

EDILMA MARIA DE ALBUQUERQUE VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E DOS
MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES
HIPERLIPIDÊMICOS**

CAMPINAS

2007

EDILMA MARIA DE ALBUQUERQUE VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E DOS
MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES
HIPERLIPIDÊMICOS**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. LÚCIA NASSI CASTILHO

CAMPINAS

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

V441a Vasconcelos, Edilma Maria de Albuquerque
Avaliação do estresse oxidativo e dos marcadores inflamatórios em
pacientes hiperlipidêmicos. / Edilma Maria de Albuquerque
Vasconcelos. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador: Lucia Nassi Castilho
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Aterosclerose. 2. Estresse oxidativo. 3. Hiperlipidemia. 4.
Citocinas. I. Castilho, Lucia Nassi. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em ingles: Evaluation of the oxidative stress and inflammatory
markers in hyperlipidemic patients**

Keywords:

- **Atherosclerosis**
- **Oxidative stress**
- **Hyperlipidemia**
- **Cytokines**

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Doutorado em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Profª Drª Lucia Nassi Castilho

Profº Drº Eros Antônio de Almeida

Profª Drª Marta Helena Krieger

Profª Drª Patrícia Miralda Cazita

Profª Drª Rosário Hirata

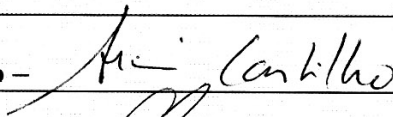
Data da defesa: 08-02-2007

Banca examinadora da tese de Doutorado

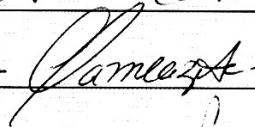
Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Lucia Nassi Castilho

Membros:

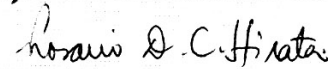
1. Profa. Dra. Lucia Nassi Castilho –



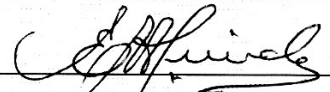
2. Profa. Dra. Patrícia Miralda Cazita –



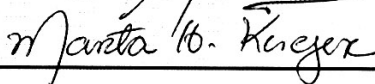
3. Profa. Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata –



4. Prof. Dr. Eros Antônio de Almeida –



5. Profa. Dra. Marta Helena Krieger –



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 08/02/2007

Trabalho realizado nos Laboratórios de Lípidos e de Bioenergética do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, de Bioquímica Clínica e Imunologia Celular e Molecular da Divisão de Patologia Clínica e no Ambulatório de Dislipidemias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp 03/00581-1) e do Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão (Faepex).

DEDICATÓRIA

A DEUS, “porque é eterno o seu amor!” Salmo 136

Ao Edílson e a Lia, fontes constantes de inspiração,
que me deram apoio para enfrentar os desafios e
juntos sonharam os meus sonhos;

Aos meus pais, Pedro Teles de Albuquerque
(*In memoriam*) e Juraci Pereira de Albuquerque, que
me ensinaram a viver com dignidade, fé e esperança;

Aos meus, irmãos presenças constantes, mesmo na
ausência.

“O propósito da vida é a felicidade”

Dalai-lama

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Lúcia Nassi Castilho, que com dedicação e carinho me conduziu e me ensinou a trilhar novos caminhos por meio de palavras, gestos e exemplos. Muito obrigada!

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

(Cora Coralina)

AGRADECIMENTOS

“Inicie por fazer o que é necessário, então o que é possível, e, de repente, você está fazendo o impossível.”

São Francisco de Assis

Ao Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, cuja colaboração foi fundamental para a realização deste estudo;

À Prof^a. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira, pela atenção e preciosa colaboração;

À Prof^a. Dra. Eliana Cotta de Faria, pelo apoio em todas as fases de execução deste projeto;

À Prof^a. Dra. Maria Heloísa Blotta, que gentilmente colaborou com este trabalho;

Ao Helymar da Costa Machado da Comissão de Pesquisa Estatística, pela assessoria técnica;

A todos os funcionários do Laboratório de Bioquímica Clínica e Coleta do Hospital das Clínicas e do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Unicamp que direta ou indiretamente ajudaram na execução deste Trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo–Fapesp e ao Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão–Faepex, pelo estímulo à pesquisa, através do apoio financeiro;

Aos pacientes e voluntários que generosamente aceitaram participar deste estudo.

