	14,6 ± 8,0	-	
Duração da doença (anos)	9,7 ± 7,3	-	
Índice de massa corporal (kg/m ²)	21,8 (15,8 – 29,8)	22,2 (18,5 – 36,2)	-
PAS (mmHg)	110,0 (90,0 – 130,0)	110,0 (90,0 – 148,0)	0,393
PAD (mmHg)	70,0 (50,0 – 90,0)	70,0 (60,0 – 95,0)	0,513

PAS = pressão arterial sistólica; PAD = pressão arterial diastólica

Tabela 1 - Características do grupo de não diabéticos e de DM 1 no momento da coleta dos exames

Foram calculados os índices CT/HDL e LDL/HDL.

Todos os pacientes coletaram 3 amostras de urina noturna em um período de 3 meses, sendo o intervalo mínimo entre elas de 2 semanas. Eles foram orientados a desprezar a urina das 20 horas e coletar toda a urina até 6 horas do dia seguinte para a determinação da taxa de excreção de albumina (EUA). O volume urinário foi alíquotado e estocado em frascos de vidro a 70° C até a análise. A concentração urinária de albumina foi determinada por radioimunoensaio (Diagnostic, California, Estados Unidos, sensibilidade de 0,3 µg/ml) com coeficientes de variação intra- e interensaio de 8,7% and 8,3%, respectivamente. Baseado na EUA, somente os pacientes com normoalbuminúria (EUA < 20 µg/min em duas das três amostras de urina)¹⁹ foram incluídos. Os pacientes com DM 1 foram submetidos a fundoscopia com dilatação das pupilas através de oftalmoscopia pelo mesmo oftalmologista.

Para a análise da suscetibilidade da LDL à oxidação *in vitro*, foram coletados 20 ml de sangue a vácuo em tubos com EDTA, os quais foram centrifugados a 4°C por 20 minutos a 800 x g. Após a separação do plasma, esse foi imediatamente processado para o isolamento da LDL seguindo as etapas descritas: ajuste da densidade para 1,3 g/ml pela adição de brometo de potássio (4,5g de KBr a cada 9 ml de plasma), com posterior preparo dos tubos de ultracentrifugação com 20 ml de solução salina a 0,9% e os 9 ml de plasma anteriormente preparados. Esses tubos foram então centrifugados a 4°C por 3 horas a 150.00 x g. Após a ultracentrifugação, a banda de lipoproteínas com densidade entre 1,019 e 1,063 g/ml, compatível com a da LDL, foi coletada^{20,21}. Esse material teve sua concentração protéica dosada pelo método do Biureto²² e ajustada para 0,2 mg/ml. Ao material obtido foi adicionado sulfato de cobre (CuSO₄) 20 mM na proporção de 1 µl para cada 1 ml de LDL, e essa solução foi colocada em banho a 37°C por 24 horas.

A avaliação da LDL oxidada foi feita de forma indireta mediante o cálculo do coeficiente de oxidação dessa partícula^{23,24}, o qual utiliza em sua fórmula a absorvância em 3 comprimentos de onda da luz UV, a saber: 205 nm, 232 nm e 280 nm. O coeficiente de oxidação foi calculado por meio da seguinte fórmula: Abs 205 – Abs 280 / Abs 232 – Abs

280, onde Abs 205 = leitura das duplas ligações dos ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípidos do LDL; Abs 232 = leitura dos dieno conjugados; e Abs 280 = leitura da fração protéica da LDL.

Resultados

O controle glicêmico dos pacientes estudados estava inadequado e não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de colesterol total e frações dos dois grupos avaliados (tab. 2). Os níveis de ácido úrico e triglicerídeos foram menores nos diabéticos do que nos não-diabéticos [3,65 ± 0,98 mg/dl versus 4,69 ± 1,34 mg/dl; p < 0,001 e 69,00 (26,00-201,00) versus 87,50 (20,00-278,00); p = 0,027 respectivamente].

Os pacientes com DM 1 apresentaram média de coeficiente de oxidação basal da LDL semelhante à dos não-diabéticos. Entretanto, 3h após a adição de CuSO₄ esse coeficiente foi menor no grupo dos diabéticos (6,98 ± 1,36 versus 7,91 ± 1,48; p = 0,007) (fig. 1; tab. 3).

