



VITOR WILSON DE MOURA VIRGINIO

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE OXISTERÓIS EM
ATEROMAS E PLASMA DE INDIVÍDUOS COM DOENÇA ARTERIAL
PERIFÉRICA OCLUSIVA SUBMETIDOS À CIRURGIA DE
AMPUTAÇÃO

*IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF OXYSTEROLS IN
ATHEROMAS AND PLASMA OF INDIVIDUALS WITH OCCLUSIVE
PERIPHERAL ARTERIAL DISEASE SUBMITTED TO AMPUTATION
SURGERY*

CAMPINAS
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

VITOR WILSON DE MOURA VIRGINIO

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE OXISTERÓIS EM ATEROMAS E
PLASMA DE INDIVÍDUOS COM DOENÇA ARTERIAL PERIFÉRICA OCLUSIVA
SUBMETIDOS À CIRURGIA DE AMPUTAÇÃO

*IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF OXYSTEROLS IN ATHEROMAS
AND PLASMA OF INDIVIDUALS WITH OCCLUSIVE PERIPHERAL ARTERIAL
DISEASE SUBMITTED TO AMPUTATION SURGERY*

ORIENTAÇÃO: PROF. DR. ANDREI CARVALHO SPOSITO
COORIENTAÇÃO: PROFA. DRA. ELIANA COTTA DE FARIA

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Mestre em
Ciências na área de concentração Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR VITOR WILSON DE
MOURA VIRGINIO, E ORIENTADO PELO PROF. DR.
ANDREI CARVALHO SPOSITO.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2014

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

V819i Virginio, Vitor Wilson de Moura, 1989-
Identificação e quantificação de oxisteróis em ateromas e plasma de indivíduos com doença arterial periférica oclusiva submetidos à cirurgia de amputação / Vitor Wilson de Moura Virginio. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Andrei Carvalho Sposito.

Coorientador: Eliana Cotta de Faria.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Oxisterol. 2. Aterosclerose. 3. 24S-hidroxicolesterol. 4. 25-hidroxicolesterol. 5. 27-hidroxicolesterol. I. Sposito, Andrei Carvalho. II. Faria, Eliana Cotta de, 1950-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Identification and quantification of oxysterols in atheromas and plasma of individuals with occlusive peripheral arterial disease submitted to amputation surgery

Palavras-chave em inglês:

Oxysterol

Atherosclerosis

24S-hydroxycholesterol

25-hydroxycholesterol

27-hydroxycholesterol

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Banca examinadora:

Andrei Carvalho Sposito [Orientador]

José Carlos Quinaglia e Silva

Orlando Petrucci Junior

Data de defesa: 22-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

VITOR WILSON DE MOURA VIRGINIO

ORIENTADOR: PROF. DR. ANDREI CARVALHO SPOSITO

COORIENTADORA: PROF. DR. ELIANA COTTA DE FARIA

MEMBROS:

1. PROF. DR. ANDREI CARVALHO SPOSITO _____

2. PROF. DR. JOSE CARLOS QUINAGLIA E SILVA _____

3. PROF. DR. ORLANDO PETRUCCI JUNIOR _____

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

Data: 22 de julho de 2014

Dedico esse trabalho aos meus queridos pais Walkiria e José Vitor Virginio por tornar possível a realização dos meus sonhos e me inspirar ser uma pessoa cada vez melhor.

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento e respeito...

Ao Prof. Dr. Andrei Carvalho Sposito e à Prof^a. Dr^a. Eliana Cotta de Faria por proporcionar nesses quase 4 anos de proximidade, uma ótima aquisição de conhecimento, experiência profissional e pela excelente orientação na pesquisa desde a iniciação científica até o mestrado.

À Dr. Valéria Sutti Nunes do Laboratório de Lípidos da FMUSP pela amizade e excelente supervisão nas análises de oxisteróis em todo material biológico do projeto.

Ao Laboratório de Lípidos (LIM-10) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP coordenado pela Dr^a. Edna Nakandakare.

Ao colaborador do projeto Prof. Dr. Fabio Hüsemann Menezes do Departamento de Cirurgia, área de Moléstias Vasculares do Hospital de Clínicas (HC) da UNICAMP juntamente com os residentes Dr^a Priscila Falsarella, Dr. Daniel Siqueira, Dr. Alex Cantador, Dr^a Susyanne Cosme, Dr. Moisés de Souza e Dr^a Andréia Marques, pelo valioso apoio no recrutamento de pacientes e nas coletas de artérias com ateromas.

À colaboração do Prof. Dr. Nelson Adami Andreollo do Departamento de Cirurgia da área de Moléstias do Aparelho Digestivo do HC-UNICAMP juntamente com o Dr. João Coelho Neto, Dr. Valdir Terciotti Jr. e o residente Dr. André Vedan, pelo precioso auxílio no recrutamento de pacientes e coletas de artérias controles.

Ao colaborador Prof. Dr. Fabio Rogério do Departamento de Anatomia Patológica do HC-UNICAMP, pela contribuição na classificação histológica dos ateromas e pelo conhecimento adquirido na área da histologia e fisiologia.

Aos amigos do Laboratório de Lípidos da FCM-UNICAMP, Felipe, Natália, Vanessa, Eliane, Daniel, Érica, Carminha, Cidinha, Tais, Isabela, Fernanda, João, Carol, e companhia pelo compartilhamento de conhecimento, diversas ajudas, distrações, conversas, etc.

Aos funcionários da Patologia Clínica, setor de Bioquímica e demais do HC, e Laboratório de lípidos-FCM da UNICAMP, pelas cooperações em diversos passos da pesquisa.

À Simone Mesquita funcionária da Patologia Clínica setor de Bioquímica, pela primordial colaboração com o estudo, auxiliando na coleta de sangue dos pacientes, com os sistemas internos do HC-UNICAMP e mostrando sempre um entusiasmo com a ciência.

À ajuda dada de qualquer forma dos enfermeiros da UTI, ambulatorios e pronto socorro do HC-UNICAMP.

Aos amigos do LIM-10 da FMUSP Milessa, Karol, Eliton, Diego, Paula, Rodrigo e companhia, por compartilhar conhecimentos, apoiar, distrair e facilitar os dias e noites de experimentos em São Paulo.

Aos meus pais José Vitor Virginio e Walkiria Ap. de Moura Virginio por tudo.

Aos meus irmãos Evelyn Moura Virginio Martins e João Vitor de Moura Virginio, meu cunhado Rafael Martins, pelo acolhimento oferecido em qualquer momento, pelas sinceras palavras e por trazer paz.

Aos meus amigos e parentes por acreditarem em meu potencial e por todo apoio, acolhimento, compreensão, distrações, etc.

Aos pacientes participantes da pesquisa que contribuíram de maneira decisiva para a realização desse estudo. E meus pêsames aos familiares nos casos de óbitos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela bolsa e apoio financeiro concedido ao projeto.

***“A vida sem luta é um mar morto no
centro do organismo universal.”***

Machado de Assis

RESUMO

Atualmente aproximadamente 17 milhões de pessoas morrem por doenças cardiovasculares (DCV). No Brasil durante 2011 ocorreram cerca de 200 mil óbitos por DCV principalmente em decorrência da aterosclerose, classificada como uma doença imuno-inflamatória crônica que causa estreitamento luminal e gera diversas fatalidades como infarto agudo do miocárdio (IAM), acidente vascular encefálico (AVE), doença arterial periférica (DAP), entre outras. A DAP prediz outras DCV e é a principal causa de amputação devido a obstrução das artérias de membros inferiores. Análises histológicas indicam que a ruptura da placa, capa fibrosa do ateroma, erosão da placa e nódulo calcificado geram as principais fatalidades nas DCV. Até o momento não há biomarcadores plasmáticos para uso clínico afim de avaliar a estabilidade e a gravidade das placas ateroscleróticas, esse fato motiva a exploração de componentes envolvidos em doenças imuno-inflamatórias e no metabolismo lipídico tais como oxisteróis e marcadores da síntese e absorção do colesterol (MSAC). Os oxisteróis, principalmente 27-hidroxicolesterol (27-HDC) e 7-ketocolesterol estão envolvidos em mecanismos fisiopatológicos da aterosclerose e desempenham um papel na inflamação, citotoxicidade e necrose, além de funções no metabolismo lipídico. É relatado que os oxisteróis 24S- e 25-hidroxicolesterol (24S- e 25-HDC) estão envolvidos em doenças neurodegenerativas como Alzheimer. Estudos apontam uma causa em comum entre Alzheimer e aterosclerose, ambas são doenças inflamatórias crônicas, assim são necessárias mais investigações desses oxisteróis na doença aterosclerótica. A proteína de transferência de éster de colesterol (CETP) e proteína de transferência de fosfolípides (PLTP), assim como as lipoproteínas, podem mediar a transferência desses lípides. O objetivo desse trabalho foi quantificar concentrações de oxisteróis (24S-, 25-, 27-HDC e 7-ketocolesterol) e marcadores de síntese (desmosterol e latosterol) e absorção (β -sitosterol e campesterol) do colesterol em ateromas e plasma de 10 indivíduos com DAP (grupo DAP) e comparar com artérias sem ateroma de 13 voluntários (grupo CTL). Também relacionar esses esteróis com outros parâmetros como histórico clínico e proteínas de transferência de lípides. Foram realizadas análises clínicas e bioquímicas, classificações histológicas dos ateromas e quantificações de esteróis em artérias e plasma. Para interpretação dos dados obtidos foram usados testes estatísticos de comparação e correlação. Os dois grupos apresentaram uma similaridade nos dados clínicos e bioquímicos, diferenciando apenas em pressão arterial sistólica, atividade da PLTP, glicose e proteína C reativa (PCR), maiores no grupo DAP. A PCR se correlacionou positivamente com 24S-HDC, 25-HDC e 27-HDC plasmáticos. Comparação entre os grupos em relação a concentração de oxisteróis em artérias mostraram o 24S-HDC e o 27-HDC maiores no ateroma do grupo DAP, curiosamente o 25-HDC esteve maior em CTL. Quantificações de oxisteróis em plasma do grupo DAP mostrou um aumento do 25-HDC em relação ao grupo CTL. Não houve diferença significativa para os MSAC. Os ateromas classificaram-se em 50% ruptura da placa, 20 % capa fibrosa do ateroma, 10% nódulo calcificado e 10% lesão fibrocálcica. Em conclusão mostramos o acúmulo do 24S-HDC em placas de aterosclerose. O 27-HDC assim como outros estudos esteve em maior concentração nos ateromas indicando fortemente sua ação na patogênese dessa doença. Todos os oxisteróis sintetizados enzimaticamente dosados em plasma se correlacionaram positivamente com atividade inflamatória sistêmica, assim como 24S-HDC e 27-HDC em ateromas. Finalmente a atividade da PLTP esteve maior no grupo DAP.

Palavras-chave: Oxisterol, Aterosclerose, 24S-hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, 27-hidroxicolesterol

ABSTRACT

Currently around 17 million people die from cardiovascular diseases (CVD). In Brazil, during 2011 nearly 200,000 deaths occur mainly due atherosclerosis, classified as a chronic, immune-inflammatory disease that causes luminal narrowing and generates several outcomes as myocardial infarction, cerebrovascular accidents (stroke), peripheral arterial disease (PAD) and others. PAD predict other CVDs and is the leading cause of amputation due the clogged arteries in inferior members. Histological analysis indicates that plaque rupture, fibrous cap atheroma, plaque erosion and calcified nodules generate major CVD fatalities. So far, no plasma biomarkers for clinical use are available in order to evaluate the stability and extend of atherosclerotic plaques, therefore is necessary the investigation of the components involved in immune-inflammatory diseases and lipids metabolism such as oxysterols and cholesterol synthesis and absorption markers (CSAM). Oxidized sterols or oxysterols, mainly 27-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol are involved in pathophysiological mechanisms of atherosclerosis and play a role in inflammation, apoptosis, necrosis and cytotoxicity, in addition to lipid metabolism. Oxysterols 24S- and 25-hydroxycholesterol are involved with neurodegenerative diseases such Alzheimer's and resemble with atherosclerosis development since are chronic inflammatory diseases, for this reason is necessary an investigation of these oxysterols in atherosclerosis is needed. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) and phospholipid transfer protein (PLTP) as well as lipoproteins, could mediate the transfer of the oxysterols. The aim of this work was quantified the levels of oxysterols (24S-, 25-, 27- hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol) and cholesterol synthesis (desmosterol and lathosterol) and absorption markers (β -sitosterol and campesterol) in atheroma and plaques from 10 individuals with PAD (PAD group) and compare with arteries without atheroma of 13 volunteers (CTL group). Also, relate these sterols with other parameters as clinical history, lipid transfer proteins and histological scores. Clinical and biochemical data were collected and sterols were quantified in arteries and plasma by gas chromatography coupled to a mass spectrophotometer (GCMS) and histological atheroma classification were determined. Comparison analysis were performed using Mann-Whitney and correlations by Spearman's test. Both groups were not different regarding clinical and biochemical data, differing only for systolic blood pressure, alcohol intake, PLTP activity, glucose and CRP, increased in PAD group. CRP was positively correlated with 24S-HDC, 25-HDC e 27-HDC from plasma. The comparisons of oxysterols levels in atheroma showed that 24-HDC and 27-HDC were increased in PAD group; interestingly, the 25-HDC was higher in CTL group. No significant differences were observed for CSAM between groups. The atheroma were classified as 50% plaque rupture, 20% fibrous cap, 10% calcified nodules and 10% of fibrocalcific injury. From the oxysterols from plasma of PAD group, only 25-HDC was increased compared to the CTL group. In conclusion, we demonstrated the accumulation of 24S-HDC in atherosclerotic plaques. The 27-HDC, as well as other studies, present higher levels in atheroma's, strongly indicating its role in the disease pathogenesis. All oxysterols measured in plasma were positively correlated with the systemic inflammatory activity. Finally, all atherosclerotic plaques were classified as lesions of advanced extension, according to the histological analysis.

Keywords: Oxysterol, Atherosclerosis, 24S-hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol, 27-hydroxycholesterol

Lista de Figuras e de Tabelas

Figura 1: Esquema da formação da placa de aterosclerose.....	22
Figura 2: Esquema da síntese do colesterol endógeno.....	26
Figura 3: Imagem histológica da ruptura da placa.....	27
Figura 4: Imagem histológica da capa fibrosa do ateroma.....	27
Figura 5: Imagem histológica da erosão da placa.....	28
Figura 6: Imagem histológica do nódulo calcificado.....	28
Figura 7: Imagem histológica da lesão fibrocalcificada.....	29
Figura 8: Esquema da formação dos oxisteróis.....	34
Tabela 1: Oxisteróis associados às doenças adaptado de Jasakul <i>et al</i> (2011).....	32
Tabela 2: Classificação histológica de Virmani <i>et al</i> (2000).....	40
Tabela 3: Classificação histológica de Stary <i>et al</i> (1994 e 1995).....	41
Tabela 4: Comparações clínicas e antropométricos dos voluntários.....	47
Tabela 5: Comparações bioquímicas dos voluntários.....	48
Tabela 6: Comparações hematológicas dos voluntários.....	49
Tabela 7: Comparação da concentração de oxisteróis em plasma e artérias dos voluntários.....	50
Tabela 8: Correlação de parâmetros bioquímicos plasmáticos (CTL + DAP) n= 23.....	51
Tabela 9: Comparação da concentração de marcadores de síntese e absorção do colesterol em plasma e artérias.....	52
Tabela 10: Classificação histológica dos ateromas.....	53

Listas de Abreviaturas

- ¹⁴C-HDL:** lipoproteína de alta densidade marcado com carbono 14
- 24S-HDC:** 24S-hidroxicolesterol
- 25-HDC:** 25-hidroxicolesterol
- 27-HDC:** 27-hidroxicolesterol
- 7HC:** 7 α / β -hidroxicolesterol
- 7-Keto:** 7-ketocolesterol
- 7OOHC:** 7 α / β -hidroperoxicolesterol
- ABCA1:** ATP-binding cassette A1
- ABCG5:** ATP-binding cassette G5
- ABCG8:** ATP-binding cassette G8
- ACAT:** acetyl coenzyme A acetyltransferase
- ACAT2:** acetyl coenzyme A acetyltransferase 2
- AG:** ácido graxo
- AGPI:** ácidos graxos poliinsaturados
- AHA:** american heart association
- AP-1:** activator protein 1 (proteína ativadora 1)
- Apo:** apolipoproteína
- Apo-A1:** apolipoproteína-A1
- Apo-B:** apolipoproteína-B
- Apo-B100:** apolipoproteína-B100
- Apo-B48:** apolipoproteína-B48
- Apo-CII:** apolipoproteína-CII
- Apo-CIII:** apolipoproteína-CIII
- Apo-E:** apolipoproteína-E
- AVE:** acidente vascular encefálico
- BHT:** Butylated hydroxytoluene (butil-hidroxitolueno)
- BSTFA:** N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida
- CD:** cluster of differentiation (grupamento de diferenciação)
- CETP:** cholesteryl ester transfer protein (proteína de transferência de éster de colesterol)
- Ci:** Curie (unidade de atividade radioativa)