À Giovanna R. Degasperi, que compartilhou seus conhecimentos e me ensinou com paciência e, principalmente com carinho e amizade;

À Larissa Sayuri Kato, companheira de todas as horas. Vivenciamos momentos de risos, angústias, alegrias, desabafos, divertimentos, cansaços e sucessos;

À Patrícia Lima Santos, que me ensinou o real significado da palavra generosidade;

À Aparecida Sousa Pereira, pela amizade e disponibilidade;

Ao Rômulo Tadeu Dias de Oliveira, sempre risonho e disposto a me ajudar;

Ao Ronei Luciano Mamoni, a quem recorri, quando as dúvidas ainda persistiam;

À Sara de Jesus Oliveira, presença certa nas horas incertas;

Aos demais amigos e companheiros de Curso de pós-graduação que, com seus conselhos, sorrisos, palpites, idéias, conhecimentos, solidariedade e carinho, fizeram com que eu sempre tivesse a sensação de que esta Universidade fosse a extensão da minha casa.

“E não importa para onde vamos seguindo, entre nós sempre haverá a lembrança de um olhar, de um carinho e da integridade de momentos sinceros.”

Mário Quintana

*“Tive um chão (mas já faz tempo)
todo feito de certezas
tão duras como lajedos.*

*Agora (o tempo é que fez)
tenho um tempo de barro
umedecido de dúvidas.*

*Mas nele (devagar vou)
me cresce funda a certeza
de que vale a pena o amor.”*

Thiago de Mello

	PÁG.
RESUMO	<i>xiii</i>
ABSTRACT	<i>xv</i>
1- INTRODUÇÃO GERAL	17
2- OBJETIVOS	26
3- CAPÍTULOS	28
3.1- ARTIGO 1 - Mitochondrial reactive oxygen species generation in peripheral blood monocytes and oxidized LDL are increased in hyperlipidemic patients.....	29
3.2- ARTIGO 2 - Reactive oxygen species generation by circulating monocytes in hyperlipidemic patients is associated with serum monocyte chemoattractant protein-1.....	48
4- DISCUSSÃO GERAL	67
5- CONCLUSÃO GERAL	77
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL	Ácidos graxos livres
Apo	Apolipoproteína
Col	Colesterol
CTR	Controle
DAC	Doença arterial coronariana
$\Delta \psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
DLM	Dislipidemia mista
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HC	Hipercolesterolêmicos
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HOMA	“Homeostasis model assessment”
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IL	Interleucina
IFN	Interferon
IP-10	Proteína induzida pelo interferon gama-10
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade-oxidada
LOX-1	Receptor lectina “like” para LDL-ox
LPL	Lipoproteína lipase
LRP	Proteína relacionada ao receptor de LDL
LPS	Lipopolissacarídeo

MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos-1
Mig	Monocina induzida pelo interferon-gama
NCEP	National Cholesterol Education Program
NF- $\kappa\beta$	Fator de transcrição nuclear kappa β
NK	Célula “natural killer”
$O_2^{\cdot -}$	Ânion superóxido
$OH^{\cdot -}$	Radical hidroxila
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
PCR-us	Proteína C-reativa ultra-sensível
SR	Receptores “scavenger”
TG	Triacilglicerol
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
TNF	Fator de necrose tumoral
TGF	Fator de transformação e crescimento
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