De acordo com o Código de Minnesota, nenhum paciente apresentava doença coronariana possível ou definida ou

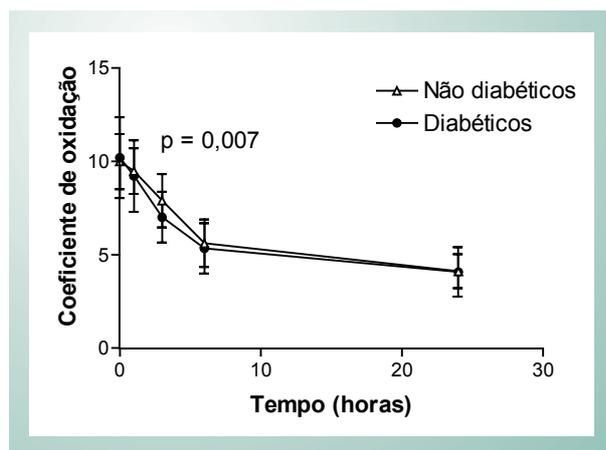


Fig. 1 - Coeficiente de oxidação antes e 1h, 3h, 6h e 24 horas após adição de sulfato de cobre em não diabéticos e em pacientes com diabetes tipo 1.

Variáveis	DM 1	Não-diabéticos	p
GJ (mg/dl)	147,5 (33,0-574,0)	78,0 (57,0-98,0)	-
GPP (mg/dl)	199,0 (91,0-620,0)	95,0 (62,0-147,0)	-
HbA1c (%)	8,9 (4,9 – 15,5)	5,1 (3,1 – 6,0)	-
CT (mg/dl)	169,4 ± 37,7	182,9 ± 41,6	0,113
HDL (mg/dl)	44,5 (21,0 – 67,0)	42,5 (25,0 – 73,0)	0,521
LDL (mg/dl)	104,3 (68,0 – 164,0)	116,2(68,0 – 209,0)	0,204
TG (mg/dl)	69,0 (26,0 – 201,0)	87,5 (20,0 – 278,0)	0,027
AU (mg/dl)	3,6 ± 0,9	4,6 ± 1,3	<0,001
EUA (µg/min)	9,6 (2,2 – 19,2)	3,9 (0,3 – 11,7)	<0,001

GJ = glicemia de jejum, GPP = glicemia pós-prandial, IC = índice de controle, CT = colesterol total, HDL = lipoproteína de alta densidade, LDL = lipoproteína de baixa densidade, TG = triglicerídeos, AU = ácido úrico, EUA = taxa de excreção urinária de albumina.

Tabela 2 - Variáveis de controle metabólico

Artigo Original

Coeficientes de oxidação	DM 1	Não-diabéticos	p
Basal	10,24 ± 2,16	10,04 ± 1,50	0,669
1 hora	9,23 ± 1,95	9,55 ± 1,24	0,424
3 horas	6,98 ± 1,36	7,91 ± 1,48	0,007
6 horas	5,36 ± 1,30	5,68 ± 1,29	0,303
24 horas	3,96 (2,08 – 7,58)	3,95 (2,83 – 6,94)	0,692

Tabela 3 - Coeficiente de oxidação da LDL

infarto do miocárdio possível ou definido.

A análise da atividade da PAF-AH revelou haver maior atividade enzimática nos pacientes com DM 1 do que nos não-diabéticos ($0,0150 \pm 0,0051$ versus $0,0116 \pm 0,0041$; $p < 0,001 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$) (fig. 2).

Ao avaliarmos a correlação entre a atividade da PAF-AH e as demais variáveis nos pacientes com diabetes tipo 1,

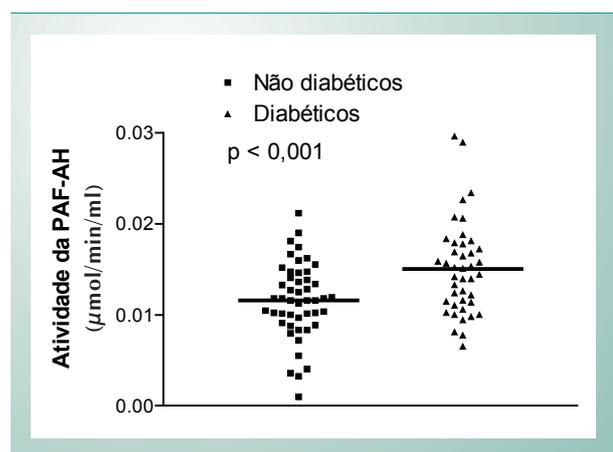


Fig. 2 - Atividade da PAF-AH ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$) em não diabéticos e pacientes com diabetes tipo 1.