CML: células do musculo liso

Col: colesterol

COO•: peroxila colesterol

CT: colesterol total

CTL: controle

CYP27A1: esterol 27-hidroxilase

CYP46A1: colesterol 24-hidroxilase

CYP7A: colesterol 7 α -hidroxilase

DAC: doença arterial coronariana

DAP: doença arterial periférica

DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica

DVC: doença cardiovascular

EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

GC: gas chromatography (cromatografia gasosa)

GOD: gastro-omental direita

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HAEC: human aortic endothelial cell (célula endotelial aórtica humana)

HbA1c: hemoglobina glicosilada

HDL: high density lipoprotein (lipoproteína de alta densidade)

HDL-C: high density lipoprotein cholesterol (lipoproteína de alta densidade colesterol)

HE: hematoxilina e eosina

HMG-CoA: hidroxí-3-methyl-glutaril coenzyme A

HPLC: high performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta performace)

IAM: infarto agudo do miocardio

IC: isquemia crítica

IDL: intermediate density lipoprotein (lipoproteína de densidade intermediária)

IL-8: interleucina 8

IMC: índice de massa corpórea

INSIG: gene induzido por insulina

KOH: hidróxido de potássio

LCAT: lecithin cholesterol acyltransferase (lecitina colesterol aciltransferase)

LDL: low density lipoprotein (lipoproteína de baixa densidade)

LDL-C: low density lipoprotein cholesterol (lipoproteína de baixa densidade colesterol)

LDLox: lipoproteína de baixa densidade oxidada

LH: lipase hepática

Lp(a): lipoproteína (a)

LPL: lipoproteína lipase

LXR: liver X receptor (receptor x do fígado)

MHC: major histocompatibility complex (complexo principal de histocompatibilidade)

MSAC: marcadores de síntese e absorção do colesterol

NF- κ B: factor nuclear kappa B

NO: nitric oxide (óxido nítrico)

NPC1-L1: niemann-pick C1-like1

O₂^{•-}: ânion superóxido

OAT2: organic anion transporter 2 (transportador de ânion orgânico 2)

P450: citocromo P450

PAD: pressão arterial diastólica

PAS: pressão arterial sistólica

PBS: phosphate buffered saline (tampão fosfato salino)

PCR: proteína C reativa

PLTP: phospholipid transfer protein (proteína de transferência de fosfolípidos)

PON: paraoxonase

RBC: red blood cell (células vermelhas do sangue)

RO[•]: alcoxila

ROO[•]: peroxila

rpm: rotações por minuto

SCAP: proteína de ativação de clivagem da SREBP

SMC: smooth muscle cell (células do músculo liso)

SREBP: sterol regulatory element-binding proteins (proteína de ligação a elemento regulador de esterol)

SREBP-1C: proteína de ligação a elemento regulador de esterol-1C

SUS: sistema único de saúde

TGF- β 1: transforming growth factor beta 1 (fator de transformação do crescimento beta 1)

THP-1: linhagem celular monocítica humana

TIMP-1: tecido inibidor de metaloproteinase 1

TMCS: trimetilclorosilane

TNF- α : tumor necrosis factor α (fator de necrose tumoral alpha)

TRC: transporte reverso de colesterol

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule1 (molécula 1 de adesão da célula vascular)

VLDL: very low density lipoprotein (lipoproteína de muito baixa densidade)

WBC: white blood cell (células brancas do sangue)

WvG: Weigert - van Gieson

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Doença Cardiovascular aterosclerótica	19
1.2 Metabolismo de lipoproteínas plasmáticas	23
1.3 Marcadores de síntese e absorção do colesterol	25
1.4 Classificação morfológica e histológica da aterosclerose	26
1.5 Doença arterial periférica	29
1.6 Biomarcadores: oxisteróis em aterosclerose	30
1.6 Síntese de oxisteróis	32
2. OBJETIVOS	35
3. MÉTODOS	37
3.1 Casuística	38
3.2 Materiais biológicos	38
3.3 Técnicas de preparo de lâminas e classificações histológicas	39
3.4 Análises bioquímicas	42
3.5 Atividade da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP)	42
3.6 Atividade da proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP)	43
3.7 Extrações de oxisteróis em artérias e plasma	43
3.8 Extrações de marcadores de síntese e absorção de colesterol em artérias e plasma	44
3.9 Análises Estatísticas	45
4. RESULTADOS	46
4.1 Parâmetros antropométricos e bioquímicos	47
4.2 Oxisteróis em plasma e artérias	49
4.3 Marcadores de síntese e absorção do colesterol em ateroma e plasma	51
4.4 Classificações histológica dos ateromas do grupo DAP	53
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÃO	63
7. REFERÊNCIAS	65
ANEXOS	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença Cardiovascular aterosclerótica

Por pelo menos cinco milênios o processo aterosclerótico tem atingido os seres humanos, como evidenciado pela técnica de tomografia computadorizada realizada na múmia Ötzi, uma das mais antigas do mundo [1]. Outro estudo realizado em 137 múmias com mais de 4000 mil anos de idade mostraram a presença de ateromas nas artérias carótidas, coronárias, aortas, ilíacas, femorais, poplíteas e tibiais. Tais evidências indicam que apesar de ser uma doença moderna em relação a sua compreensão fisiopatológica e aos hábitos de vida da população, há uma comum predisposição para o desenvolvimento da aterosclerose em seres humanos [2].

Em 1790, Edward Jenner, inventor da vacina para varíola, foi o primeiro a descrever uma placa de aterosclerose. Em relato, quando examinava o coração de um cadáver, a fim de encontrar uma justificativa para sua morte súbita, se deparou com uma parte dura semelhante a pequenas pedras após um corte transversal com bisturi próximo a base do coração. Então olhou para o teto pensando que algo poderia ter caído, mas verificando melhor percebeu a causa da morte do indivíduo: as coronárias haviam se transformado em canais ósseos [3].

Dados de 2011 demonstraram que em todo o mundo 17 milhões de pessoas morreram em função de doenças cardiovasculares (DCV), principalmente em decorrência da aterosclerose, passando à frente das doenças infecciosas [4]. No Brasil durante 2011 ocorreram cerca de 200 mil óbitos por doenças cardiovasculares ateroscleróticas de acordo com Sistema Único de Saúde (SUS), incluindo infarto agudo do miocárdio (IAM), angina, acidente vascular encefálico (AVE), doença arterial periférica (DAP), entre outras [5-7].

A aterosclerose é uma doença imuno-inflamatória crônica e causa estreitamento luminal progressivo do vaso devido ao processo inflamatório na parede vascular [8]. Os fatores de risco para a doença aterosclerótica são o tabagismo, diabetes mellitus, idade avançada, hipertensão arterial ($\geq 140/90$ mmHg), manifestações prévias de doença cardiovascular e dislipidemias [8-10].

De acordo com a V Diretriz Brasileira de Dislipidemia e Prevenção da Aterosclerose, a classificação fenotípica das dislipidemias envolve concentrações de colesterol total (CT), lipoproteína de baixa densidade colesterol (LDL-C), triglicérides (TG) e lipoproteína de alta densidade colesterol (HDL-C) que constituem 4 classes: **hipercolesterolemia isolada**, aumento da concentração LDL-C (≥ 160 mg/dL);

hipertrigliceridemia isolada, níveis elevados de TG (≥ 150 mg/dL) resultando no aumento da concentração de partículas ricas em TG, como a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), a lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e quilomícrons; **hiperlipidemia mista**, níveis elevados de LDL-C (≥ 160 mg/dL) e TG (≥ 150 mg/dL); **HDL-C baixo**, somente níveis baixos de HDL-C <40 mg/dL) ou associado com aumento da concentração de LDL-C ou de TG [11].

Em relação às artérias, elas podem ser classificadas em musculares, elásticas, arteríolas e metarteríolas e são compostas por três camadas: a camada ou túnica íntima revestida por uma monocamada de células endoteliais e células do músculo liso (CML); a camada ou túnica média que contém CML infiltradas na complexa matriz extracelular; a camada ou túnica externa ou adventícia que contém mastócitos, terminações nervosas e microvasos (Figura 1A) [12].

A disfunção endotelial pode favorecer o início da aterosclerose por provocar a perda de suas funções principais como dilatação e constrição, gerando susceptibilidade pró inflamatória e propriedades protrombóticas. Os radicais livres em excesso são as causas mais comuns da disfunção endotelial, pois prejudicam a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), pela redução de sua produção ou aumento de sua inativação. O NO é responsável pela manutenção da função vasodilatadora da musculatura dos vasos. O aumento de radicais livres, como os ânions superóxidos, são influenciados por enfermidades como obesidade, tabagismo, diabetes e exposição à poluição [13-16].

A geração de radicais livres ocorre naturalmente no corpo humano por fontes endógenas, como nas mitocôndrias, membrana plasmática, citosol e algumas outras organelas, ou podem ser gerados por fontes exógenas como uso de tabaco, excesso de álcool, exposição a luz ultra violeta, consumo de medicamentos entre outros. O problema ocorre quando há um desequilíbrio de agentes antioxidantes endógenos ou adquiridos pela alimentação, causando o aumento de agentes oxidantes especialmente as hidroxilas ($\text{HO}\cdot$), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxila ($\text{ROO}\cdot$), alcóxila ($\text{RO}\cdot$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) [17, 18].

O início da formação dos ateromas é marcado principalmente pela entrada de lipoproteínas, principalmente da LDL, na íntima dos vasos endoteliais. Essas lipoproteínas na íntima sem a ação antioxidante de fatores circulantes do plasma, como superóxido dismutase, catalase, glutatona, vitaminas E, C entre outros, tendem a se oxidar no espaço subendotelial, ativam o sistema imunológico causando

adesão de leucócitos (principalmente monócitos) na monocamada endotelial onde migram para dentro da íntima e se diferenciam de monócitos para macrófagos (Figura 1B). Esses macrófagos captam as LDL oxidadas (LDLox) ou modificadas, através de receptores *scavengers* e geram células espumosas que dão origem as estrias gordurosas, as primeiras lesões ateroscleróticas. A progressão da lesão envolve a migração e proliferação de CML da média para a íntima e síntese de macromoléculas da matriz extracelular, como colágeno, elastina e proteoglicanos. Placas avançadas também contêm cristais de colesterol, microvasos e acúmulo de calcificação. A morte celular de macrófagos e CML podem ocorrer nesse estágio da doença por apoptose. Lípidos extracelulares derivados de células mortas ou em processo de morte podem se acumular na região central da placa, formando o núcleo necrótico (Figura 1C) [8, 12, 17].

A complicação final da aterosclerose ocorre por meio da trombose e o rompimento da placa, o que permite que componentes de coagulação do sangue entrem em contato com fatores teciduais no interior do ateroma, gerando o trombo que se estende para dentro do lúmen do vaso impedindo o fluxo sanguíneo (Figura 1D) [12].

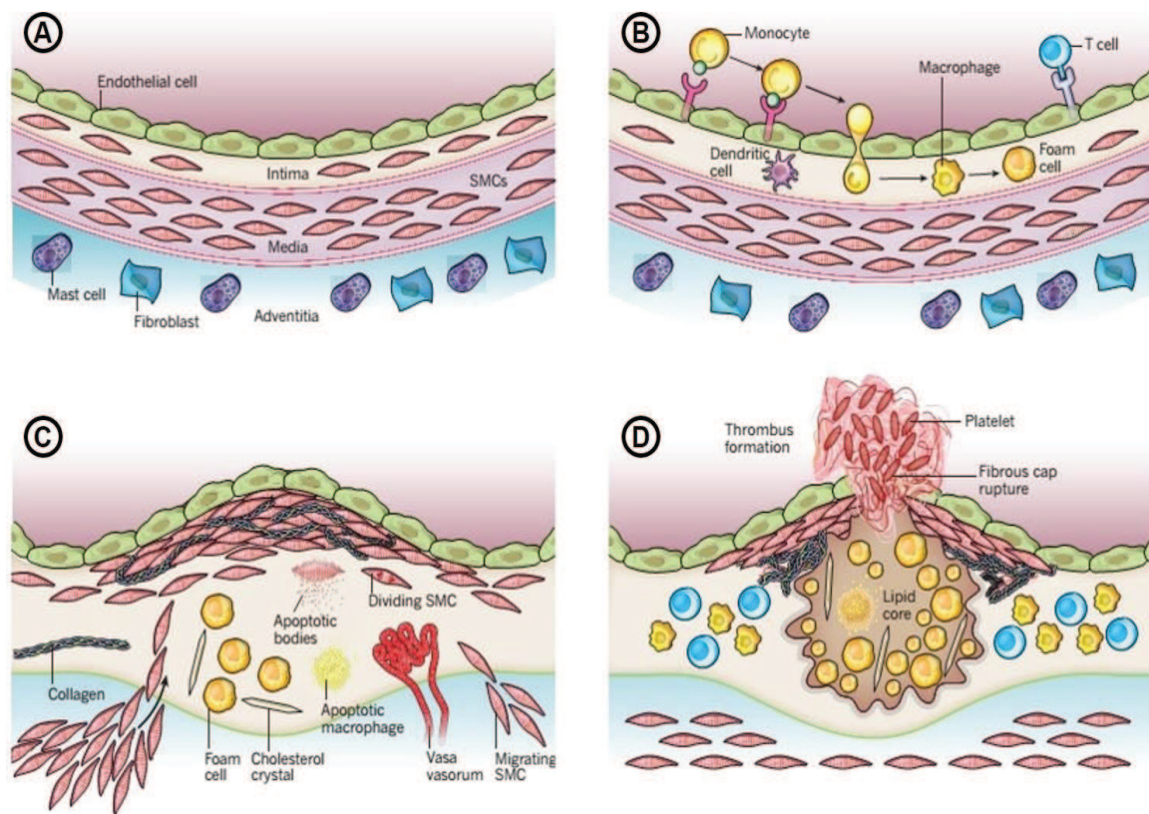


Figura 1: Esquema da formação da placa de aterosclerose adaptado de Libby, Ridker & Hansson, 2011. SMC: *Smooth Muscle Cell* (células do músculo liso). A artéria muscular sadia e as mudanças celulares que ocorrem durante a progressão da doença são mostradas na imagem **(A)**, a artéria sadia contém três camadas: A túnica da íntima é revestida por uma monocamada de células endoteliais. Nessa camada possuem também células musculares lisas (CML). A camada média ou túnica média contém CML embutidas na complexa matriz extracelular. Na camada externa das artérias, contém mastócitos, terminações nervosas e microvasos; **(B)** Os passos iniciais da aterosclerose incluem a adesão de leucócitos na monocamada endotelial, migração dos leucócitos para dentro da íntima, maturação de monócitos (os mais numerosos leucócitos recrutados) em macrófagos, e sua absorção de lipídios, produzindo células espumosas; **(C)** A progressão da lesão envolve a migração de CML da média para a íntima, a proliferação de CML, e síntese de macromoléculas da matriz extracelular, como colágeno, elastina e proteoglicanos. Macrófagos da placa e CML podem morrer em lesões avançadas, algumas por apoptose. Lipídeos extracelulares derivadas de células mortas ou em processo de morte podem se acumular na região central da placa. Placas avançadas também contêm cristais de colesterol e microvasos; **(D)** A complicação final da aterosclerose ocorre por meio da trombose, um rompimento da placa aterosclerótica. A fratura da capa fibrosa da placa, o que permitiu que componentes de coagulação do sangue entrem em contato com fatores de tecido no interior da placa, provocando o trombo que se estende para dentro do lúmen do vaso impedindo o fluxo de sangue (modificado de [12]).

A placa pode se apresentar basicamente em duas formas: estável, com predomínio de capa fibrosa, poucas células inflamatórias e núcleo lipídico pequeno; ou instável, com vasta atividade inflamatória, principalmente nas bordas laterais, grande atividade proteolítica, capa fibrosa e com um núcleo lipídico grande. A

instabilidade de uma placa é causada pela força mecânica que se desenvolve na capa fibrosa fina o que prediz a ruptura da placa. Esse fato não depende somente da espessura da capa fibrosa, mas também da elasticidade do núcleo necrótico [8, 19].

A ruptura da placa inflamada é o estágio mais grave da doença aterosclerótica, onde ocorre a exposição de diversos componentes protrombóticos para a circulação dando início a aterotrombose e sequelas por impedir o fluxo e a irrigação de órgãos e tecidos. Geralmente, as lesões em humanos podem romper e gerar fragmentos de trombos que circulam pelo vaso e resultam em embolia [20, 21].