RESUMO

Atualmente, a aterosclerose é definida como uma doença crônica inflamatória caracterizada por elevado estresse oxidativo gerado por células da parede vascular. Neste estudo foi avaliada, em monócitos humanos, a contribuição de espécies reativas de oxigênio (EROs) mitocondrial nos processos do estresse oxidativo e inflamatório de pacientes dislipidêmicos. Vinte e nove indivíduos hiperlipidêmicos primários, sendo catorze portadores de hipercolesterolemia e quinze com hiperlipidemia mista (ambos sem uso de fármacos) e dezoito indivíduos normocolesterolêmicos, não tabagistas foram selecionados para este estudo. A geração de EROs e o potencial de membrana mitocondrial foram determinados em células mononucleares intactas, por meio de citometria de fluxo e a concentração plasmática de LDL oxidada (LDL-ox) por meio de ELISA. Apenas os monócitos isolados de indivíduos hipercolesterolêmicos apresentaram maior geração de EROs, porém ambos os grupos apresentaram concentração sérica de colesterol da LDL, LDL-ox e apolipoproteína B maiores do que o grupo-controle. Presença de LDL pequenas e densas também foi encontrada nos hiperlipidêmicos. Nos pacientes com hiperlipidemia mista igualmente foram detectadas, adicionalmente, concentrações significativamente maiores de insulina, triglicérides, colesterol de VLDL e ácidos graxos livres. Correlações positivas e significativas entre a geração de EROs mitocondrial com as concentrações séricas de LDL-oxidada e da proteína quimiotática para monócito-1 (MCP-1), foram encontradas. Esses resultados sugerem que a geração de EROs mitocondrial por monócitos circulantes em pacientes hiperlipidêmicos primários contribui para o estresse oxidativo e, portanto, para o desenvolvimento da aterosclerose, patologia comum nestes indivíduos. A hiperlipidemia está também acompanhada da elevação de marcadores inflamatórios séricos (ácido úrico e contagem global dos leucócitos). A correlação negativa encontrada entre a concentração sérica da interleucina 6 (IL-6) e da proteína induzida pelo IFN- γ 10 (IP-10), nos pacientes hiperlipidêmicos, sugere que a IL-6 possa estar agindo como uma citocina antiinflamatória.

Palavras-chave: EROs, LDL-oxidada, dislipidemia, marcadores inflamatórios, citocinas

ABSTRACT

Actually, atherosclerosis is characterized like an inflammatory chronic disease due to a high oxidative stress state generated by vascular wall cells. In present study, we investigated the contribution of reactive oxygen species (ROS) generation by circulating monocyte mitochondria to the oxidative stress frequently observed in high risk hyperlipidemic subjects. Twenty-nine primary hyperlipidemic subjects (14 hypercholesterolemic and 15 combined hyperlipidemic) and 18 normolipidemic individuals, without any drug treatment and non-smokers, were enrolled in this study. The mitochondrial monocyte ROS generation and the mitochondrial electrical transmembrane potential in intact polymorphonuclear cells were estimated by flow cytometry and plasma oxidized LDL (ox-LDL) was measured by ELISA. The hypercholesterolemic, but not the combined hyperlipidemic subjects presented higher levels of monocyte ROS generation when compared to control group. Both hyperlipidemic subjects presented elevated plasma levels of total LDL, oxidized LDL and apolipoprotein B. Combined hyperlipidemic individuals presented additionally increased levels of small dense LDL particles, insulin, triglycerides, VLDL-cholesterol and free fatty acids. Furthermore, highly significant positive correlations between monocyte ROS generation with oxidized LDL and monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) levels, were found. These data suggest that mitochondrial ROS production by circulating monocytes from primary hyperlipidemic subjects can contribute to the oxidative stress and hence to atherosclerosis, disease frequently found in this group. The hyperlipidemia is also associated with high levels of inflammatory markers (uric acid and leukocyte global count). A significant negative correlation between interleukin-6 (IL-6) and interferon-inducible protein 10 (IP-10) levels found in hyperlipidemic individuals may suggest an anti-inflammatory property of cytokine IL-6.

Key words: ROS, oxidized-LDL, dyslipidemia, inflammatory markers, cytokine

1- INTRODUÇÃO GERAL

As dislipidemias são alterações decorrentes de distúrbios em qualquer fase do metabolismo lipídico, com repercussão nos níveis séricos das lipoproteínas. Podem ser classificadas em primárias e secundárias (Rifai et al., 1999).

As dislipidemias primárias, de origem genética, podem ser decorrentes da integração de múltiplos genes com fatores ambientais (dieta, álcool ou sedentarismo) e hormonais levando à hiperlipidemia multifatorial, que é a forma mais freqüente da hiperlipidemia primária. Na hiperlipidemia primária o indivíduo apresenta concentrações elevadas de lípidos, com pouca ou nenhuma presença de sinais físicos (xantomas ou arco córneo). Em alguns casos, a anormalidade metabólica leva ao agravamento de uma tendência genética dormente para o desenvolvimento da dislipidemia primária (Carmena, 2000). As principais causas de dislipidemias primárias são: deficiência familiar de lipoproteína lipase (LPL), deficiência familiar de apolipoproteína C-II (apo-CII), hipercolesterolemia familiar, deficiência familiar de apo-B100, hiperlipoproteinemia Tipo III, hiperlipidemia familiar combinada e hipertriacilglicerolemia familiar (Mahley et al., 1998).