observamos dados significativos como: idade ($r = 0,328$; $p = 0,034$), HbA1c ($r = -0,319$; $p = 0,039$), HDL ($r = -0,348$; $p = 0,028$) e LDL ($r = 0,324$; $p = 0,041$) (fig. 3). A regressão múltipla em stepwise utilizando a atividade da PAF-AH com variável dependente e a idade, sexo, IMC, HbA1c, HDL e LDL como variáveis independentes mostrou HDL e LDL como as variáveis independentes explicativas da variação da atividade desta enzima (step 1: $r = 0,231$, $r^2 = 0,053$, $\beta = -0,231$, $p = 0,039$; step 2: $r = 0,316$, $r^2 = 0,100$, $\beta = -0,252$, $p = 0,017$).

Discussão

A literatura é controversa sobre a importância da concentração e atividade da PAF-AH no processo aterosclerótico²⁷⁻³³. Existem estudos demonstrando que pacientes com DM tipo 1 apresentam níveis diminuídos de PAF-AH, diferentemente do que ocorre nos pacientes com DM tipo 2^{27,29}. A literatura correlaciona ainda mudanças na atividade dessa enzima com várias doenças inflamatórias,

incluindo a aterosclerose, e mostrando que essas alterações podem refletir aumento ou diminuição discretos da atividade enzimática. Contudo, ainda não está definido se essas alterações têm impacto na progressão, gravidade e resolução das doenças associadas com elas¹¹.

Com relação aos pacientes com DM tipo 1, Cavallo-Perin e cols.²⁸ não encontraram diferença na atividade da PAF-AH entre grupos de pacientes com DM tipo 1 sem microalbuminúria, com microalbuminúria e não-diabéticos. Apesar de não haver encontrado diferença na atividade da PAF-AH entre os grupos estudados, Cavallo-Perin e cols.²⁸ e Nathan e cols.²⁷ evidenciaram que os níveis de PAF estão elevados nos pacientes com DM tipo 1, e que isso estaria associado basicamente à maior produção dessa partícula. A divergência entre os dados desses autores e os nossos pode refletir as características da população estudada – sendo a nossa amostra de menor faixa etária, sem complicações microvasculares e com menor índice de massa corporal, bem como o tamanho da amostra – 42 diabéticos versus 7 pacientes com microalbuminúria e 7 sem microalbuminúria avaliados por Cavallo-Perin e cols. Essa maior atividade da PAF-AH nos pacientes com DM 1 pode representar uma tentativa de proteção contra os mecanismos fisiopatológicos induzidos pelos níveis aumentados de PAF encontrados nesses pacientes³⁴ ou exercer ações pró-inflamatórias e pró-aterogênicas^{30,32,33}.

A análise do coeficiente de oxidação evidenciou uma maior oxidação da LDL nos diabéticos tipo 1 após 3 horas de adição do agente oxidante do que nos não-diabéticos. Esses dados também são controversos na literatura³⁵⁻³⁸. As diferenças podem ser decorrentes do número de pacientes estudados e da diferença nas características clinicodemográficas desses pacientes. Não houve correlação entre a atividade da PAF-AH e o coeficiente de oxidação, não havendo aparentemente, na amostra estudada, relação entre a maior suscetibilidade da LDL dos pacientes com diabetes à oxidação e o nível de atividade da PAF-AH.

A avaliação das correlações da atividade da PAF-AH nos pacientes com diabetes tipo 1 foi positiva com a idade e com a LDL, e negativa com HbA1c e HDL. Vários estudos demonstraram aumento da atividade dessa enzima com a idade³⁹⁻⁴². A causa desse aumento talvez esteja relacionada com a elevação dos níveis de LDL que acompanha o envelhecimento⁴³, já que há uma significativa correlação entre os níveis de LDL e a atividade da PAF-AH^{42,44-47}. Os dados na literatura confirmam a correlação da atividade desta enzima com o HDL e LDL encontradas em nossa amostra^{16,17}.