Ainda em relação a formação dos ateromas, pesquisas com LDLox *in vitro* demonstram sua toxicidade para células vasculares, incluindo células endoteliais, células do músculo liso e macrófagos. As superfícies das LDLs são compostas por fosfolípidos, colesterol livre e apolipoproteína-B100 (Apo-B100) e seu interior principalmente por colesterol esterificado e triglicérides. As LDL são oxidadas principalmente por ação enzimática ou por radicais livres como ânion superóxido, radical hidroxila e peroxinitrito, principalmente pelo processo de peroxidação lipídica dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI). O grande foco da agressão oxidativa ocorre na Apo-B100, que resulta no desaparecimento do seu ligante que lhe permite unir aos receptores celulares de LDL e passam a ser reconhecidos pelos receptores *scavenger* dos macrófagos. Existem duas formas de LDL modificadas: LDL minimamente modificadas, que possuem somente os lípidos superficiais oxidados e as LDLox que possuem também as Apo-B100 e os lípidos internos oxidados [22, 23].

A progressão da placa aterosclerótica das primeiras lesões para placas mais avançadas é determinada pelo aumento de lípidos como LDLox, HDL, fosfolípidos, produtos de oxidação lipídica, fibrinogênio, apolipoproteína-A1 (Apo-A1), paraoxonase (PON) e calcificação [9, 10].

1.2 Metabolismo de lipoproteínas plasmáticas

Os fosfolípidos, o colesterol (Col), os TG e os ácidos graxos (AG) são os lípidos biologicamente mais importantes. As lipoproteínas compostas por lípidos e apolipoproteínas (Apo) atuam na excreção e no transporte de lípidos que são hidrofóbicos no plasma sanguíneo. As Apo possuem muitas funções no metabolismo das lipoproteínas, como cofatores enzimáticos no caso das Apo-CII, CIII e A1, na

síntese intracelular das partículas lipoprotéicas, Apo-B100 e B48 e como ligantes a receptores de membrana Apo-B100 e E [9, 24].

Existem dois grupos de lipoproteínas, as ricas em TG e as ricas em Col. O primeiro grupo são partículas maiores e menos densas como as VLDL de origem hepáticas e os quilomícrons de origem intestinal. O segundo grupo, incluem as LDL, HDL, IDL e a lipoproteína (a) (Lp(a)), formada pela ligação covalente de uma partícula de LDL com uma Apo (a). Estudos indicam a Lp(a) como participante na formação e progressão do atheroma [11, 25].

O metabolismo das lipoproteínas pode ocorrer por duas vias, intestinal e hepática: na via intestinal, os TG oriundos da dieta são hidrolisados em AG livres, monoglicerídeos e diglicerídeos. Esses e outros lípides são solubilizados por sais biliares na luz do intestino e formando micelas que facilitam a movimentação pelo intestino. A proteína Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1-L1) facilita a absorção do Col pelo intestino, por transportar e promover sua passagem pela vilosidade do enterócito. Depois da sua absorção, os AG são utilizados na produção de quilomícrons e novamente secretados pelas células intestinais para o sistema linfático até alcançar a circulação. Na circulação, os quilomícrons são hidrolisados e pela ação da lipoproteína lipase (LPL), geram AG, glicerol e colesterol não esterificado. Parte dos AG são captados por células musculares e adipócitos que são reservatórios importantes de TG. Remanescentes de quilomícrons e AG são capturados e utilizados na formação de VLDL no fígado [11, 26, 27].

Na via hepática, os lípides são transportados pelas VLDL, IDL e LDL. Os TG das VLDL são hidrolisados pela LPL, enzima ativada pela Apo-CII e inibida pela Apo-CIII. Os AG hidrolisados são realocados para os tecidos, podendo ser armazenados no tecido adiposo ou utilizados, como nos músculos esqueléticos. Parte das VLDL dão origem às IDL, removidas rapidamente da circulação. A atuação da lipase hepática (LH) no catabolismo da IDL resulta na formação das LDL. A proteína de transferência de éster de colesterol (CETP) é responsável pelas trocas lipídicas com partículas de HDL e LDL, trocando TG por colesterol esterificado [11, 24].

As HDL são partículas densas, pequenas e ricas em proteínas, quando comparadas com as outras classes de lipoproteínas plasmáticas. Cerca da metade da massa total da HDL é composta de lípides e o restante é constituído de proteínas estruturais e funcionais, principalmente a Apo-A1 [28]. As partículas de HDL desempenham importantes funções antiaterogênicas, como a atividade anti-

inflamatória, antioxidante, pro fibrinolítica e ainda participam como transportadoras de moléculas de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, evitando seu acúmulo e a oxidação e por consequência a formação de placas de ateroma, em um processo conhecido como Transporte Reverso de Colesterol (TRC) [29].

O TRC inicia-se quando a proteína transportadora ABCA1 efluxa o colesterol das células para as partículas ricas em Apo-A1, e pobres em lípidos. A perda de atividade de ABCA1, especificamente em macrófagos, pode predispor à formação de células espumosas e contribuir diretamente para o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas [30]. Estão envolvidas no TRC a enzima Lecitina Colesterol Aciltransferase (LCAT), LPL, CETP e Proteína de Transferência de Fosfolípidos (PLTP). A LCAT promove a esterificação do colesterol livre, permitindo a formação de moléculas maduras de HDL. A LPL promove a hidrólise de lipoproteínas ricas em triglicerídeos para promover a transferência de colesterol e Apo-C para a HDL. A CETP tem papel chave no TRC e é responsável pela troca equimolar de colesterol esterificado da HDL por triglicerídeos da VLDL, IDL e LDL. Já a PLTP transfere fosfolípidos de outras lipoproteínas para a HDL, o que potencialmente contribui para a funcionalidade da HDL [31, 32].

1.3 Marcadores de síntese e absorção do colesterol

Latosterol e desmosterol funcionam como marcadores da síntese de colesterol no plasma (Figura 2). Quando há aumento de colesterol no interior das células, ocorre a diminuição da atividade da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase para reduzir a produção de colesterol e diminui a expressão de receptores de LDL, para menor absorção de colesterol intracelular, além de elevar a atividade da enzima acil-coenzima A aciltransferase (ACAT) para estocar colesterol esterificado. A proteína de ligação a elemento regulador de esterol (SREBP) e o receptor x do fígado (LXR) são reguladores relevantes do metabolismo de colesterol. No fígado, a insulina estimula a transcrição de genes que codificam a SREBP-1c via LXR e promove a transcrição de genes necessários para a síntese de ácidos graxos [33].

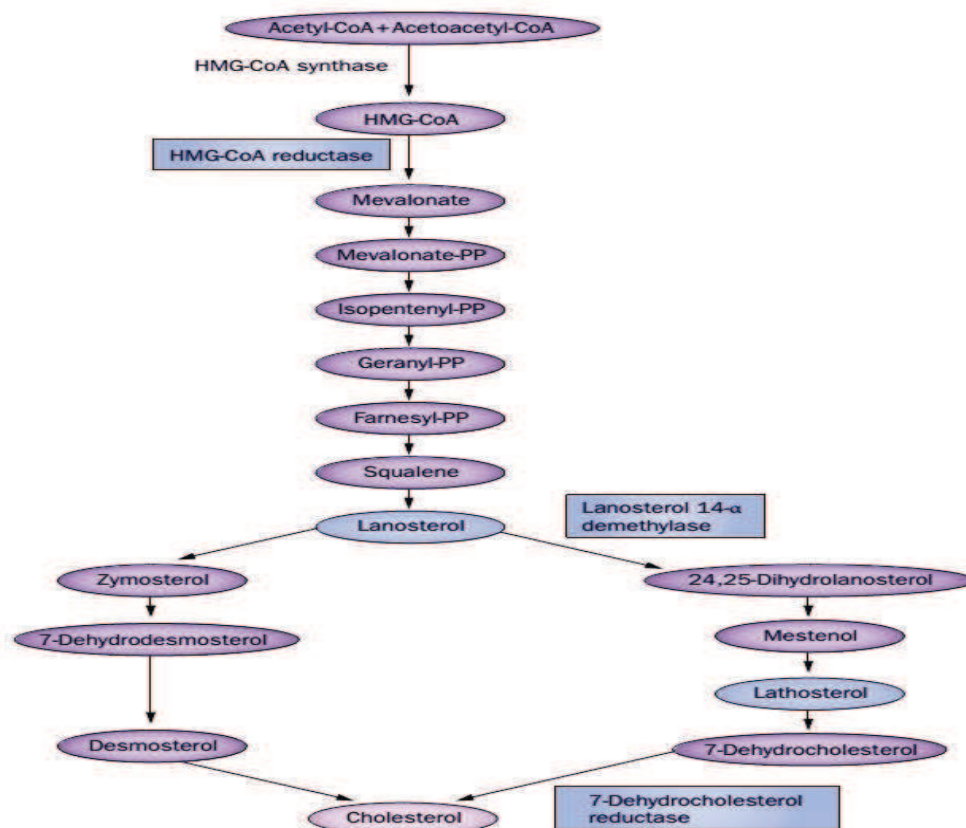


Figura 2: Esquema síntese do colesterol endógeno adaptado de [34]. O colesterol endógeno é produzido a partir da acetil-CoA. O passo inicial envolve a síntese de mevalonato pela HMG-CoA reductase. Após o surgimento do lanosterol, a via da produção de colesterol se divergem a partir dos precursores desmosterol ou latosterol.

No intestino, o colesterol de origem alimentar e da bile se ligam aos ácidos biliares e tem absorção realizada pela proteína NPC1-L1. O colesterol livre pode ser utilizado na produção de HDL no interior dos enterócitos e também utilizados na produção de quilomícrons por meio da ACAT2. Os fitoesteróis de origem vegetal (β -sitosterol e campesterol), também são absorvidos pela NPC1-L1, mas não são ligantes da ACAT2, assim a maior parte volta para à luz intestinal via receptores ABCG5 ou G8. Parte dos fitoesteróis absorvidos chega ao plasma e pode ser medido e utilizado como marcadores da absorção do colesterol alimentar [35, 36].

1.4 Classificação morfológica e histológica da aterosclerose

Para um melhor entendimento da doença aterosclerótica, entre 1994 e 1995 um consórcio de pesquisadores publicou as classificações de placas de ateromas na *American Heart Association* (AHA) o que colaborou para uma melhor intervenção na

doença, além de auxiliar nas terapias médicas e cirúrgicas. Essas classificações histológicas foram aprimoradas e modificadas em 2000 por Virmani e colaboradores os quais indicaram que a ruptura da placa, capa fibrosa do ateroma, erosão da placa e nódulo calcificado, levam a trombose luminal e causam as principais fatalidades das DCV [37-39].

O termo “ruptura da placa” é caracterizado como uma superfície de ruptura da capa fibrosa na qual o trombo é exposto e ligado com o núcleo necrótico subjacente (Figura 3). As lesões têm normalmente um grande núcleo necrótico e uma capa fibrosa não linear composta por macrófagos e linfócitos. O núcleo necrótico possui aproximadamente 30% de área de placa com uma fina capa fibrosa medindo menos que 65 μm , e é fortemente infiltrado por macrófagos e linfócitos T. Ocorre um trombo luminal rico em plaquetas que se desenvolve pelo contato entre o fluido do núcleo necrótico e o sangue [39, 40].

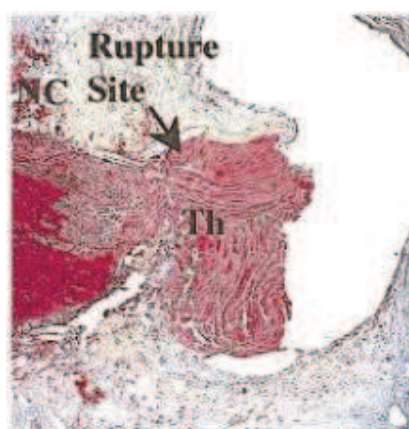


Figura 3: Imagem histológica da “ruptura da placa” adaptado de Virmani *et al.*, 2000, NC: Necrotic Core, Th: Thrombus.

A capa fibrosa do ateroma é uma camada rica em colágeno, proteoglicanos e CML que reveste o núcleo lipídico, com variados graus de infiltração de macrófagos e linfócitos (Figura 4). O núcleo lipídico é composto por restos necróticos e uma grande quantidade de lípidos extracelulares principalmente cristais de colesterol [38, 39].

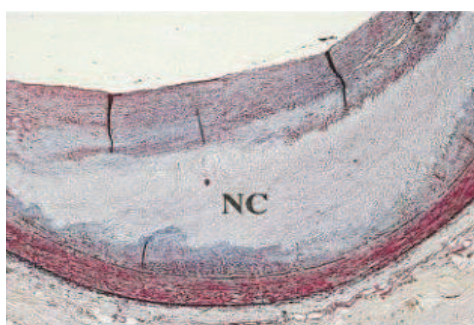


Figura 4: Imagem histológica da “capa fibrosa do ateroma” adaptado de Virmani *et al.*, 2000, NC: Necrotic Core.

Na erosão da placa não é observado ruptura da capa fibrosa. Geralmente o endotélio não está presente no local da erosão (Figura 5). As erosões são caracterizadas por um trombo luminal sobreposto numa matriz rica em proteoglicanos com CML em sua maioria e poucas células inflamatórias [39, 40].

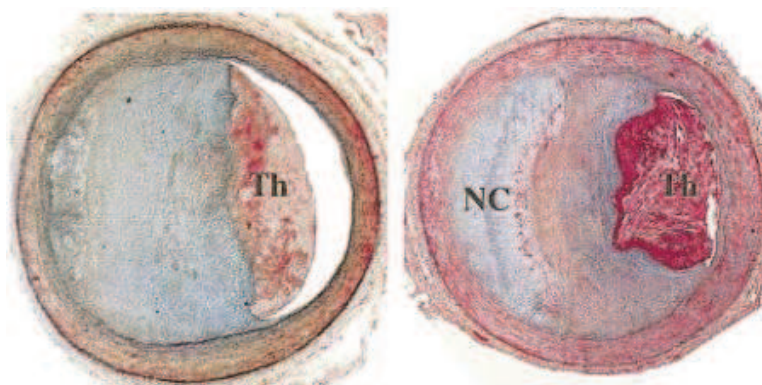


Figura 5: Imagem histológica da “erosão da placa” adaptado de Virmani *et al.*, 2000, Th: Thrombus, NC: Necrotic Core.

O nódulo calcificado, o que é a causa menos frequente de trombos coronários, contém tipicamente placas calcificadas juntamente com nódulos calcificados que penetram no lúmen, com rompimento das camadas sobrepostas de colágeno e do endotélio, o trombo é em sua maioria não oclusivo (Figura 6). A origem da lesão é desconhecida, mas pode estar associada com placas cicatrizadas. Os próprios nódulos aparecem no lúmen na ausência de um rompimento evidente na íntima [39, 40].

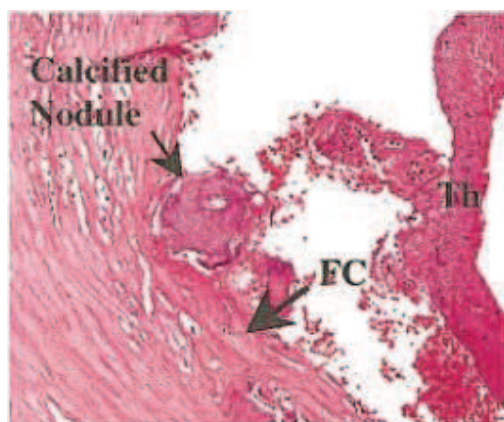


Figura 6: Imagem histológica do “nódulo calcificado” adaptado de Virmani *et al.*, 2000, FC: Fibrous Cape, Th: Thrombus.

Na classificação de lesão fibrocalcificada, as capas fibrosas possuem extenso acúmulo de calcificação na íntima (Figura 7). O núcleo lipídico quando presente é geralmente pequeno [39].



Figura 7: Imagem histológica da “lesão fibrocalcificada” adaptado de Virmani *et al.*, 2000.

1.5 Doença arterial periférica

A doença arterial periférica (DAP) de membro inferior é um subgrupo de um conjunto maior de doenças vasculares periféricas que podem afetar as artérias, as veias ou a circulação linfática. A DAP é a principal causa de amputação devido à obstrução das artérias, principalmente as dos membros inferiores (femoral, poplítea e tibial), sendo mais comum em homens com mais de 50 anos. Em seu diagnóstico é observado sinais de claudicação, dor e necrose tecidual ou ser assintomática [41, 42].