A hipercolesterolemia familiar é uma alteração freqüente do metabolismo lipídico originada por mutação no gene do receptor de lipoproteína de baixa densidade (Low Density Lipoprotein-LDL) ou por sua ausência em células hepáticas e tecidos periféricos, levando ao aumento na concentração do colesterol da LDL e colesterol plasmático (Mahley et al., 1998). A prevalência da forma heterozigótica é de 1:500 na maioria das populações do mundo enquanto que a homozigótica é mais rara (1:1.000.000) (Motulsky, 1989). Indivíduos heterozigóticos apresentam concentrações séricas de colesterol duas a três vezes acima da média enquanto que os homozigotos apresentam colesterolemia três a seis vezes acima da média. Os portadores de hipercolesterolemia familiar desenvolvem doença aterosclerótica de forma prematura (Mahley et al., 1998). Outra forma de desenvolvimento da hipercolesterolemia familiar é por deficiência de apoB-100, caracterizada por mutação neste gene (proteína ligante do receptor de LDL), que acarreta elevados níveis séricos de colesterol total e de colesterol da

LDL e aumento da susceptibilidade dos indivíduos desenvolverem doenças cardiovasculares (Mahley et al., 1998).

A hiperlipidemia familiar combinada é caracterizada por elevação plasmática de colesterol total e de LDL colesterol (tipo II a) ou aumento de triglicérides (tipo IV) ou ambos (tipo II b). A associação da hiperlipidemia familiar combinada com a incidência de doença aterosclerótica coronariana é alta (Mahley et al., 1998).

As dislipidemias são um dos fatores de riscos mais importantes para o desenvolvimento da aterosclerose, elevando assim o risco para eventos cardiovasculares, sendo esta a principal causa de morte no mundo (NCEP, 2001). O Brasil acompanha este fenômeno internacional sendo as doenças cardiovasculares responsáveis por cerca de 250.000 mortes/ano (Brasil-Ministério da Saúde, 2006).

A aterosclerose é uma doença complexa que se desenvolve lentamente por décadas. É definida como um conjunto de modificações que ocorrem na íntima arterial, especialmente nas grandes artérias, consistindo de acúmulo focal de lípidos e de vários outros tipos celulares como macrófagos, células musculares lisas, linfócitos, fibroblastos e aumento da expressão das moléculas de adesão. É acompanhada de modificações proliferativas resultantes da interação de múltiplos processos associados tais como hiperlipidemia, lesão endotelial e resposta inflamatória (Schwartz et al., 1993; Li et al., 2000; Jessup et al., 2004). Em 1989, Steinberg et al. postularam que a oxidação da LDL representava uma modificação química, responsável pelo início da formação das células espumosas. Sawamura et al. (1997) identificaram um receptor para a LDL-oxidada (LDL-ox), pertencente à família das lectinas, denominado de receptor lectina "like" para LDL-ox 1 (LOX-1)", em cultura de células endoteliais. Este receptor atua sobre a captação e internalização da LDL-ox pelas células endoteliais ativadas. A expressão do LOX-1 em células endoteliais pode ser regulada por estímulos inflamatórios (Kume et al., 1998). Os macrófagos, presentes no espaço intimal, expressam os receptores membros da família dos "Scavengers" (SRA-I e RA-II) que fagocitam a

LDL quimicamente modificada. Entretanto, diferentemente da maioria das células onde a expressão do receptor de LDL é regulada pelo conteúdo intracelular de ésteres de colesterol, a expressão dos receptores "Scavenger" não é inibida pela alta concentração de colesterol intracelular (Goldstein et al., 1979; Kodama et al., 1988; Rifai et al., 1999). A manutenção de altas concentrações de LDL-ox promove a formação das células espumosas, macrófagos carregados de lipídios, que exercem ação inflamatória e induzem proliferação celular no espaço subendotelial (Rifai et al., 1999). Portanto, a aterosclerose é iniciada pelo acúmulo das LDL plasmáticas na camada subendotelial, sua oxidação e recrutamento de monócitos circulantes (Jessup et al., 2004; Li et al., 2000; Schwartz et al., 1993).

Diversos tipos celulares, na parede arterial contribuem para a formação da LDL-ox (Steinberg et al., 1989). Existem evidências de que íons metálicos (como o cobre e o ferro), lipoxigenases, cicloxigenases, mieloperoxidases e radicais livres desempenham um papel importante neste processo (Bea et al., 2003).