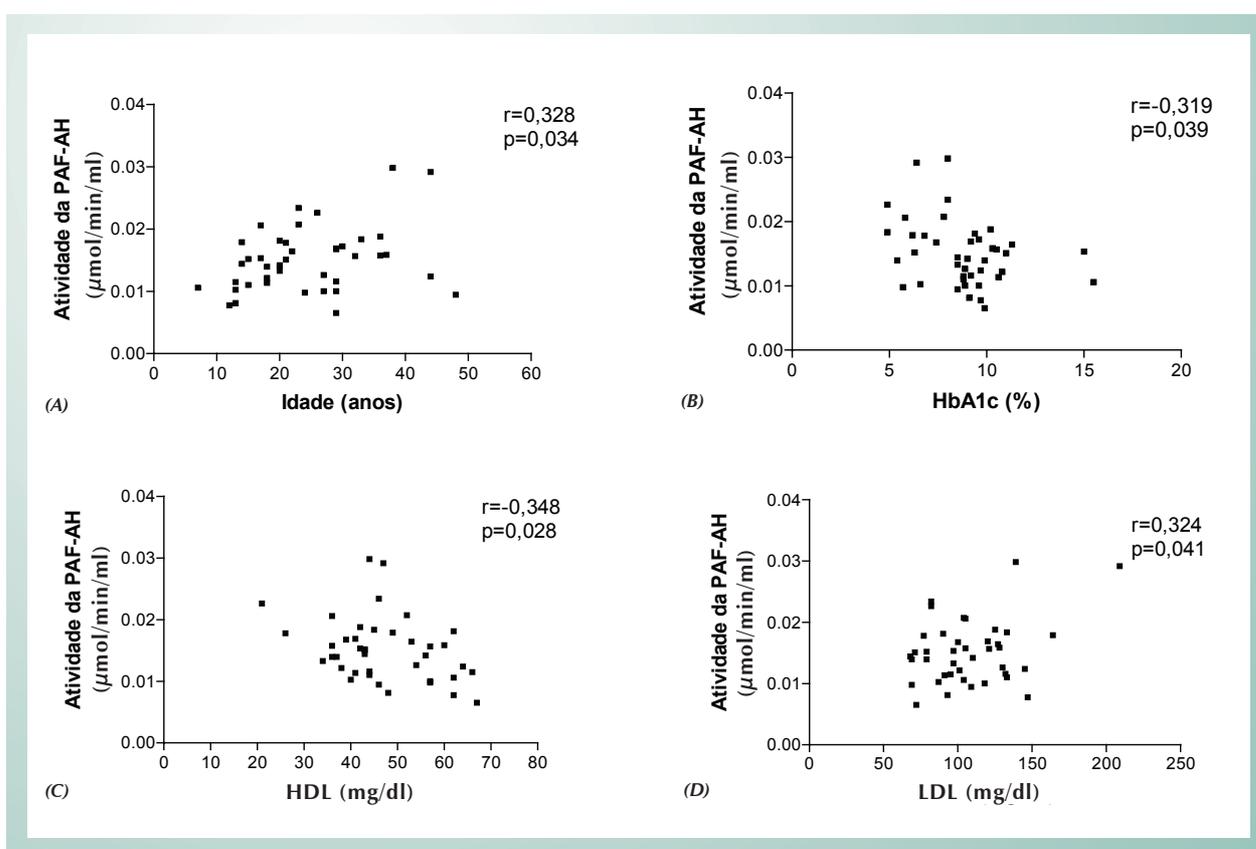


Fig. 3 - Correlação da atividade da PAF-AH com idade (A), HbA1c (B), HDL (C) e LDL (D) em pacientes com diabetes tipo 1.

Nosso trabalho apresentou limitações no que diz respeito ao estudo de outras variáveis associadas com a doença aterosclerótica, como as proteínas de fase aguda, e a realização de outros métodos para avaliação dessa enfermidade em pacientes com DM tipo 1, como a medida do complexo íntima-média da carótida comum⁵.

Considerando-se a multifatorialidade da doença aterosclerótica e a controvérsia a respeito da real função da PAF-AH, a maior atividade dessa enzima nos pacientes com

DM 1 poderia refletir tanto um mecanismo protetor como um marcador de maior risco de doença aterosclerótica. Estudos prospectivos são necessários para definir a associação da PAF-AH com o risco cardiovascular em pacientes com diabetes tipo 1.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflitos de interesses pertinentes.