A isquemia aguda na DAP ocorre quando o fluxo sanguíneo de uma extremidade é diminuído ou interrompido, podendo gerar dano à integridade do membro, geralmente é causada por trombose ou embolia. No caso de trombose o enxerto é o tratamento mais comum. A maioria dos êmbolos são de origem cardíacas como o trombo de um infarto do miocárdio recente ou de fibrilação atrial. Uma causa menos frequente de embolia de membro inferior é a placa de ateroma ou aneurisma da aorta abdominal. Aneurismas trombosados femorais ou poplíteas de fase aguda podem apresentar isquemia aguda [41].

A isquemia crônica ocorre na grande maioria dos casos devido a aterosclerose, mas também pode ocorrer por quadros sequelares de tromboembolismo, doença inflamatória, trauma, doença aneurismática ou cistos. Os pacientes com isquemia

crônica são acometidos em múltiplos pontos do membro e o quadro pode evoluir para isquemia crítica (IC), o grau mais avançado da doença [41].

Portadores de IC possuem de três a cinco vezes mais chances de morte por DCV e após 1 ano do diagnóstico, menos de 50% estarão vivos ou livre de amputações. Os processos de calcificações ateroscleróticas aumentam as causas de mortes e amputações. O diagnóstico da IC é caracterizado por pacientes com dor isquêmica em repouso, ulcerações ou gangrena da perna associada com redução do fluxo sanguíneo arterial para o pé. O tratamento da IC é realizado através da revascularização do membro, quando não é possível ou não há sucesso, a amputação transtibial continua sendo o tratamento mais realizado para o alívio da dor intensa, perda de tecido e infecção [42, 43].

Estudos apontam que aproximadamente 20% da população com mais de 60 anos tem algum grau de DAP e a taxa se eleva entre tabagistas, diabéticos e pacientes com doença arterial coronariana. O diabetes aumenta o risco de IC em quatro vezes e de amputação em dez vezes. No caso do tabagismo, o risco de desenvolver IC triplica em relação ao diabético. A DAP é um marcador notável de aterosclerose e do risco de complicações cardiovasculares e cerebrovasculares, mas esse fato é pouco explorado no prognóstico de eventos isquêmicos pelos clínicos. Um terço dos pacientes com DAP sofrem eventos como IAM e AVE, a qual é a principal causa de morte nessa população. O tratamento precoce da DAP, atuando nos fatores de risco e no perfil cardiovascular, aprimoram a taxa de mortalidade e a qualidade de vida dos acometidos [42, 44].

Níveis elevados de proteína C reativa (PCR) são fortemente associados com a DAP. Os marcadores de inflamação como a interleucina-6, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), PCR e ativação plaquetária estão aumentados em comparação com indivíduos controle [41].

1.6 Biomarcadores: oxisteróis em aterosclerose

Processos bioquímicos que ocorrem nas placas ateroscleróticas geram biomarcadores específicos no sangue e tecidos. Esses biomarcadores podem ser usados como uma informação complementar e ditar o tipo ideal de intervenção e tratamento da doença [45].

Segundo Libby, Ridker & Hansson (2011) ocorrem muitas questões sem resposta a respeito do processo inflamatório da aterosclerose. A relação de marcadores inflamatórios com futuros riscos e complicações ateroscleróticas tem concedido esperanças para uma melhor abordagem clínica [12].

Os oxisteróis são derivados oxigenados do colesterol, a inclusão de uma molécula de oxigênio no colesterol reduz a sua semivida. A sua rápida degradação e excreção são facilitadas pelas suas propriedades físicas, o que lhes permite passar por membranas lipofílicas e serem redistribuídos nas células a uma velocidade muito mais rápida do que o colesterol. Os oxisteróis estão presentes em tecidos humanos e animais, no plasma e em placas de ateromas, principalmente nas membranas biológicas. No plasma eles são transportados pelas lipoproteínas, principalmente pelas LDL [46, 47].

A primeira extração de oxisterol, o 7 β -hidroxicolesterol, ocorreu em 1939 por Haslewoold. A sua biossíntese foi primeiramente documentada em 1956 por Frederickson e Ono que incubaram colesterol radioativamente marcado com células ricas em mitocôndrias. A partir desta descoberta foi demonstrado que estes compostos exerciam um poder inibitório na síntese de esteróis em cultura celular, indicando um papel regulatório dos oxisteróis no metabolismo lipídico e que estimulou a exploração de suas ações fisiológicas [48, 49].

Vários estudos têm mostrado os oxisteróis envolvidos em eventos como regulação e sinalização da expressão gênica no metabolismo lipídico, são substratos para a síntese de ácidos biliares e hormônios esteroides, na biossíntese e no transporte de esteróis, no efluxo do colesterol celular, na recaptação de lipoproteínas e no tráfico intracelular de colesterol. Além destas ações, experimentos *in vitro* têm relacionado a ação dos oxisteróis a eventos patológicos como apoptose, necrose, inflamação e imunossupressão [47, 49].

Na aterogênese os oxisteróis, como o 7-ketocolesterol (7-Keto) e 27-hidroxicolesterol (27-HDC), podem estimular a formação de células espumosas, o avanço da lesão aterosclerótica e podem contribuir para a vulnerabilidade da placa, além de agir na inibição da função do receptor de LDL nos fibroblastos humanos, na atividade da ACAT, aumentando a formação de colesterol esterificado, na inibição da produção de prostaglandinas I₂ pelas células endoteliais, gerando o aumento da adesão plaquetária e na citotoxicidade em células do músculo liso e endoteliais *in vitro* [50, 51].

O 24S-hidroxicolesterol (24S-HDC) e o 25-hidroxicolesterol (25-HDC) são oxisteróis envolvidos no mecanismo da doença de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas [52, 53]. Uma recente revisão aponta uma causa comum entre a doença aterosclerótica e o Alzheimer, ambas são causadas por inflamação crônica [52]. Baseado nessas evidências são necessárias mais investigações desses oxisteróis na aterosclerose.

Na Tabela 1 adaptado de Jasakul *et al* (2011) é possível observar o envolvimento de alguns oxisteróis em doenças inflamatórias crônicas. Novamente o 24S-HDC e 25-HDC aparecem envolvidos nas doenças neurodegenerativas [54].

Tabela 1: Oxisteróis associados às doenças adaptado de Jasakul *et al* (2011)

Oxisteróis	Câncer	Aterosclerose	Doenças neurodegenerativas	Referências
5,6-colesterolepoxido	√			[55, 56]
Colestane-3β,5α,6β-triol	√			[57-59]
24S-hidroxicolesterol			√	[60]
25-hidroxicolesterol			√	[61-63]
7-hidroperoxicolesterol		√		[64]
7-hidroxicolesterol		√		[65]

1.6 Síntese de oxisteróis

Há duas categorias principais de oxisteróis biológicos: aqueles oxigenados no anel esterol, principalmente na posição 7 como o 7α/β-hidroperoxicolesterol (7α/7β-OOHC), 7-Keto e 7α/β-hidroxicolesterol (7 α/7β-HC) e aqueles oxigenados na cadeia lateral por exemplo o 24S-HDC, 25-HDC e 27-HDC. Geralmente, os esteróis oxigenados no anel esterol tendem a ter origem não enzimática enquanto os esteróis oxigenados na cadeia lateral são de origem enzimática, mas existem exceções para 25-HDC e o 7α-HC que podem ser produzidos por duas vias, enzimática ou não-enzimática [66].

A ação de espécies reativas de oxigênio sobre o colesterol, em especial a hidroxila, retira um átomo de hidrogênio alílico na posição C-7. O radical de carbono gerado em C-7 é instável e ainda pode reagir com oxigênio molecular para formar um radical peroxila colesterol (COO•). A abstração de hidrogênio a partir de outro lipídio gera os hidroperóxidos (7α/7β-OOHC). Os hidroperóxidos de colesterol foram

detectados em níveis baixos em algumas amostras biológicas, incluindo a placa de aterosclerose humana. Os $7\alpha/7\beta$ -OOHC são os principais oxisteróis formados nas fases iniciais da oxidação não enzimática do colesterol e estão em baixas concentrações nos tecidos. Na presença de metais de transição, os $7\alpha/7\beta$ -OOHC são decompostos em radicais $7\alpha/\beta$ -alcóxi, e podem gerar os $7\alpha/\beta$ -hidroxicolesterol e 7-Keto (Figura 8A), estes são os principais oxisteróis formados não enzimaticamente e presentes na maioria dos tecidos [66, 67].

A hidroxilação enzimática da cadeia lateral de colesterol dá origem ao 24S-, 25- e 27-HDC, sintetizados por enzimas diferentes:

(I) O colesterol 24-hidroxilase (CYP46A1) também é uma enzima P450 localizada no retículo endoplasmático, altamente expresso nas células neuronais do cérebro e da retina e dão origem ao 24-HDC (Figura 8B), sendo o cérebro a principal fonte de circulação desse oxisterol [66].

(II) O colesterol 25-hidroxilase é uma proteína não-heme que contém ferro, não derivado da enzima P450, e é expresso em níveis muito baixos na maior parte dos tecidos. Apesar disso, existe um interesse na enzima devido à atividade do seu produto 25-HDC (Figura 8B) sobre a SREBP para a regulação transcricional dependente de colesterol. A enzima colesterol 25-hidroxilase está localizada nas membranas do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi, onde a SREBP, a proteína de ativação de clivagem da SREBP (SCAP) e a proteína INSIG (gene induzido por insulina) também são encontradas [66, 68].

(III) O esterol 27-hidroxilase (CYP27A1) é uma enzima P450 mitocondrial expressa em muitos tecidos, especialmente no fígado e macrófagos, esta atua no primeiro passo de vias alternativas para a síntese de ácidos biliares. O CYP27A1 catalisa a adição de um grupo hidroxila na cadeia lateral do colesterol e também de vários esteróis, formando o 27-HDC (Figura 8B) [66, 67].

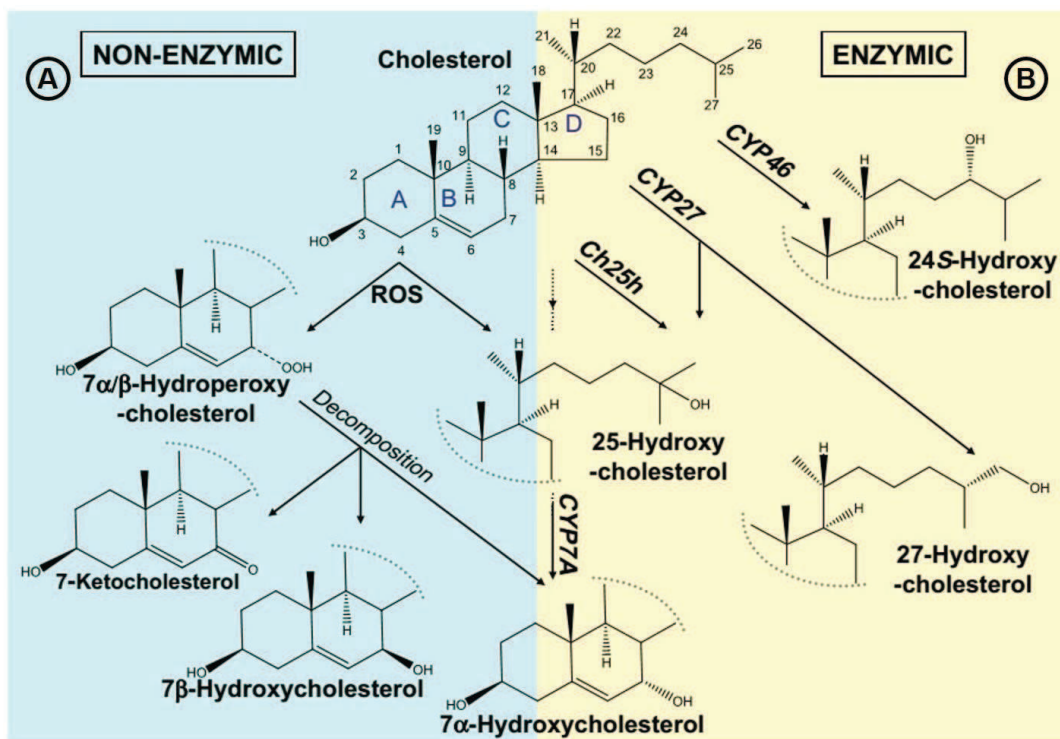


Figura 8: Esquema da formação dos oxisteróis adaptado de Brown & Jessup, 2009. A estrutura do colesterol é mostrada com anéis com letras (A-D) e átomos de carbono numerados (1-27). Estruturas incompletas dos oxisteróis enfatizando uma oxigenação adicional. Ch25h= colesterol 25-hidroxilase; ROS= *Reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio).

Os oxisteróis adquiridos por dieta ou excretados pelo fígado, podem ser absorvidos no intestino e seguir diferentes caminhos, voltar para o intestino através dos transportadores ABCG5 e ABCG8, se esterificar sendo bons substratos para ACAT em células e LCAT no plasma, ou ainda serem metabolizados ou degradados no fígado. Nos enterócitos ocorre a reação da ACAT com os oxisteróis onde são incorporados nos quilomícrons, VLDL, LDL e HDL, assim os oxisteróis pode ser transportado para diferentes células e tecidos do organismo. A maioria dos colesteróis oxigenados só podem ser eliminados por transportadores de lípidos de membranas específicos em células, devido a sua hidrofobicidade [69].

2. OBJETIVOS

Objetivos

- 1- Identificar e quantificar os oxisteróis de origem enzimática (24S-, 25-, 27-Hidroxicolesterol) e não enzimática (7-Ketolesterol) em plasma e ateromas de indivíduos com DAP, comparando-os a um grupo controle (CTL).
- 2- Avaliar a associação entre a atividade inflamatória sistêmica, estimada pela concentração da proteína C reativa, e os níveis plasmáticos e teciduais dos oxisteróis.
- 3- Determinar e quantificar marcadores de síntese e de absorção de colesterol em plasma e ateromas dos grupos DAP e CTL
- 4- Mensurar a atividade de proteínas de transferência de lípidos (CETP e PLTP) nos grupos DAP e CTL

3. MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram incluídos 10 indivíduos (54 a 84 anos) de ambos os gêneros, portadores de doença arterial periférica aterosclerótica grave, encaminhados ao Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para cirurgia de amputação pelo Departamento de Cirurgia, área de Moléstias Vasculares Periféricas. Destes indivíduos foram retiradas as artérias femoral, poplítea ou tibial posterior ou anterior, selecionadas pela presença de placa aterosclerótica (grupo DAP). Além desses, foram arrolados 13 indivíduos (45 a 78 anos), de ambos os gêneros, com neoplasia gástrica submetidos à cirurgia de gastrectomia total ou parcial pelo Departamento de Cirurgia, área de Moléstias do Aparelho Digestivo, cuja artéria gastro-omental direita (GOD) foi removida e utilizada como controle (grupo CTL). Em todos indivíduos arrolados, uma avaliação clínica pormenorizada foi realizada e todas as artérias coletadas foram avaliadas histologicamente para constar a ausência ou presença da placa aterosclerótica. No grupo DAP, foram considerados critérios de exclusão: presença de infecção aguda ou crônica, dislipidemias graves e pacientes cujas lesões decorreram ou se agravaram por traumas. No grupo CTL, foi também considerado critério de exclusão a presença de doença aterosclerótica ou neoplásica na artéria GOD. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (**em Anexo**) e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2 Materiais biológicos

Após dissecação cuidadosa, as artérias foram seccionadas em duas partes: (i) 8 mm da região central da artéria com ou sem ateroma armazenado em solução tamponada de formol a 10%, para análise histológica para determinação da classificação e presença do ateroma ou não no caso de controles (ii) cerca de 8 cm acondicionados em tubos criogênicos imediatamente colocados em nitrogênio líquido até serem transferidos para freezer -80°C. Esse segundo seguimento foi utilizado para análises bioquímicas.

Sangue venoso periférico coletado antes das cirurgias foi centrifugado a 3.500 rpm por 15 min. EDTA e 10 µL de BHT (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol, 0,2 mg/mL em

metanol) foram adicionados para inibir a degradação dos lípides de interesse. As amostras foram armazenadas à -80°C.

3.3 Técnicas de preparo de lâminas e classificações histológicas

De acordo com Junqueira & Junqueira (1983) e modificações, cerca de 8mm foi retirado de um segmento de artéria com ou sem ateroma com o auxílio de um bisturi cirúrgico. Essas peças foram mantidas em frasco com no mínimo um volume 20 vezes maior de solução formol para fixação por 24h. Após essa etapa, a peça foi transferida para álcool 70% para desidratação, posteriormente para xilol e substituído por parafina fundida a 60°C para o processo de impregnação. Na próxima etapa utilizamos um micrótomo para obtenção de cortes seriados, delgados e uniformes dos blocos de parafina com as peças de artérias com ateromas. A espessura dos cortes variou entre 5 e 7 µm [70].