Radicais livres são espécies químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. No sistema biológico, uma variedade de radicais livres pode ser gerada. Assim, um radical pode ser um agente oxidante, aceitando um único elétron, ou um agente redutor doando um elétron (Stocker e Keaney, 2004). Nas células aeróbicas, a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial representa o principal local de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Zmijewsk et al., 2005).

Na membrana interna das mitocôndrias estão localizadas as proteínas que são essenciais para a fosforilação oxidativa que incluem os complexos I-IV da cadeia de transporte de elétrons, a ATP sintase (complexo V) e o translocador adenina de nucleotídeos (Nicholls e Fergunson, 2002_b). Durante a fosforilação oxidativa há um bombeamento de prótons pela cadeia respiratória, criando um fluxo da matriz para a membrana mitocondrial interna que, por ser impermeável a prótons, impede o retorno destes à matriz, criando-se um gradiente eletroquímico

($\Delta\Psi$). O O_2 tem preferência por uma via gradual univalente de redução que leva à geração de intermediários parcialmente reduzidos que são as espécies reativas de oxigênio. Entre as espécies reativas de oxigênio mais comuns, podemos citar o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila ($OH^{\cdot-}$) (Nicholls e Fergunson, 2002_b). Embora o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produto da dismutação do $O_2^{\cdot-}$, não seja um radical livre ele é altamente tóxico para as células, sendo convertido a $OH^{\cdot-}$ na presença de vários íons metálicos, especialmente o Fe^{+2} e o Cu^+ (Knight, 1999). O estresse oxidativo é um termo usado para definir o desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a produção de radicais livres. Quando não neutralizados, os radicais livres têm a capacidade de alterar a integridade de inúmeras moléculas tais como as proteínas e os lípidos. A peroxidação lipídica e a oxidação de lipoproteínas são muitas vezes usadas como marcadores do estresse oxidativo (Heinecke et al., 1986).

Cathcart et al. (1985), Parthasarathy et al. (1986) e Hiramatsu et al. (1987) demonstraram que monócitos/macrófagos são capazes de oxidar a LDL através de mecanismos dependentes da geração de radicais livres, mas o mecanismo pelo qual este fenômeno ocorre ainda não está totalmente elucidado. A LDL-ox contém várias substâncias tóxicas tais como peróxidos lipídicos, oxiesteróis e aldeídos. Os lípides oxidados presentes nas LDL-ox produzem modificações nas estruturas das proteínas celulares, induzem à geração de EROs, à peroxidação de lípidos celulares e alteram a regulação de várias vias de sinalização (apoptose) e da expressão de vários genes (Napoli, 2003).

O processo de oxidação aumenta a aterogenicidade da LDL (Zhao e Shen, 2005) por: favorecer o recrutamento dos monócitos circulantes para o espaço intimal, inibir a capacidade dos macrófagos residentes deixarem a íntima, promover a formação das células espumosas, e causar disfunção endotelial (Stocker e Keaney, 2004; Knight, 1999).

A LDL humana é um complexo de elevado peso molecular, possui subfrações que são designadas como: LDL1, LDL2 e LDL3. As LDL1 e 2 são partículas grandes e leves enquanto que as LDL3 são menores e mais densas. A

partícula LDL3, também chamada de LDL subclasse B, tem diâmetro menor do que 25,5 nm e fica retida por mais tempo na parede arterial em razão de sua menor afinidade pelos receptores de LDL sendo, por isso, mais susceptível à oxidação. Este último fenótipo está fortemente associado com o desenvolvimento de doença arterial coronariana (Hirano et al., 2005; Maruyama et al., 2003; Yoshino et al., 2003).

O processo inflamatório também tem significativo papel na patogênese da aterosclerose e a identificação e a quantificação da concentração sérica de marcadores inflamatórios é importante na avaliação do risco para eventos cardiovasculares agudos (Sesnilo et al., 2001).

A proteína C reativa (PCR) é um marcador inflamatório e preditor de risco independente para doenças cardiovasculares. O aumento sérico da PCR pode estar associado ao início e progressão da doença aterosclerótica por vários mecanismos: aumento da reatividade dos leucócitos, da fixação do complemento, da agregação e modulação da ativação plaquetária, ligação à LDL-ox, indução da expressão de várias moléculas de adesão, atuação na captação do colesterol por macrófagos, indução do recrutamento de monócitos para o espaço subendotelial por aumento de produção de MCP-1 (proteína quimiotática para monócitos) e regulação positiva do receptor de angiotensina (Bhakdi et al., 1999; Torzewski et al., 2000; Pasceri et al., 2001; Zwaka et al., 2001, Wang et al., 2003). A síntese hepática da PCR é regulada pela citocina interleucina-6 (Cohen e Cohen, 1996). A PCR é atualmente considerada um potente marcador independente do aumento da taxa de mortalidade por doença arterial coronariana e identifica pacientes que podem se beneficiar de manipulações invasivas precoces (Lubrano et al., 2005).