Referências

1. Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, Botha JL, Burden AC, Waugh NR, et al. The British Diabetic Association Cohort Study II: cause-specific mortality in patients with insulin-treated diabetes mellitus. *Diabet Med.* 1999; 16: 466-71.
2. Morrish NJ, Wang S-L, Stevens LK, Fuller JH, Keen H. The WHO Multinational Study Group: Mortality and causes of death in the WHO multinational study of vascular disease in diabetes. *Diabetologia.* 2001; 44(Suppl 2): S14-S21.
3. McGill HC, McMahan CA, Zieske AW, Tracy RE, Malcom CT, Herderick EE, et al. Association of coronary heart disease risk factors with microscopic qualities of coronary atherosclerosis in youth. *Circulation.* 2000; 102: 374-9.
4. Tuzcu EM, Kapadia SR, Tutar E, Ziada KM, Hobbs RE, McCarthy PM, et al. High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults. *Circulation.* 2001; 103: 2705-10.
5. Järvisalo MJ, Putto-Laurila A, Jartti L, Lehtimäki T, Solakivi T, Ronnemaa T, et al. Carotid artery intima-media thickness in children with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2002; 51: 493-8.
6. Stafforini DM, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. The platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma prevents oxidative modification of low-density lipoprotein. *Trans Assoc Amer Phys.* 1992; 105: 44-63.
7. Watson AD, Navab M, Hama SY, Sevanian A, Prescott SM, Stafforini DM, et al. Effect of platelet-activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1995; 95: 774-82.
8. Stafforini DM, Rollins EN, Prescott SM, McIntyre TM. The platelet activating factor acetylhydrolase from human erythrocytes. Purification and properties.