As fitas geradas dos cortes foram transferidas para um banho-maria, onde foram retiradas as dobras e evitado as bolhas. A água deve variar de 3°C a 8°C abaixo do ponto de fusão da parafina utilizada. Os cortes foram separados utilizando lâminas de vidro limpas com detergente, estocadas em álcool 80% e secas. No final os cortes foram depositados em uma estufa a 60°C para secagem entre uma e 24 horas.

Para a fase de coloração os cortes foram retirados da parafina e hidratados. Nesse procedimento a fita passou por um processo de banhos de xilol, álcool e água, na seguinte sequência: 1- Banho de xilol por cinco minutos; 2- Banho de xilol por dois minutos; 3- Banho de xilol por 1 minutos; 4- Álcool 100% por um minuto; 5- Álcool 95% por um minuto; 6- Álcool 70% por um minuto e 7- Água por 2 minutos. As lâminas foram coradas por HE (hematoxilina e eosina), T. Masson (tricromo de masson) e WvG (Weigert - van Gieson).

Para as classificações histológicas dos ateromas foram utilizadas duas metodologias, Virmani et al (2000) (Tabela 1) e Sary et al (1994 e 1995) (Tabela 2). Essa etapa foi realizada em parceria com o Prof. Dr. Fabio Rogerio do departamento de anatomia patológica da faculdade de ciências médicas da UNICAMP [37-39].

Tabela 1: Classificação histológica de Virmani *et al* (2000)

Classificação	Descrição	Trombose
Lesões não ateroscleróticas da íntima; Espessamento da camada da íntima	Acumulo normal de células do músculo liso na íntima na ausência de células espumosas ou estrutura lipídica	Ausente
Xantomas da íntima, ou "estrias gordurosas"	Acumulo luminal de células espumosas, sem um núcleo necrótico ou cápsula fibrosa. Com base animal e dados humanos, essas lesões geralmente regredem	Ausente
Lesões ateroscleróticas progressiva. Espessamento da íntima patológica	Células do músculo liso em uma matriz rica em proteoglicano com áreas de acúmulo de lipídios extracelulares sem necrose	Ausente
Erosão	Trombose luminal; placa semelhante com a descrição anterior	Trombo mural em sua maioria e raramente oclusiva
Capa fibrosa do ateroma	Núcleo necrótico bem formado com uma capa fibrosa sobrejacente	Ausente
Erosão	Trombose luminal; placa semelhante com a descrição anterior, sem comunicação de trombo com núcleo necrótico	Trombo mural em sua maioria e raramente oclusivo
Fina capa fibrosa do ateroma	Fina capa fibrosa infiltrada por macrófagos e linfócitos com raras células do músculo liso e um núcleo necrótico subjacente	Ausente, pode conter intraplaca hemorragia/fibrina
Ruptura da placa	Fibroateroma com ruptura da capa; trombo luminal se comunica com o núcleo necrótico subjacente	Trombo normalmente oclusivo
Nódulo calcificado	Calcificação nodular eruptiva com placa fibrocálcica subjacente	Trombo geralmente não oclusivo
Placa fibrocálcica	Placa rica em colágeno com estenose significativa, geralmente contém grandes áreas de calcificação com poucas células inflamatórias; um núcleo necrótico pode estar presente	Ausente

Tabela 2: Classificação histológica de Stary *et al* (1994 e 1995)

Classificação histológica do ateroma		Termos para as mesmas lesões com base na aparência a olho nu	
Lesão tipo I	Lesão inicial		
Lesão tipo II			
IIa	Progressão propensa da lesão tipo II	Estrias gordurosas	Lesão precoce
IIb	Progressão resistente da lesão tipo II		
Lesão tipo III	Lesão intermediária (pré ateroma)		
Lesão tipo IV	Ateroma		
Va	Fibroateroma (lesão tipo V)	Placa ateromatosa, Placa fibrolipídica, Placa fibrosa	
Vb	Lesão calcificada (lesão tipo VII)	Placa calcificada	Lesão avançada
Vc	Lesão fibrótica (Lesão tipo VIII)	Placa fibrosa	
Lesão tipo VI	Lesão com defeito na superfície e/ou hematoma/hemorragia e/ou depósito trombótico	Lesão complicada, placa complicada	

3.4 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas em equipamento modular automatizado ROCHE Diagnostics (West Sussex, England), usando reagentes Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). O colesterol total (CT), TG, HDL-C e glicose foram dosados por métodos enzimáticos. A ureia e a creatinina foram mensuradas por método cinético. A LDL-C foi calculada pela fórmula de Friedewald e a VLDL-C pela divisão de triglicérides sobre 5 (TG/5) [71]. A Apo-A-1, B e Lp(a) foram dosadas por nefelometria no sistema automatizado BNII com reagentes Dade-Behring (Marburg, Germany). A hemoglobina glicada (HbA1c) foi quantificada por equipamento HPLC VARIANT™ II (Califórnia, United States). A proteína C reativa (PCR) foi dosada por imunonefelometria ultrassensível mensurada por BN ProSpec Siemens Healthcare Diagnostics (New York, United States).

3.5 Atividade da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP)

De acordo com Lagrost (1998) e adaptações, a atividade da CETP foi determinada em plasma por ensaio exógeno radiométrico. As análises foram feitas em duplicatas e foram baseadas na transferência de colesterol esterificado, marcado com carbono 14 (^{14}C -CE) de partículas da HDL, para partículas aceptoras VLDL e LDL. Para cada microtubo foi adicionado 50 μL de ^{14}C -HDL (diluído 40 mg/dL de colesterol), 200 μL de LDL-VLDL (diluído 200 mg/dL de colesterol), 30 μL tampão Tris (adicionar 50 μL no branco) e 20 μL de plasma do voluntário como fonte de CETP. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por duas horas a 37°C. Após o período de incubação as amostras foram resfriadas e precipitadas com 30 μL de sulfato de dextrana e MgCl_2 (1:1), homogeneizada e incubada a 4°C por 30 minutos. Em seguida centrifugou-se a 4°C por 15 minutos a 3000 rpm. Foi retirado 200 μL do sobrenadante e adicionado em novo tubo contendo 2,5 mL de solução contadora. A leitura foi realizada no contador de cintilação beta (PACKARD, TRICARB 2100) e os resultados foram expressos na porcentagem da transferência de ^{14}C -CE [72].

3.6 Atividade da proteína de transferência de fosfolípides (PLTP)

A atividade da PLTP foi realizada por ensaio exógeno, avaliando a transferência de ^{14}C -fosfatidilcolina de lipossomos para partículas aceptoras de HDL3. Em cada microtubo foi adicionado 15 μL de substrato lipossoma (10 μmol de fosfatidilcolina, 0,5 μCi de ^{14}C -Fosfatidilcolina e 100 nmol BHT), 250 μg de HDL3, completado o volume para 400 μL com tampão Tris-HCL (10 μL a mais no branco), 10 μL de plasma do voluntário como fonte de PLTP (1:10), a mistura foi homogeneizada e incubada com os microtubos abertos a 37°C por 45 minutos. Após a incubação a reação foi parada com a adição de 300 μL de solução precipitante (MnCl_2 , heparina 10U/mL), homogeneizada por 10 segundos, mantida a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a 15000 rpm por 10 minutos. Em seguida foi retirado 500 μL do sobrenadante e adicionado em novo tubo contendo 3 mL de solução contadora. A leitura foi realizada no contador de cintilação beta (PACKARD, TRICARB 2100) e os resultados calculados em nmol de fosfatidilcolina/mL/hora [73].

3.7 Extrações de oxisteróis em artérias e plasma

Adaptado de Hodis *et al* (1991) para extração lipídica em tecidos, as artérias foram pesadas e adicionadas a tubos contendo cerca de 500 μL de PBS-EDTA (phosphate buffered saline - Ethylenediamine tetraacetic acid) pH 7,4 e 6 mL de solução Folch (2 clorofórmio : 1 metanol) com BHT (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Essa solução foi homogeneizada pelo triturador IKA(R) Ultra-Turrax T25 basic Disperser (Staufen, Germany). Posteriormente o tubo contendo o homogeneizado foi centrifugado em 3000 rpm por 15 minutos a 4°C . A fase orgânica foi adicionada em novo tubo e o solvente contendo a solução orgânica foi removido por evaporação à vácuo Genevac EZ-2 plus (Ipswich, England) em temperatura ambiente [74].

Para as etapas de extração dos oxisteróis, foram adicionados 100 ng dos padrões internos deuterados ([2H_5]24S-hidroxicoesterol, [2H_3]25-hidroxicoesterol, [2H_5]27-hidroxicoesterol e [d_7]7-ketocolesterol) e saponificadas com 0,4 M de KOH em etanol, por duas horas em temperatura ambiente. Logo após o pH da amostra foi ajustado para 7,0 com ácido fosfórico,

extraída com 6 mL de solução fisiológica, 20 mL de clorofórmio e centrifugada a 2000 rpm a 4°C por 15 minutos. A fase superior foi descartada e a fase orgânica contendo os lípides foi evaporada e redissolvida em tolueno. O colesterol foi separado dos oxisteróis por extração em fase sólida utilizando colunas Sigma-Aldrich Supelclean LC-Si SPE Tubes SUPELCO (Bellefonte, Pennsylvania). As amostras foram derivatizadas com solução silanizante, composta por 100 µL de piridina e 100 µL de BSTFA (N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida), 1% TMCS (trimetilclorosilane) (1/1, v/v) e incubados por 1 hora a 60°C. Os oxisteróis foram medidos por cromatografia gasosa acoplado ao espectrofotômetro de massa Shimadzu GCMS-QP2010 plus (Kioto, Japão). As concentrações dos oxisteróis foram corrigidas pela massa das artérias e expressas em ng/mg de tecido [75-77].

As extrações dos esteróis plasmáticos oxidados foram realizadas a partir da adição dos padrões internos citados no parágrafo anterior, partindo de 1 mL de amostra. As concentrações dos oxisteróis em plasma foram corrigidos pela quantidade de colesterol plasmático e expressos em ng/mg de colesterol.

3.8 Extrações de marcadores de síntese e absorção de colesterol em artérias e plasma

Os esteróis do plasma marcadores de absorção do colesterol intestinal (campesterol e β -sitosterol) e os marcadores de síntese de colesterol (desmosterol e latosterol) foram medidos por cromatografia gasosa no cromatógrafo a gás (GC) acoplado ao espectrofotômetro de massa (MS) marca Shimadzu GCMS-QP2010 plus (Kioto, Japão) utilizando versão 2.5 do software GCMS solution.

Em artérias foi utilizado o mesmo processo para extração de oxisteróis em tecido como descrito anteriormente. Em seguida seguiu-se as etapas para extração de marcadores de síntese e absorção de colesterol em plasma, 200 µL de amostra foram misturadas com o padrão interno (1 µg de 5 α -colestane) e saponificadas com 1 mL de KOH diluído em etanol (1 mol/L) a 60°C por 1 hora. Em seguida, a amostra foi misturada com 1 mL de água e extraída duas vezes com 2 mL hexana. O extrato de hexana contendo os esteróis foi seco sob fluxo

de nitrogênio e derivatizado com solução silanizante. Um microlitro da amostra foi injetado no cromatógrafo pelo injetor automático em modo de injeção split com taxa de split 1:3 e a temperatura do injetor foi mantida 280°C. A quantificação baseou-se no cromatograma de íons totais com correção pelo padrão interno 5 α -colestane. Em artérias os resultados foram expressos em $\mu\text{g/g}$ de tecido e plasma em ng/mg de colesterol total [78, 79].

Os métodos para quantificações de marcadores de síntese e absorção do colesterol e os oxisteróis sintetizados enzimaticamente (24S-HDC, 25-HDC e 27-HDC) e não enzimáticos (7-Keto) em plasma e ateromas foram realizados e padronizados em colaboração com a Dr^a Valéria Sutti Nunes do Laboratório de Lípidos (LIM-10) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP), coordenado pela Prof^a Dr^a Edna Regina Nakandakare.

3.9 Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos em média e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil após teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Foram usados teste estatístico de Mann Whitney para comparações entre grupos, teste de Chi-quadrado para sexo e morbidades e coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis. Para verificar diferenças entre gêneros em cada grupo (CTL e DAP), foram realizadas comparações por sexo. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. Foram utilizados os softwares GraphPad Prism 5 e SPSS 21 para as análises estatísticas.

4. RESULTADOS

4.1 Parâmetros antropométricos e bioquímicos

Os voluntários dos grupos controle (CTL) e doença arterial periférica (PAD), se diferenciaram apenas em pressão arterial sistólica, etilismo, proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP), proteína C reativa (PCR) e glicose, todas maiores no grupo DAP (Tabela 3 e 4).

Tabela 3: Comparações clínicas e antropométricos dos voluntários

Parâmetros	Total			Grupos					
	CTL (n=13)	DAP (n=10)	p	CTL		p	DAP		p
				Homem (n=6)	Mulher (n=7)		Homem (n=7)	Mulher (n=3)	
Idade (anos)	64±10	72±11	0,082	64±10	64±11	0,943	70±12	76±7	0,667
IMC (kg/m²)	23,4±3,9	22,3±2,8	0,642	22,8±3,2	24±4,6	0,945	22±2,5	23±3,8	0,833
PAS (mmHg)	123±10	147±17	0,002*	122±11	123±10	0,841	148±17	143±21	0,908
PAD (mmHg)	74±8	74±23	0,109	74±9	73±8	0,920	72±28	77±6	0,331
Tabagismo (%)	46	60	0,510	50	43	0,797	71	33	0,260
Diabetes (%)	23	60	0,072	16,6	28,5	0,612	43	100	0,091
Hipertensão (%)	38	70	0,133	33,3	43	0,725	57	100	0,175
Hipolipemiantes (%)	15	0	0,194	0	28,5	0,955	0	0	-----
Antidiabéticos (%)	15	40	0,183	0	28,5	0,155	14	100	0,011*
Antihipertensivo (%)	31	40	0,645	16	43	0,308	28,5	66	0,60

Dados apresentados como média±desvio padrão. p= teste Mann Whitney ou Chi-quadrado. CTL= controle; DAP= doença arterial periférica; IMC= índice de massa corpórea; PAS= pressão arterial sistólica; PAD= pressão arterial diastólica. *p≤0,05= significante.

Comparações por gênero entre os grupos, não mostraram diferenças significantes entre os voluntários CTL. Já entre DAP 71% eram tabagistas. Todas as mulheres no grupo DAP faziam o uso de antidiabéticos (Tabelas 3 e 4).

Tabela 4: Comparações bioquímicas dos voluntários

Parâmetros	Total			Grupos					
	CTL (n=13)	DAP (n=10)	p	CTL		p	DAP		p
				Homem (n=6)	Mulher (n=7)		Homem (n=7)	Mulher (n=3)	
CT (mg/dL)	167±45	139±45	0,218	161±54	173±38	0,731	128±55	157±13	0,250
HDL-C (mg/dL)	39±10	34±10	0,491	34±5	43±12	0,074	32±10	36±11	0,786
LDL-C (mg/dL)	103±40	86±36	0,404	104±49	102±35	0,945	79±46	97±9	0,250
VLDL-C (mg/dL)	26±11	20±10	0,179	23±9	29±12	0,317	17±7	24±14	0,881
TG (mg/dL)	130±53	98±51	0,192	113±45	145±59	0,295	85±35	119±74	1,000
Apo-A1 (mg/dL)	94±17	94±26	0,947	86±14	101±18	0,137	89±28	104±22	0,714
Apo-B (mg/dL)	73±18	81±35	0,422	71±21	75±17	0,836	70±39	103±10	0,167
Lp (a) (mg/dL)	18(31)	43(59)	0,204	17±19	33±32	0,234	40±43	61±17	0,262
CETP (%)	14±4	16±7	0,689	14±4	14±5	0,534	17±6	15±9	0,714
PLTP (nmolFC/mL/h)	8,0±1,7	9,8±1,7	0,019*	7,7±1,7	8,1±1,8	0,945	10±1,3	8,5±1,7	0,167
Glicose (mg/dL)	99±47	134±52	0,049*	109±68	90±17	0,886	108±30	185±51	0,052
HbA1c (%)	6,0±1,3	9,8±9,6	0,463	6,4±1,9	5,6±0,6	0,513	10,3±11,3	8,2±0,6	0,285
PCR (mg/dL)	0,77(1,5)	7,59(8,8)	0,008*	3,2±6,6	1,6±2,6	0,945	7,1±5,5	11,2±5,0	0,262
Creatinina (mg/dL)	0,77(0,2)	0,74(0,2)	0,495	0,97±0,32	0,72±0,15	0,101	1,08±0,85	0,63±0,10	0,109
Ureia (mg/dL)	28±7	42±63	0,475	29±5,5	28±8,5	0,886	49±76	26±11	0,647

Dados apresentados como média±desvio padrão ou mediana(intervalo interquartil). p= teste Mann Whitney. CTL= controle; DAP= doença arterial periférica; CT= colesterol total; HDL-C= high density lipoprotein cholesterol (lipoproteína de alta densidade colesterol); LDL-C= low density lipoprotein cholesterol (lipoproteína de baixa densidade colesterol); VLDL= very low density lipoprotein cholesterol (lipoproteína de muito baixa densidade colesterol) TG= triglicérides; Apo-A1= apolipoproteína-A1; Apo-B= apolipoproteína-B; Lp(a)= lipoproteína (a); CETP= cholesterol ester transfer protein (proteína de transferência de ester de colesterol); PLTP= phospholipids transfer protein (proteína de transferência de fosfolípidos) (nmol de fosfatidilcolina/mL/Hora); HbA1c= hemoglobina glicosilada; PCR= proteína C reativa. *p≤0,05= significativa.