As citocinas são proteínas não estruturais, pequenas, com peso molecular entre 8-40 KDa. Quando produzidas por fagócitos mononucleares são chamadas de monocinas. Com o advento dos clones moleculares ficou claro que a mesma proteína pode ser sintetizada por linfócitos, monócitos e uma variedade de células, incluindo as endoteliais e algumas epiteliais. Assim, o termo genérico

citocina tem sido utilizado para essa classe de mediadores. Pelo fato de muitas citocinas serem produzidas por leucócitos e terem ação sobre outros leucócitos, são chamados de interleucinas. Existem 18 citocinas com a característica de interleucinas (IL), dentre elas a IL-6 que é sintetizada por células mononucleares, células do endotélio vascular e fibroblastos em resposta a agentes microbianos e a outras citocinas, tais como a IL-1 e o fator de necrose tumoral (TNF). As quimiocinas pertencem a uma grande família de citocinas, estruturalmente homólogas, capazes de estimular e atrair os leucócitos para os sítios da inflamação, tendo sido identificadas aproximadamente 50 tipos. São subdivididas em 4 subfamílias (CXC, CC, C e CX₃C), com base na posição dos resíduos de cisteína em sua molécula e exercem suas funções através da ligação com receptores constituídos de sete domínios transmembrânicos acoplados à proteína G. As CXC-quimiocinas têm um aminoácido separando os dois primeiros resíduos de cisteína próxima à extremidade aminoterminal da molécula (Abbas et al., 2000, Clark-Lewis et al., 2003). As quimiocinas atuam no recrutamento e na ativação de monócitos e linfócitos para o local da inflamação (Shanmugam et al., 2006)

O interferon- γ (IFN- γ) é uma citocina pleiotrópica sendo considerada uma citocina pró-inflamatória porque aumenta a atividade do TNF e induz a produção do óxido nítrico (Dinarello, 2000). A proteína induzida pelo IFN- γ 10 (IP-10/CXCL10) e a monocina induzida pelo IFN- γ (Mig/CXCL9) são quimiocinas pertencentes à subfamília CXC que compartilham o mesmo receptor CXCR₃ acoplado à proteína G. A IP-10 e a Mig são expressas por monócitos ativados, células endoteliais e células musculares lisas de lesões ateroscleróticas. Durante a progressão da lesão a IP-10 e a Mig induzem a migração de células, via receptor CXCR₃ expresso principalmente em linfócito T ativados e células NK ("natural killer"), levando ao aumento de células inflamatórias no local e subsequente injúria tecidual, indicando, portanto, que a IP-10 e a Mig desempenham um importante papel na resposta imune mediada pela célula T e nas reações inflamatórias (Mach et al., 1999; Clark-Lewis et al., 2003; Yang et al., 2006).

A proteína quimiotática para monócito 1 (MCP-1/CCL2) é uma quimiocina responsável pelo recrutamento dos monócitos para os sítios de inflamação. A MCP-1 parece desempenhar um importante papel nos múltiplos estágios da aterosclerose podendo ser, portanto utilizada como um biomarcador (Lemos et al., 2003).

A utilização da determinação da concentração sérica de ácido úrico como marcador inflamatório de risco para as doenças coronarianas e cerebrovascular, descrita na literatura (Culleton et al., 1999; Fang e Alderman, 2000) é controversa (Culleton et al., 1999, Hayden, 2004). Seu papel seria atuar na transcrição do fator nuclear kappa- β (NF- $\kappa\beta$) e na MCP-1 (Kanellis et al., 2003), estimulando as células mononucleares humanas a produzir interleucina-1 β , IL-6 e TNF- α (Johnson et al., 2003).