Artigo Original

- J Biol Chem. 1993; 268: 3857-65.
9. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340: 115-26.
 10. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med.* 2000; 247: 349-58.
 11. Tjoelker LW, Stafforini DM. Platelet-activating factor acetylhydrolases in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1488: 102-23.
 12. Witztum JL, Berliner JH. Oxidized phospholipids and isoprostanes in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 1998; 9: 441-8.
 13. Packard CJ, O'Reilly DSJ, Caslake MJ, McMahon AD, Ford I, Cooney J, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2000; 343: 1148-55.
 14. Macphee CH, Moores KE, Boyd HF, Dhanak D, Ife RJ, Leach CA, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *Biochem J.* 1999; 338: 479-87.
 15. Berliner J, Leitinger N, Watson A, Huber J, Fogelman A, Navab M. Oxidized lipids in atherogenesis: formation, destruction and action. *Thromb Haemost.* 1997; 78: 195-9.
 16. Tselepis AD, Chapman MJ. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler Suppl.* 2002; 3: 57-68.
 17. Tselepis AD, Dentan C, Karabina S-AP, Chapman MJ, Ninio E. PAF-degrading acetylhydrolase is preferentially associated with dense LDL and VLDL-1 in human plasma. Catalytic characteristics and relation to the monocyte-derived enzyme. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15: 1764-73.
 18. Friedwald WT, Levy R, Fredrickson DS. Estimations of serum low density lipoprotein cholesterol without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18: 499-502.
 19. Mogensen CE, Keane WF, Bennett PH, Jerumus G, Parving HH, Passa P, et al. Prevention of diabetic renal disease with special reference to microalbuminuria. *Lancet.* 1995; 346: 1080-4.
 20. Chung BH, Wilkinson T, Geer JC, Segrest JP. Preparative and quantitative isolation of plasma lipoproteins: rapid, single discontinuous density gradient ultracentrifugation in a vertical rotor. *J Lipid Res.* 1980; 21: 284-91.
 21. Heery JM, Kozak M, Stafforini DM, Jones DA, Zimmerman GA, McIntyre TM, et al. Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1995; 96: 2322-30.
 22. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J Biol Chem.* 1949; 177: 751-66.
 23. Kim BS, LaBella FS. Comparison of analytical methods for monitoring autoxidation profiles of authentic lipids. *J Lipid Res.* 1987; 28: 1110-7.
 24. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biol Med.* 1992; 13: 341-90.
 25. Rose GA, Blackburn H, Gillum RF, Prineas RJ. Cardiovascular survey methods. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 1982.
 26. Howard BV, Lee ET, Cowan LD, Fabsitz RR, Howard WJ, Oopik AJ, et al. Coronary heart disease prevalence and its relation to heart disease in American Indians: the Strong Heart Study. *Am J Epidemiol.* 1995; 142: 254-68.
 27. Nathan N, Denizot Y, Huc MC, Claverie C, Laubie B, Benveniste J, et al. Elevated levels of paf-acether in blood of patients with type 1 diabetes mellitus. *Diabete Metab.* 1992; 18: 59-62.
 28. Cavallo-Perin P, Lupia E, Gruden G, Olivetti C, De Martino A, Cassader M, et al. Increased blood levels of platelet-activating factor in insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15: 994-9.
 29. Memon RA, Saeed SA, Jabbar A, Jafri A, Gilani AH, Saleem S, et al. Altered platelet activating factor metabolism in insulin dependent diabetes mellitus. *J Pak Med Assoc.* 1995; 45: 122-5.
 30. Macphee CH, Moores KE, Boyd HF, Dhanak D, Ife RJ, Leach CA, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *Biochem J.* 1999; 338: 479-89.
 31. Itabe H. Oxidized phospholipids as a new landmark in atherosclerosis. *Prog Lipid Res.* 1998; 37: 181-207.
 32. Karabina SA, Elisaf M, Bairaktari E, Tzallas C, Sianopoulos KC, Tselepis AD. Increased activity of platelet-activating factor acetylhydrolase in low-density lipoprotein subfractions induces enhanced lysophosphatidylcholine production during oxidation in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest.* 1997; 27: 595-602.
 33. Murakami M, Kudo I. Phospholipase A2. *J Biochem.* 2002; 131: 285-92.
 34. Howard KM, Miller JE, Miwa M, Olson MS. Cell-specific regulation of expression of plasma-type platelet-activating factor acetylhydrolase in the liver. *J Biol Chem.* 1997; 272: 27543-8.
 35. Tsai EC, Hirsch IB, Brunzell JD, Chait A. Reduced plasma peroxy radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. *Diabetes.* 1994; 43: 1010-4.
 36. Liguori A, Abete P, Hayden JM, Cacciatore F, Rengo F, Ambrosio G, et al. Effect of glycaemic control and age on low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in diabetes mellitus type 1. *Eur Heart J.* 2001; 22: 2075-84.
 37. Jenkins AJ, Klein RL, Chassereau CN, Hermayer KL, Lopes-Virella MF. LDL from patients with well-controlled IDDM is not more susceptible to in vitro oxidation. *Diabetes.* 1996; 45: 762-7.
 38. Castro SH, Castro-Faria-Neto HC, Clemente ELS, Gomes MB. Avaliação da suscetibilidade do LDL de pacientes com diabetes tipo 1 à oxidação in vitro e sua relação com o controle glicêmico. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004; 48: 513-7.
 39. Satoh K, Imaizumi T, Yoshida H, Kawamura Y, Takamatsu S, Takamatsu M, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase in plasma lipoproteins of healthy men and women. *Clin Chim Acta.* 1991; 202: 95-103.
 40. Kosaka T, Yamaguchi M, Miyanaaga K, Mizuno K. Serum platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity in more than 3000 healthy Japanese. *Clin Chim Acta.* 2001; 312: 179-83.
 41. Stafforini DM, Numao T, Tsodikov A, Vaitkus D, Fukuda T, Watanabe N, et al. Deficiency of platelet-activating factor acetylhydrolase is a severity factor for asthma. *J Clin Invest.* 1999; 103: 989-97.
 42. Guerra R, Zhao B, Mooser V, Stafforini DM, Johnston JM, Cohen JC. Determinants of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: heritability and relationship to plasma lipoproteins. *J Lipid Res.* 1997; 38: 2281-8.
 43. Mormando RM. Lipid levels: applying the second National Cholesterol Education Program report to geriatric medicine. *Geriatrics.* 2000; 55: 48-53.
 44. Tew DG, Southan SQ, Rice MP, Lawrence MP, Li H, Boyd HF, et al. Purification, properties, sequencing, and cloning of a lipoprotein, associated, serine-dependent phospholipase involved in the oxidative modification of low-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16: 591-9.
 45. Satoh K, Imaizumi TA, Kawamura Y, Yoshida H, Takamatsu S, Takamatsu M. Increased activity of the platelet-activating factor acetylhydrolase in plasma low density lipoprotein from patients with essential hypertension. *Prostaglandins.* 1989; 37: 673-82.
 46. Satoh K, Yoshida H, Imaizumi TA, Takamatsu S, Mizuno S. Platelet-activating factor acetylhydrolase in plasma lipoproteins from patients with ischemic stroke. *Stroke.* 1992; 23: 1090-2.
 47. Graham RM, Stephens CJ, Sturm MJ, Taylor RR. Plasma platelet-activating factor degradation in patients with severe coronary artery disease. *Clin Sci.* 1992; 82: 535-41.