Em relação aos dados hematológicos entre os grupos, foi observado diferença apenas em relação a concentração de células vermelhas do sangue (RBC) maiores no grupo CTL (Tabela 5).

Tabela 5: Comparações hematológicas dos voluntários

Parâmetros	Total		p
	CTL (n=13)	DAP (n=10)	
WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	8,3±3,5	12±5,1	0,058
RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	4,3±0,6	3,6±0,4	0,015*
Hemoglobina (g/dl)	12±2	10,4±1,4	0,099
Hematócrito (%)	36±6	32±4,6	0,100
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	348±120	474±403	0,641
Linfócitos (10^3)	1,6±0,7	1,8±0,6	0,494
Monócitos (10^3)	0,9±0,3	0,9±0,6	0,819
Eosinófilos (10^3)	0,2±0,1	0,3±0,3	0,446

Dados apresentados como média±desvio padrão. p= teste Mann Whitney. CTL= controle; DAP= doença arterial periférica; WBC= white blood cells (células brancas do sangue); RBC= red blood cells (células vermelhas do sangue). *p≤0,05= significativa.

Foram realizadas comparações estatísticas entre tipos de gêneros de cada grupo (Homem CTL Vs. Homem DAP) e (Mulher CTL Vs. Mulher DAP), mas não foi observado diferenças significantes para nenhuma variável (Tabelas 3, 4 e 5).

4.2 Oxisteróis em plasma e artérias

Em plasma, comparações entre os grupos mostraram apenas diferença significativa em relação ao 25-HDC e uma tendência de aumento do 27-HDC também em DAP. Análises por gênero entre os grupos, não indicou diferenças significantes em CTL, entretanto em DAP o 7-Keto foi significativamente maior em homens (Tabela 6).

Em artérias, comparações entre CTL e DAP indicaram que as concentrações de oxisteróis 24S-HDC e 27-HDC foram respectivamente cerca de 5 e 20 vezes

maiores em ateromas, já o 25-HDC curiosamente esteve em maior concentração em CTL. Em relação ao 7-Keto não houve diferença significativa. (Tabela 6).

Por gênero em grupos o 24S-HDC esteve 2,4 vezes em maiores concentrações nas mulheres CTL. No grupo DAP o 7-Keto nas mulheres foi semelhante, cerca de 2,25 vezes maior comparado aos homens. No restante não houve diferença estatística (Tabela 6).

Tabela 6: Concentração de oxisteróis em plasma e artérias dos voluntários

Oxisteróis	Total			Grupos					
	CTL (n=13)	DAP (n=10)	p	CTL		p	DAP		p
				Homem (n=6)	Mulher (n=7)		Homem (n=7)	Mulher (n=3)	
Plasma (ng/mgCT)									
24S-HDC	49(18)	56,1(46)	0,491	53±14	50±8	0,945	58±25	75±35	0,571
25-HDC	3,9(1,9)	6,3(2)	0,004*	4,0±1,1	4,6±1,7	0,945	6,9±1,8	6,5±0,7	0,571
27-HDC	66,6(32,4)	93,4(26,4)	0,076	77±16	73±23	0,534	109±60	97±16	0,785
7-Keto	55,1(33,1)	66,4(18,4)	0,690	68±21	69±43	0,445	78±22	47±15	0,036*
Artérias (ng/mgTecido)									
24S-HDC	0,20(0,23)	0,92(4,81)	0,016*	0,14±0,03	0,33±0,16	0,042*	2,0±2,6	5,6±7,8	0,833
25-HDC	0,91(1,04)	0,50(0,64)	0,020*	1,2±0,9	1,0±0,4	0,788	0,4±0,4	1,0±1,0	0,267
27-HDC	0,43(0,92)	9,27(29,8)	0,001*	0,34±0,19	1,4±1,4	0,164	13,0±13,6	20,1±25,8	0,667
7-Keto	14,8(13,9)	21,8(23)	0,228	11±7	18±7	0,149	16±10	36±11	0,033*

Dados apresentados como média±desvio padrão ou mediana(intervalo interquartil). p= teste Mann Whitney. CTL= controle; DAP= doença arterial periférica; CT= colesterol total; 24S-HDC= 24S-Hidroxicolesterol; 25-HDC= 25-Hidroxicolesterol; 27-HDC= 27-Hidroxicolesterol; 7-Keto= 7-Ketocolesterol. *p≤0,05= significativo.

Avaliando conjuntamente os dois grupos (CTL e DAP) n=23, a PCR se correlacionou positivamente com o 24S-HDC (r=0,555; p=0,009), 25-HDC (r=0,782; p=0,000) e 27-HDC (r=0,564; p=0,008) dosados em plasma. O 24S-HDC também se correlacionou negativamente com triglicérides e VLDL-C e o 25-HDC com colesterol total (Tabela 7). Em ateromas do grupo DAP foi observado uma correlação da PCR com o 24S-HDC (r=0,397, p=0,041) e 27-HDC (r=0,451, p=0,023).

Tabela 7: Correlação de parâmetros bioquímicos plasmáticos (CTL + DAP) n= 23

Parâmetros	24S-HDC		25-HDC		27-HDC	
	r	p	r	P	r	p
CT (mg/dL)	----	----	- 0,513	0,017	----	----
TG (mg/dL)	- 0,558	0,009	----	----	----	----
VLDL-C (mg/dL)	- 0,562	0,008	----	----	----	----
PCR (mg/dL)	0,505	0,010	0,748	<0,001	0,475	0,015

24S-HDC= 24S-Hidroxicolesterol; 25-HDC= Hidroxicolesterol; 27-HDC= Hidroxicolesterol; CT= colesterol total; TG= triglicérides; VLDL= very low density lipoprotein cholesterol (lipoproteína de muito baixa densidade colesterol); PCR= proteína C reativa. r= coeficiente de correlação de Spearman. p≤0,05= significativa.

4.3 Marcadores de síntese e absorção do colesterol em ateroma e plasma

Em plasma não observamos diferenças significantes entre CTL e DAP, nem entre gênero por grupo para os fitoesteróis (campesterol e β -sitosterol) e marcadores de síntese (Tabela 8).

Em artérias não foi possível comparar e observar diferenças significantes entre os grupos por falta de tecido suficiente para extração de esteróis em CTL. Não observamos distinção entre gêneros do grupo DAP (Tabela 8).

Tabela 8: Marcadores de síntese e absorção do colesterol em plasma e artérias

Marcadores	Total			Grupos					
	CTL (n=13)	DAP (n=10)	p	CTL		p	DAP		p
				Homem (n=6)	Mulher (n=7)		Homem (n=7)	Mulher (n=3)	
Plasma (ng/mgCol)									
Desmosterol	1,9±0,4	2,2±2,6	0,177	1,9±0,4	1,9±0,5	1,000	2,5±2,9	1,6±0,6	0,571
Latosterol	1,5±0,8	1,5±0,9	0,787	1,6±0,5	1,4±0,9	0,530	1,6±1,1	1,3±0,3	1,000
Campesterol	1,3±0,6	2,2±2,6	0,330	1,5±0,6	1,1±0,5	0,432	2,9±3,1	1,1±0,7	0,392
β-sitosterol	1,0±0,3	1,8±2,0	0,200	1,2±0,3	0,8±0,2	0,106	2,2±2,5	1,1±0,4	0,786
Artérias (µg/gTecido)									
Desmosterol	----	13,7±11,5	----	----	----	----	11,9±11,1	17,1±13,9	0,548
Latosterol	----	2,9±2,2	----	----	----	----	2,2±1,8	4,3±2,7	0,381
Campesterol	----	6,7±6,8	----	----	----	----	5,7±7,3	8,6±6,4	0,167
β-sitosterol	----	10,1±8,8	----	----	----	----	8,8±9,8	12,6±7,5	0,167

Dados apresentados como média±desvio padrão. p= teste Mann Whitney. CTL= controle; DAP= doença arterial periférica. *p≤0,05= significativa. ----- Não foi possível realizar extração por falta de tecido suficiente.

4.4 Classificações histológica dos ateromas do grupo DAP

Após análises histológicas descritivas de acordo com duas metodologias (Virmani *et al.*, 2000 e Stary *et al.*, 1994 e 1995) foi constatado lesões ateroscleróticas de grau avançado em todos os 10 ateromas classificados (Tabela 9). A Tabela 9 abaixo demonstra o número de indivíduos que se enquadraram em cada tipo de classificação.

Tabela 9: Classificação histológica dos ateromas

Grupo DAP (n=10)			
n	Virmani <i>et al.</i> , 2000 Descrição	n	Stary <i>et al.</i> , 1994 e 1995 Descrição
1	“Erosão”. Trombose luminal; Núcleo necrótico bem formado com uma capa fibrosa sobrejacente, sem comunicação de trombo com núcleo necrótico. Trombo mural em sua maioria e raramente oclusivo.	2	Lesão Va: Fibroateroma; Placa ateromatosa, Placa fibrolipídica, Placa fibrosa; lesão avançada.
2	“Capa fibrosa do ateroma”. Com núcleo necrótico nem formado e com uma capa fibrosa sobrejacente. Trombose está ausente.	1	Lesão Vb: Lesão calcificada; Placa calcificada; lesão avançada.
5	“Ruptura da placa”. A lesão consiste em Fibroateroma com ruptura da capa, trombo luminal se comunica com o núcleo necrótico subjacente. O trombo normalmente oclui o lúmen do vaso.	7	Lesão Tipo VI: Lesão com defeito na superfície e/ou hematoma/hemorragia e/ou depósito trombótico; Lesão complicada, placa complicada. Lesão avançada.
1	“Nódulo calcificado”. Calcificação nodular eruptiva com placa fibrocálcica subjacente. Trombo geralmente não oclusivo.		
1	“Placa fibrocálcica”. Consiste em placa rica em colágeno com estenose significativa, geralmente contém grandes áreas de calcificação com poucas células inflamatórias; um núcleo necrótico pode estar presente.		

n: número de indivíduos em cada classificação mencionada.

5. DISCUSSÃO

Esse estudo em humanos revelou o perfil quantitativo de quatro oxisteróis, três de origem enzimática (24S-HDC, 25-HDC e 27-HDC) e um não enzimático (7-Keto) de voluntários com doença arterial periférica aterosclerótica grave em plasma e ateromas. Baseado na literatura, mostramos que esses oxisteróis estão envolvidos em muitas vias da fisiopatologia da aterosclerose, como na sinalização e regulação da biossíntese do colesterol celular e nos mecanismos inflamatórios e imunológicos. Os oxisteróis de origem enzimáticas mensurados em plasma de CTL e DAP se correlacionaram positivamente com a PCR. Em ateromas apenas o 24S-HDC e 27-HDC se correlacionou com a inflamação sistêmica.

Os grupos CTL e DAP foram similares em relação a parâmetros antropométricos e bioquímicos séricos. As variáveis antropométricas e bioquímicas significativamente, maiores no grupo DAP (pressão arterial sistólica, glicose e proteína c reativa) estão de acordo com fatores de risco para a aterosclerose como hipertensão, diabetes e outras comorbidades relacionadas a este grupo [80].

O grupo CTL acometido por neoplasia gástrica, ainda que a literatura evidencie que os oxisteróis também podem estar envolvidos na carcinogênese, apenas o 5,6-Cholesterolepoxide e o Cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol constam como participantes dessa doença, validando o foco do estudo [54, 55, 57].

A atividade da CETP foi maior no grupo DAP, mas não foi estatisticamente significante. Porém vários estudos mostram a alta atividade da CETP como um contribuinte para o desenvolvimento da aterosclerose [81, 82]. Outro fato que nos chamou atenção segundo Lin & Morel (1996) é que a CETP pode ser responsável também pela transferência de oxisteróis esterificados, como o 25-HDC. De acordo com o estudo, a LCAT é a enzima que catalisa a esterificação por duas evidências: (i) experimento *in vitro* mostrou que a esterificação do 25-HDC foi parada por inibidores de LCAT, (ii) os ésteres formados foram monoésteres, ao invés de diésteres, corroborando com a constatação de que esteróis com grupo 3 β -Hidroxila e configuração *trans* nos anéis A/B são capazes de servir como ligantes na reação de transesterificação mediada pela LCAT. Após esterificado, o 25-HDC só pode ser transferido por proteínas de transferência de lípidos plasmáticos. Experimento *in*

vitro, mostrou que após a inibição da CETP a transferência e esterificação do 25-HDC foi cessada, evidenciando uma possível interação entre a CETP e a LCAT [83].

Em nosso trabalho a proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) se mostrou com maior atividade no grupo DAP. Segundo Laffitte et al (2003) os oxisteróis juntamente com Receptores X do fígado (LXR) regulam a expressão do gene da PLTP no fígado e em macrófagos de ratos [84]. Essa ligação da PLTP com oxisteróis é pouco explorado, deixando muitas questões não respondidas. Em relação a PLTP e a aterosclerose, um estudo demonstrou aumento da lesão e desestabilidade da placa aterosclerótica em ratos transgênicos com maior expressão de PLTP, além disso, foi observado nas lesões maior quantidade de macrófagos e menores de colágeno em comparação com os controles [80]. Outro estudo sugere que a atividade elevada da PLTP no plasma contribui para formação da aterosclerose, pelo fato de aumentar a produção de lipoproteínas contendo Apo-B e diminuir a vitamina E das lipoproteínas, favorecendo a sua oxidação. No entanto a PLTP derivada de macrófagos produzida no interior da parede arterial ou na lesão, são consideradas ateroprotetoras. Essa ação é dependente da concentração plasmática normal de Apo-A1 [85].

Em relação aos oxisteróis, esse estudo em seres humanos revelou o perfil quantitativo do 24S-HDC, 25-HDC, 27-HDC e 7-Keto em voluntários com doença arterial periférica aterosclerótica grave em plasma e ateroma. Baseado na literatura, mostramos que esses oxisteróis estão envolvidos em muitas vias da fisiopatologia da aterosclerose, como na sinalização e regulação da biossíntese do colesterol celular e nos mecanismos inflamatórios e imunológicos.

Apesar de não observarmos diferença na concentração plasmática do 24S-HDC, evidenciamos que esse oxisterol esteve mais abundante nas artérias com placas ateroscleróticas. Um fato intrigante é que o 24S-HDC é predominantemente expresso no cérebro, principalmente em neurônios, e são sintetizados como reguladores do excesso do colesterol cerebral, já que são mais permeáveis na barreira hematoencefálica que o colesterol. Também são ligantes de dois receptores hormonais nuclear (NHR), o LXR α expresso no fígado, intestino delgado, rim e tecido adiposo e LXR β expresso no cérebro e em níveis baixos em muitos

tecidos. Os NHR quando ligados ao 24S-HDC, ativam a transcrição de muitos genes envolvidos no metabolismo lipídico como a CETP, transportadores ABC, esteroil-CoA dessaturase-1, SREBP-1 e colesterol 7 α -hidroxilase (CYP7A) [86-88]. O 24S-HDC, ligante de LXR, induz a liberação do colesterol de células epiteliais do plexo coroide (CPE) via ABCA1 e ABCG1 para apolipoproteínas e lipoproteínas do fluido cérebro-espinhal (CSF), esse mecanismo é dependente de Apo-E. Essa via de liberação de colesterol pode desempenhar um papel importante na homeostase do colesterol no CSF. No plasma após esterificação, o 24S-HDC é transportado pela Apo-E para o fígado, onde pode ser hidroxilado pela CYP7A e convertido em ácidos biliares [89-91]. Porém, a conversão em ácidos biliares é responsável por apenas 40 a 50 % da eliminação do 24S-HDC, deixando uma grande fração da excreção e do metabolismo não explicados [90]. O aumento da concentração plasmática desse oxisterol tem sido descrito em indivíduos com doenças neurodegenerativas [92], mas até o presente não havia sido relatado o aumento na lesão aterosclerótica.

Essas evidências demonstram que ainda existem muitas questões não resolvidas em relação ao 24S-HDC, principalmente seu envolvimento na aterosclerose, uma vez que nossos dados mostraram o seu aumento na placa de ateroma do grupo DAP, mas não na circulação desses indivíduos. A relação desse oxisterol em plasma e ateroma com a inflamação sistêmica em nosso estudo foi semelhante com a encontrada em outro trabalho com doença de Alzheimer [53]. Uma recente revisão tem criado hipóteses de uma causa comum entre a aterosclerose e a doença de Alzheimer e o envolvimento de oxisteróis, principalmente 25-HDC [52].

Nossos experimentos esclarecem que o 25-HDC plasmático está em maior concentração no grupo DAP. Várias evidências mostram o 25-HDC como um componente da aterogênese. Experimentos *in vitro* apontam o 25-HDC como promotor do crescimento da interação de monócitos e células endoteliais aórticas humanas (HAECs) e do estímulo no aumento de espécies reativas de oxigênio intracelular. Esse estresse oxidativo pode ser responsável pela sinalização que intensificou a expressão de molécula 1 de adesão da célula vascular (VCAM-1) [93]. Foi relatado que o 25-HDC modula a secreção de IL-8 (uma citocina pró-aterogênica

envolvido na adesão de monócitos em células endoteliais vasculares) e inibe a síntese de tecido inibidor de metaloproteinase 1 (TIMP-1) [94]. A hipóxia gerada pelo 25-HDC de macrófagos humanos aumenta a secreção de IL-8. Os altos níveis intracelulares de H_2O_2 , uma espécie reativa de oxigênio que ativa a proteína ativadora 1 (AP-1), um fator de transcrição que se liga ao promotor da síntese de IL-8, pode ser responsável por esse processo e levar ao avanço do ateroma [95]. Foi evidenciado que monócitos aderentes e macrófagos derivados de monócitos coletado de sangue humano periférico expostos ao 25-HDC originou no aumento da produção de IL-8. O aumento foi de 3 a 10 vezes maior em monócitos quando comparados com controles (somente meio de cultura ou tratados com colesterol). Em macrófagos o aumento foi 20 vezes menor que em monócitos [65]. Esses dados sugerem que a produção de IL-8 estimulado pelo 25-HDC pode ser maior no sangue onde os monócitos circulam. Esses resultados podem estar de acordo com nosso estudo que mostra a alta concentração de 25-HDC no plasma do grupo DAP, onde a forte correlação positiva com a inflamação sistêmica, no caso da PCR, está evidenciada.

Várias vias têm sido propostas para a formação do 25-HDC. Há concentrações baixas desse oxisterol na maioria dos tecidos e tem sido difícil demonstrar conclusivamente a sua origem. Dados baseados na literatura em recentes pesquisas in vivo, sugerem que o 25-HDC pode ter uma função como um regulador imunológico [96].

Nossos dados indicaram que as concentrações de 25-HDC em tecido foram maiores nas artérias controle (grupo CTL), quando comparados com as artérias com placas ateroscleróticas (grupo DAP). Em outro trabalho o 25-HDC se apresentou em pequenas concentrações em células espumosas da lesão ateroscleróticas de coelhos [50]. Sabe-se que esse oxisterol é um importante inibidor da biossíntese de colesterol em distintos tipos celulares [97, 98]. O 25-HDC provoca o tráfego de colesterol da membrana plasmática para o retículo endoplasmático (RE) por alterar a estrutura da membrana plasmática, aumentando a disponibilidade de colesterol para receptores externos [99]. A síntese de colesterol celular é regulada pela proteína de ligação de elemento regulador de esteróis (SREBP), um receptor

nuclear residente no RE que é ativado em concentrações baixas de colesterol. Essa ativação é dependente de dois acompanhantes, o gene induzido por insulina (INSIG), proteína que ancora o SREBP no RE, e a proteína de ativação de clivagem de SREBP (SCAP), que segue o SREBP até o complexo de Golgi onde sofre processamento proteolítico e em seguida é importado para o núcleo do RE onde se ligam a genes reguladores de esteróis para produção endógena de colesterol intracelular. A presença de esteróis no RE inibe esse processo por promoverem mudanças conformacionais nos acompanhantes de SREBP, o 25-HDC se ligam as INSIG e o colesterol na SCAP, cessando a produção de colesterol celular [100]. Outro autor também afirma que o 25-HDC diminui a síntese de colesterol, em grande parte através do cessamento da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-redutase (HMG-CoA redutase), através da inibição da transcrição do gene ou degradação acelerada da enzima [101]. Por algum mecanismo desconhecido, nosso estudo evidenciou que o 25-HDC apresentou-se em baixas concentrações nas artérias com ateromas do grupo DAP. Esse fato pode contribuir para a progressão sistêmica da lesão por aumentar a produção do colesterol celular local.

Em relação aos marcadores de síntese do colesterol, desmosterol, assim como o 25-HDC, foi capaz de suprimir a transformação de SREBP e a expressão do gene alvo. O desmosterol é especialmente eficaz para a ativação de genes alvo de LXR, tais efeitos do desmosterol sobre SREBP e LXR podem ser relevantes para a homeostase de lípidos nas células e tecidos com alto teor de desmosterol. Um estudo *in vitro* demonstrou a capacidade do desmosterol em substituir o colesterol na manutenção da proliferação das células J774, contribuindo para a viabilidade e crescimento celular [102]. Porém em nosso estudo não houve relação com a doença aterosclerótica e outras variáveis abordadas. Assim como os marcadores de absorção do colesterol.

O 27-HDC em nossa investigação esteve significativamente aumentado, cerca de 15 vezes, em ateromas do grupo DAP. Não foi observado distinção plasmática na concentração desse oxisterol. De acordo com outros estudos o 27-HDC é o oxisterol mais abundante em ateroma [50, 97]. É conhecido que o 27-HDC é formado por esterol 27-hidroxilase (CYP27A1) e é o oxisterol mais abundante na

circulação de humanos adultos. A CYP27A1 é amplamente distribuída entre os tecidos e órgãos, sua atividade é maior no endotélio vascular e em macrófagos [103, 104]. A produção do 27-HDC em células extra-hepáticas e o seu transporte para o fígado, fornece uma alternativa para o transporte reverso de colesterol dependente da HDL, representando um mecanismo antiaterogênico que contribui para a regulação do colesterol total [105, 106]. Em contraste estudos recentes mostraram que a ação do 27-HDC favorece a formação da aterosclerose, e que o cultivo de macrófagos contendo 27-HDC em meio de cultura resultou em um significativo aumento na expressão e secreção de TNF- α . Estas informações sugerem que o 27-HDC podem modular a resposta inflamatória e os efeitos da carga infecciosa em macrófagos, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α [107]. O mesmo grupo propôs que o 27-HDC pode contribuir para respostas imunes em lesões ateroscleróticas através do aumento da expressão de múltiplas moléculas CD, assim como moléculas de MHC de células monocíticas, uma vez que o tratamento de células THP-1 com 27-HDC, mostrou um aumento no número de células aderentes [108].

Foi demonstrado também que o 27-HDC é capaz de induzir a liberação de fator de transformação do crescimento beta (TGF- β 1) através de uma via dependente do NF- κ B [109]. O NF- κ B é relatado como regulador da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, enzimas e moléculas de adesão em doenças inflamatórias crônicas, como a aterosclerose [109, 110]. O TGF- β 1 é um mediador chave em uma variedade de processos patológicos, incluindo respostas de reparação por fibroblastos [109, 111]. Estudos *in vitro* em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) demonstraram que o 27-HDC estimulou a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos e provocou fortes efeitos sobre o colágeno tipo I e produção de fibronectina. Os miofibroblastos têm propriedades de contração e capacidade para produzir várias citocinas, fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular [109, 112]. Estes efeitos fibróticos do 27-HDC podem contribuir para o estreitamento das vias respiratórias dos pacientes com DPOC, assim como o estreitamento luminal das artérias no caso da aterosclerose avançada no grupo DAP em nosso estudo. Um recente trabalho afirma que o 27-

HDC promove aterosclerose independente da concentração de colesterol por meio de processos pró inflamatórios mediado por receptores de estrógeno alfa, ou seja, os resultados sugerem que os benefícios ateroprotetores do estrogênio pode ser atenuado em mulheres mais velhas pelo aumento do 27-HDC com o avanço da idade [113].

De acordo com a literatura, em relação ao 27-HDC, existem muitos experimentos *in vitro* associados com mecanismos aterogênicos. De fato, em nosso estudo, esse oxisterol está acumulado na placa de aterosclerose e foi associado com a atividade inflamatória sistêmica, porém são necessárias mais investigações *in vivo* para comprovar seu principal envolvimento nessa doença.

Em nosso trabalho não houve diferença do 7-Keto em plasma e em artérias entre o grupo CTL e DAP, diferentemente do trabalho de Iuliano et al (2003) que mostrou uma concentração cerca de 35 vezes maior nas placas ateroscleróticas obtidas de carótidas em relação as artérias controles (5 indivíduos em cada grupo). O mesmo ensaio realizado em fígado normal e cirrótico não mostrou nenhuma diferença [114]. Vários outros trabalhos apontam o 7-Keto como um componente envolvido na doença aterosclerótica [97, 115]. A doença acometida pelos pacientes controles do grupo CTL, câncer gástrico, gera estresse oxidativo por diferentes mecanismos, as células inflamatórias ativas geram espécies reativas de oxigênio nessa doença [116]. Essa evidencia pode explicar o fato de não constar diferenças significantes do 7-Keto em nosso estudo, uma vez que esse oxisterol é formado por oxidação não enzimática e em condições de alta concentração de radicais livres pode ocorrer o aumento da produção de 7-Keto.

A classificação histológica dos tipos de ateromas do grupo DAP mostrou 50% dos pacientes com ruptura da placa, mas todas as placas são avançadas considerando os resultados histológicos. De acordo com Virmani et al (2000) essa classificação é típica em 60% dos casos de morte súbita por trombos no lúmen e são as causas mais frequentes de óbito em homens com menos de 50 anos e mulheres com mais de 50 anos. Em relação as outras classificações do grupo DAP: (1) No caso da capa fibrosa do ateroma não há nenhuma evidência clara da sequência de eventos relacionados ao aumento nas mudanças do núcleo lipídico

para o desenvolvimento da capa fibrosa. (2) Já as erosões da placa acontecem em 40% das mortes súbitas coronarianas trombóticas e são mais comuns em mulheres e homens com menos de 50 anos idade, essa classificação está ligada principalmente com o tabagismo, estando de acordo com nosso estudo. (3) A placa fibrocalcificada pode ser a etapa final de um processo de ruptura da placa do ateroma ou erosão com cicatrização e calcificação. (4) O nódulo calcificado, é uma causa menos frequente de oclusão arterial trombótica sem ruptura, geralmente estas lesões são encontradas na artéria coronária direita [39]. Não observamos associações das classificações histológicas com outras variáveis.

O foco desse estudo foi avaliar o perfil de oxisteróis na doença arterial periférica grave. Apesar da patologia conhecida dos controles, estudos bibliográficos prévios demonstraram a não interferência nos esteróis estudados. Apenas com o 7-Keto foi observado possível influência da geração de radicais livres na biossíntese desse oxisterol. Mesmo assim evidenciamos dados relevantes dos oxisteróis analisados em seres humanos em relação à doença aterosclerótica, a qual abre novos caminhos para novos estudos e perspectivas.

6. CONCLUSÃO

A concentração dos oxisteróis de origem enzimática 24S-HDC e 27-HDC é substancialmente maior nos segmentos arteriais com ateroma quando comparado aos controles. O 25-HDC e o 7-Keto não tiveram a mesma associação com a presença do ateroma.

Embora a atividade inflamatória sistêmica se correlacione com os níveis plasmáticos de todos os oxisteróis de origem enzimática, essa atividade só se correlacionou com o conteúdo do 24S-HDC e 27-HDC na parede arterial. Como os níveis plasmáticos de 25-HDC foram mais elevados nos indivíduos com DAP, é possível que esse oxisterol se associe indiretamente com a doença, estimulando ou sendo estimulado pela atividade inflamatória sistêmica.

Não observamos diferenças significantes em relação aos marcadores de síntese e absorção do colesterol e a presença de DAP em nosso estudo.

Apesar de observamos uma atividade da PLTP mais elevada nos indivíduos com DAP, não encontramos associação com a concentração plasmática ou tecidual dos oxisteróis. Não houve associação entre a atividade da CETP e a DAP.

7. REFERÊNCIAS

1. Murphy, W.A., Jr., et al., *The iceman: discovery and imaging*. Radiology, 2003. **226**(3): p. 614-29.
2. Thompson, R.C., et al., *Atherosclerosis across 4000 years of human history: the Horus study of four ancient populations*. Lancet, 2013. **381**(9873): p. 1211-22.
3. Romiti, C.B.B., *Análise da ocorrência de Imagens Sugestivas de Calcificações da Artéria Carótida em Radiografias Panorâmicas*. 2009, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul: Campo Grande-MS.
4. World Health Organization. *Cardiovascular Disease*. 2011 [cited 2013 05 de agosto]; Available from: http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cvd/en/index.html.
5. DATASUS. *CID versão 10*. 2013 [cited 2013 29 de julho]; Available from: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205>.
6. Abrahão, M.T.F., M.R.C. Nobre, and M.A. Gutierrez, *Estatística Descritiva de uma População de Pacientes Atendidos no InCor com Doença Cardiovascular Aterosclerótica*, in *XIII Congresso Brasileiro de Informática em Saúde - CBIS 2012*. 2012.
7. Frostegard, J., *Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease*. BMC Med, 2013. **11**: p. 117.
8. Sposito, A.C., et al., *[IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology]*. Arq Bras Cardiol, 2007. **88** Suppl 1: p. 2-19.
9. Santos, R.D., et al., *[First guidelines on fat consumption and cardiovascular health]*. Arq Bras Cardiol, 2013. **100**(1 Suppl 3): p. 1-40.
10. Welmer, A.K., et al., *Vascular Risk Factor Burden, Atherosclerosis, and Functional Dependence in Old Age: A Population-Based Study*. Int J Behav Med, 2013.
11. Xavier, H.T., et al., *V Diretriz Brasileira de Dislipidemia e Prevenção da Aterosclerose*. Arq Bras Cardiol, 2013. **101**(4 Suppl 1): p. 1-20.
12. Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson, *Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 317-25.
13. Hadi, H.A., C.S. Carr, and J. Al Suwaidi, *Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome*. Vasc Health Risk Manag, 2005. **1**(3): p. 183-98.
14. Higashi, Y., et al., *Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases*. Circ J, 2009. **73**(3): p. 411-8.
15. Evora, P.R., et al., *Endothelium dysfunction classification: why is it still an open discussion?* Int J Cardiol, 2009. **137**(2): p. 175-6.
16. Rajendran, P., et al., *The vascular endothelium and human diseases*. Int J Biol Sci, 2013. **9**(10): p. 1057-69.
17. Vasconcelos, S.M.L., et al., *Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação*. Quim. Nova, v.30, p. 1323-1338, 2007. Química Nova, 2007. **30**(5): p. 1323-1338.
18. Barbosa, K.B.F., et al., *Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios*. Revista de Nutrição, 2010. **23**: p. 629-643.

19. Ohayon, J., et al., *Biomechanics of atherosclerotic coronary plaque: site, stability and in vivo elasticity modeling*. Ann Biomed Eng, 2014. **42**(2): p. 269-79.
20. Schwartz, S.M., et al., *Plaque rupture in humans and mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(4): p. 705-13.
21. Wildgruber, M., F.K. Swirski, and A. Zernecke, *Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis*. Theranostics, 2013. **3**(11): p. 865-84.
22. Estruch, M., et al., *Electronegative LDL: a circulating modified LDL with a role in inflammation*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 181324.
23. Burchardt, P., et al., *Low-density lipoprotein, its susceptibility to oxidation and the role of lipoprotein-associated phospholipase A2 and carboxyl ester lipase lipases in atherosclerotic plaque formation*. Arch Med Sci, 2013. **9**(1): p. 151-8.
24. Rosenson, R.S., et al., *Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport*. Circulation, 2012. **125**(15): p. 1905-19.
25. Dallinga-Thie, G.M., et al., *The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight*. Atherosclerosis, 2010. **211**(1): p. 1-8.
26. Altmann, S.W., et al., *Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption*. Science, 2004. **303**(5661): p. 1201-4.
27. Iqbal, J. and M.M. Hussain, *Intestinal lipid absorption*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **296**(6): p. E1183-94.
28. Kontush, A., M. Lhomme, and M.J. Chapman, *Unraveling the complexities of the HDL lipidome*. J Lipid Res, 2013. **54**(11): p. 2950-63.
29. McGrowder, D., et al., *The role of high-density lipoproteins in reducing the risk of vascular diseases, neurogenerative disorders, and cancer*. Cholesterol, 2011. **2011**: p. 496925.
30. Tsompanidi, E.M., et al., *HDL biogenesis and functions: role of HDL quality and quantity in atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2010. **208**(1): p. 3-9.
31. Ng, T.W., et al., *Effect of weight loss on LDL and HDL kinetics in the metabolic syndrome: associations with changes in plasma retinol-binding protein-4 and adiponectin levels*. Diabetes Care, 2007. **30**(11): p. 2945-50.
32. Kapur, N.K., D. Ashen, and R.S. Blumenthal, *High density lipoprotein cholesterol: an evolving target of therapy in the management of cardiovascular disease*. Vasc Health Risk Manag, 2008. **4**(1): p. 39-57.
33. Chen, G., et al., *Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(31): p. 11245-50.
34. Karasinska, J.M. and M.R. Hayden, *Cholesterol metabolism in Huntington disease*. Nat Rev Neurol, 2011. **7**(10): p. 561-72.
35. Yu, L., et al., *Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8*. J Biol Chem, 2003. **278**(18): p. 15565-70.
36. Jia, L., J.L. Betters, and L. Yu, *Niemann-pick C1-like 1 (NPC1L1) protein in intestinal and hepatic cholesterol transport*. Annu Rev Physiol, 2011. **73**: p. 239-59.

37. Stary, H.C., et al., *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Circulation, 1994. **89**(5): p. 2462-78.
38. Stary, H.C., et al., *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Circulation, 1995. **92**(5): p. 1355-74.
39. Virmani, R., et al., *Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(5): p. 1262-75.
40. Sakakura, K., et al., *Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression*. Heart Lung Circ, 2013. **22**(6): p. 399-411.
41. Cecil, R.L.F., L. Goldman, and A.I. Schafer, *Cecil medicine*. 2012.
42. Virgini-Magalhães, C.E., *Doença vascular periférica acima e abaixo do diafragma: a equipe médica e o intervencionista devem atuar juntos?* Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto, 2013. **12**(3).
43. Feiring, A.J., et al., *Preventing leg amputations in critical limb ischemia with below-the-knee drug-eluting stents: the PaRADISE (PReventing Amputations using Drug eluting StEnts) trial*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(15): p. 1580-9.
44. Makdisse, M., et al., *Prevalence and risk factors associated with peripheral arterial disease in the Hearts of Brazil Project*. Arq Bras Cardiol, 2008. **91**(6): p. 370-82.
45. Vaya, J., *The association between biomarkers in the blood and carotid plaque composition-focusing on oxidized lipids, oxysterols and plaque status*. Biochem Pharmacol, 2013. **86**(1): p. 15-8.
46. Bjorkhem, I. and U. Diczfalusy, *Oxysterols: friends, foes, or just fellow passengers?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(5): p. 734-42.
47. Silva, M.M., J.F. Carvalho, and M.L.S.A. Emelo, *Oxisteróis: O seu papel na saúde e na doença*. Sociedade Portuguesa de Química, 2011. **121**.
48. Haslewood, G.A., *Metabolism of steroids: The isolation of 7-hydroxycholesterol and of the "hepatols" from ox liver*. Biochem J, 1939. **33**(5): p. 709-12.
49. Jurado, M.C., *Efeito dos oxisteróis na sinalização através de caveolas e sua relevância na aterosclerose*, in *Faculdade de Medicina*. 2010, Universidade de São Paulo: São Paulo.
50. Hulten, L.M., et al., *Oxysterols present in atherosclerotic tissue decrease the expression of lipoprotein lipase messenger RNA in human monocyte-derived macrophages*. J Clin Invest, 1996. **97**(2): p. 461-8.
51. Khatib, S. and J. Vaya, *Oxysterols and symptomatic versus asymptomatic human atherosclerotic plaque*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **446**(3): p. 709-13.
52. Lathe, R., A. Sapronova, and Y. Kotelevtsev, *Atherosclerosis and Alzheimer - diseases with a common cause? Inflammation, oxysterols, vasculature*. BMC Geriatr, 2014. **14**: p. 36.
53. Zuliani, G., et al., *Plasma 24S-hydroxycholesterol levels in elderly subjects with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia: a case-control study*. BMC Neurol, 2011. **11**: p. 121.

54. Jusakul, A., et al., *Mechanisms of oxysterol-induced carcinogenesis*. Lipids Health Dis, 2011. **10**: p. 44.
55. Sevanian, A. and A.R. Peterson, *Cholesterol epoxide is a direct-acting mutagen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(13): p. 4198-202.
56. Garcia-Cruset, S., et al., *Oxysterol profiles of normal human arteries, fatty streaks and advanced lesions*. Free Radic Res, 2001. **35**(1): p. 31-41.
57. Sevanian, A. and A.R. Peterson, *The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products*. Food Chem Toxicol, 1986. **24**(10-11): p. 1103-10.
58. Lo, W.B. and H.S. Black, *Formation of cholesterol-derived photoproducts in human skin*. J Invest Dermatol, 1972. **58**(5): p. 278-83.
59. Liao, P.L., et al., *Cholesterol-3-beta, 5-alpha, 6-beta-triol induced PI(3)K-Akt-eNOS-dependent cyclooxygenase-2 expression in endothelial cells*. Toxicol Lett, 2009. **190**(2): p. 172-8.
60. Gueguen, Y., et al., *Control of apolipoprotein E secretion by 25-hydroxycholesterol and proinflammatory cytokines in the human astrocytoma cell line CCF-STTG1*. Cell Biol Toxicol, 2001. **17**(3): p. 191-9.
61. Kolsch, H., et al., *The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells*. Brain Res, 1999. **818**(1): p. 171-5.
62. Lutjohann, D., et al., *Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients*. J Lipid Res, 2000. **41**(2): p. 195-8.
63. Breteillon, L., et al., *Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol in patients with neurological diseases*. Neurosci Lett, 2000. **293**(2): p. 87-90.
64. Brown, A.J., et al., *7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque*. J Lipid Res, 1997. **38**(9): p. 1730-45.
65. Liu, Y., L.M. Hulten, and O. Wiklund, *Macrophages isolated from human atherosclerotic plaques produce IL-8, and oxysterols may have a regulatory function for IL-8 production*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(2): p. 317-23.
66. Brown, A.J. and W. Jessup, *Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(3): p. 111-22.
67. Otaegui-Arrazola, A., et al., *Oxysterols: A world to explore*. Food Chem Toxicol, 2010. **48**(12): p. 3289-303.
68. Wang, X., et al., *SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis*. Cell, 1994. **77**(1): p. 53-62.
69. Staprans, I., et al., *The role of dietary oxidized cholesterol and oxidized fatty acids in the development of atherosclerosis*. Mol Nutr Food Res, 2005. **49**(11): p. 1075-82.
70. Junqueira, L.C.U. and L.M.M.S. Junqueira, *Técnicas básicas de citologia e histologia*. 1ª ed. 1983, São Paulo-SP, . 123.
71. Friedewald, W.T., R.I. Levy, and D.S. Fredrickson, *Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge*. Clin Chem, 1972. **18**(6): p. 499-502.
72. Lagrost, L., *Determination of the mass concentration and the activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP)*. Methods Mol Biol, 1998. **110**: p. 231-41.

73. Jauhiainen, M. and C. Ehnholm, *Determination of human plasma phospholipid transfer protein mass and activity*. Methods, 2005. **36**(2): p. 97-101.
74. Hodis, H.N., D.W. Crawford, and A. Sevanian, *Cholesterol feeding increases plasma and aortic tissue cholesterol oxide levels in parallel: further evidence for the role of cholesterol oxidation in atherosclerosis*. Atherosclerosis, 1991. **89**(2-3): p. 117-26.
75. Dzeletovic, S., et al., *Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry*. Anal Biochem, 1995. **225**(1): p. 73-80.
76. Ketomaki, A., et al., *Squalene and noncholesterol sterols in serum and lipoproteins of children with and without familial hypercholesterolemia*. Pediatr Res, 2003. **53**(4): p. 648-53.
77. Burkard, I., et al., *Lipoprotein distribution and biological variation of 24S- and 27-hydroxycholesterol in healthy volunteers*. Atherosclerosis, 2007. **194**(1): p. 71-8.
78. Phillips, K.M., D.M. Ruggio, and J.A. Bailey, *Precise quantitative determination of phytosterols, stanols, and cholesterol metabolites in human serum by capillary gas-liquid chromatography*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1999. **732**(1): p. 17-29.
79. Ahmida, H.S., et al., *Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with selective ion monitoring (SIM)*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2006. **842**(1): p. 43-7.
80. Moerland, M., et al., *Acute elevation of plasma PLTP activity strongly increases pre-existing atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(7): p. 1277-82.
81. de Grooth, G.J., et al., *A review of CETP and its relation to atherosclerosis*. J Lipid Res, 2004. **45**(11): p. 1967-74.
82. Oliveira, H.C. and E.C. de Faria, *Cholesteryl ester transfer protein: the controversial relation to atherosclerosis and emerging new biological roles*. IUBMB Life, 2011. **63**(4): p. 248-57.
83. Lin, C.Y. and D.W. Morel, *Esterification of oxysterols in human serum: effects on distribution and cellular uptake*. J Lipid Res, 1996. **37**(1): p. 168-78.
84. Laffitte, B.A., et al., *The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(6): p. 2182-91.
85. Valenta, D.T., et al., *Atheroprotective potential of macrophage-derived phospholipid transfer protein in low-density lipoprotein receptor-deficient mice is overcome by apolipoprotein AI overexpression*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(7): p. 1572-8.
86. Russell, D.W., *Oxysterol biosynthetic enzymes*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1529**(1-3): p. 126-35.
87. Bjorkhem, I., et al., *Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation*. J Lipid Res, 1998. **39**(8): p. 1594-600.
88. Bjorkhem, I., et al., *Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain*.

- as measured with $^{18}O_2$ techniques in vivo and in vitro. J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30178-84.
89. Babiker, A. and U. Diczfalusy, *Transport of side-chain oxidized oxysterols in the human circulation*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1392**(2-3): p. 333-9.
 90. Bjorkhem, I., et al., *From brain to bile. Evidence that conjugation and omega-hydroxylation are important for elimination of 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) in humans*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37004-10.
 91. Fujiyoshi, M., et al., *24S-hydroxycholesterol induces cholesterol release from choroid plexus epithelial cells in an apical- and apoE isoform-dependent manner concomitantly with the induction of ABCA1 and ABCG1 expression*. J Neurochem, 2007. **100**(4): p. 968-78.
 92. Leoni, V. and C. Caccia, *24S-hydroxycholesterol in plasma: a marker of cholesterol turnover in neurodegenerative diseases*. Biochimie, 2013. **95**(3): p. 595-612.
 93. Naito, Y., et al., *Tocotrienols reduce 25-hydroxycholesterol-induced monocyte-endothelial cell interaction by inhibiting the surface expression of adhesion molecules*. Atherosclerosis, 2005. **180**(1): p. 19-25.
 94. Lemaire-Ewing, S., et al., *Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols*. Cell Biol Toxicol, 2005. **21**(2): p. 97-114.
 95. Rydberg, E.K., et al., *Hypoxia increases 25-hydroxycholesterol-induced interleukin-8 protein secretion in human macrophages*. Atherosclerosis, 2003. **170**(2): p. 245-52.
 96. Diczfalusy, U., *On the formation and possible biological role of 25-hydroxycholesterol*. Biochimie, 2013. **95**(3): p. 455-60.
 97. Schroepfer, G.J., Jr., *Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes*. Physiol Rev, 2000. **80**(1): p. 361-554.
 98. Russell, D.W., *The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 137-74.
 99. Olsen, B.N., et al., *25-Hydroxycholesterol increases the availability of cholesterol in phospholipid membranes*. Biophys J, 2011. **100**(4): p. 948-56.
 100. Ikonen, E., *Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 125-38.
 101. Gold, E.S., et al., *ATF3 protects against atherosclerosis by suppressing 25-hydroxycholesterol-induced lipid body formation*. J Exp Med, 2012. **209**(4): p. 807-17.
 102. Rodriguez-Acebes, S., et al., *Desmosterol can replace cholesterol in sustaining cell proliferation and regulating the SREBP pathway in a sterol-Delta24-reductase-deficient cell line*. Biochem J, 2009. **420**(2): p. 305-15.
 103. Reiss, A.B., et al., *Sterol 27-hydroxylase: expression in human arterial endothelium*. J Lipid Res, 1997. **38**(6): p. 1254-60.
 104. Babiker, A., et al., *Elimination of cholesterol in macrophages and endothelial cells by the sterol 27-hydroxylase mechanism. Comparison with high density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport*. J Biol Chem, 1997. **272**(42): p. 26253-61.

105. Weingartner, O., et al., *An alternative pathway of reverse cholesterol transport: the oxysterol 27-hydroxycholesterol*. *Atherosclerosis*, 2010. **209**(1): p. 39-41.
106. Diczfalusy, U., et al., *Novel pathways for elimination of cholesterol by extrahepatic formation of side-chain oxidized oxysterols*. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 1996. **226**: p. 9-17.
107. Kim, S.M., et al., *27-hydroxycholesterol induces production of tumor necrosis factor- α from macrophages*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **430**(2): p. 454-9.
108. Son, Y., et al., *Oxysterols induce transition of monocytic cells to phenotypically mature dendritic cell-like cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **438**(1): p. 161-8.
109. Kikuchi, T., et al., *Increase of 27-hydroxycholesterol in the airways of patients with COPD: possible role of 27-hydroxycholesterol in tissue fibrosis*. *Chest*, 2012. **142**(2): p. 329-37.
110. Barnes, P.J. and M. Karin, *Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases*. *N Engl J Med*, 1997. **336**(15): p. 1066-71.
111. Blobel, G.C., W.P. Schiemann, and H.F. Lodish, *Role of transforming growth factor β in human disease*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(18): p. 1350-8.
112. Gabbiani, G., *The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases*. *J Pathol*, 2003. **200**(4): p. 500-3.
113. Umetani, M., et al., *The Cholesterol Metabolite 27-Hydroxycholesterol Promotes Atherosclerosis via Proinflammatory Processes Mediated by Estrogen Receptor Alpha*. *Cell Metab*, 2014.
114. Iuliano, L., et al., *Measurement of oxysterols and alpha-tocopherol in plasma and tissue samples as indices of oxidant stress status*. *Anal Biochem*, 2003. **312**(2): p. 217-23.
115. Lyons, M.A. and A.J. Brown, *7-Ketocholesterol*. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999. **31**(3-4): p. 369-75.
116. Sosa, V., et al., *Oxidative stress and cancer: an overview*. *Ageing Res Rev*, 2013. **12**(1): p. 376-90.

ANEXOS



CEP, 22/12/11
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 996/2011 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0903.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE OXILÍPIDES EM ATEROMAS E PLASMA DE PACIENTES COM DOENÇA FEMORAL OCLUSIVA SUBMETIDOS À CIRURGIA DE AMPUTAÇÃO".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Vitor Wilson de Moura Virginio

INSTITUIÇÃO: Hospital de Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 16/09/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 22/12/12 (O formulário encontra-se no site acima).

II – OBJETIVOS.

Identificar e quantificar as classes de lipídeos oxigenados (oxilípides) presentes em placas ateroscleróticas removidas de artérias femorais de pacientes amputados, utilizando a abordagem de lipidômica direcionada através da técnica de UPLC-MS/MS, identificar e quantificar as classes de oxilípides presentes no plasma dos mesmos pacientes, utilizando a mesma metodologia, identificar possíveis oxilípides como marcadores inflamatórios circulantes que evidenciem a presença de placa aterosclerótica e sua gravidade através da análise dos dados de lipidômica, clínicos e bioquímicos por estatística multivariada e ferramentas de bioinformática e medir a associação das concentrações de oxilípides com dados clínico-laboratoriais e com atividades de proteínas séricas de transporte de lipídeos.

III – SUMÁRIO.

Serão avaliados 50 pacientes consecutivos, submetidos a amputação de membro inferior por isquemia arterial, sob supervisão da área de Moléstias Vasculares Periféricas, do Depto. de Cirurgia da FCM/UNICAMP. De cada paciente serão colhidos 50 ml de sangue antes do procedimento cirúrgico e o membro amputado será estudado para as análises dos oxilípides necessárias para o cumprimento dos objetivos.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP.



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

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

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

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

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

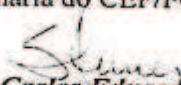
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e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

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

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

VII- DATA DA REUNIÃO.

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de setembro de 2011.


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

CEP, 25/03/14.
(PARECER CEP: Nº 996/2011)

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE OXILÍPIDES EM ATEROMAS E PLASMA DE PACIENTES COM DOENÇA FEMORAL OCLUSIVA SUBMETIDOS À CIRURGIA DE AMPUTAÇÃO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Vitor Wilson de Moura Virginio

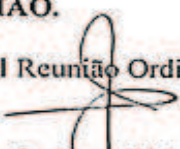
II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprova a inclusão do grupo controle e a nova versão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

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

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na II Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de março de 2014.


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