A morte dos macrófagos em lesões ateroscleróticas avançadas é uma característica importante, pois pode afetar a progressão da placa aterosclerótica, atuando na liberação de moléculas desestabilizantes (como as “heat shock proteins”) e substâncias trombogênicas (Fuster et al., 1992; Ball et al., 1995; Mitchinson et al., 1996). Yao e Tabas (2000) mostraram que o excesso de colesterol livre é responsável pela apoptose de macrófagos, sendo que 50% do processo é mediado pela ativação das proteínas de membrana FasL, seguida pela via Fas. Mais recentemente, esses mesmos autores demonstraram uma via complementar da via Fas para explicar a morte celular de macrófagos enriquecidos em colesterol livre: a apoptose desencadeada por disfunção mitocondrial, avaliada por meio da variação do potencial de membrana da mitocôndria de macrófagos, diminuiu entre 3 e 6 horas após a incubação das células mononucleares com colesterol livre (Yao e Tabas, 2001).

Sendo a lesão aterosclerótica caracterizada, inicialmente, por macrófagos sobrecarregados com lípidos/proteínas oxidadas na camada subendotelial, este estudo teve como objetivo avaliar a contribuição da geração das espécies reativas de oxigênio em células mononucleares de indivíduos

portadores de hipercolesterolemias primárias (isoladas ou mistas) para o estresse oxidativo, freqüentemente presente nesses indivíduos e compará-la a indivíduos normolipidêmicos. Para esta avaliação foram determinadas as taxas de produção de EROs mitocondrial em monócitos, a concentração sérica de LDL-ox e dos marcadores inflamatórios (PCRus, ácido úrico, IL-6, IP-10, Mig, MCP-1 e contagem global dos leucócitos) destes indivíduos, bem como as possíveis correlações entre esses parâmetros.

2- OBJETIVOS

Objetivo artigo 1

O objetivo do presente estudo foi avaliar a contribuição da geração das espécies reativas de oxigênio mitocondrial em monócitos de pacientes hiperlipidêmicos primários (hipercolesterolêmicos e com dislipidemia mista) para o processo de estresse oxidativo. Também foi avaliado o potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em células mononucleares intactas e as correlações desses parâmetros de estresse oxidativo com a concentração sérica da LDL oxidada e com outros parâmetros bioquímicos.

Objetivo artigo 2

O objetivo do presente estudo foi comparar a concentração sérica dos marcadores inflamatórios PCRus, IL-6, IP-10, MCP-1, Mig, ácido úrico e a contagem global de leucócitos, de pacientes hiperlipidêmicos e de indivíduos controles, bem como avaliar a associação destes parâmetros com os indicadores de estresse oxidativo.

3- CAPÍTULOS

ARTIGO 1

Mitochondrial reactive oxygen species generation in peripheral blood monocytes and oxidized LDL are increased in hyperlipidemic patients

Edilma Maria de Albuquerque Vasconcelos^a, Giovanna Rosa Degasperi^b, Aníbal Eugênio Vercesi^b, Eliana Cotta de Faria^a, Helena Coutinho Franco de Oliveira^c, Lúcia Nassi Castilho^a

^aLaboratórios de Lípidos e ^bBioenergética do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental do Departamento de Patologia Clínica da FCM/UNICAMP;
^cDepartamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP-Brazil

Corresponding author: Dr. Lucia Nassi Castilho.

Departamento de Patologia Clínica, CP 6111, 13084-971, Campinas, SP, Brasil.

Tel. 55 19 35219452 Fax. 55 19 35219434

Email: nassi@fcm.unicamp.br

Atherosclerosis - Submission assigned the following manuscript number:

ATH-D-06-01064

ABSTRACT

Experimental and in vitro evidences have established that reactive oxygen species (ROS) generated by vascular wall cells play a key role in the genesis of the inflammatory process of atherosclerotic lesions. Several intracellular sources of ROS in several cell types may contribute to increase atherogenesis. In the present study, we investigated the contribution of mitochondrial ROS generation by circulating monocyte to the oxidative stress frequently observed in high-risk hyperlipidemic subjects. Fourteen primaries hypercholesterolemic, 15 combined hyperlipidemic and 18 normolipidemic individuals, without any drug treatment, were enrolled in this study. The mitochondrial monocyte ROS generation and the mitochondrial electrical transmembrane potential in intact mononuclear cells were estimated by flow cytometry and plasma oxidized LDL (ox-LDL) was measured by ELISA. The hypercholesterolemic subjects presented higher levels of monocyte ROS generation. Combined hyperlipidemic subjects presented increased levels of small dense LDL and insulin. Both hyperlipidemic groups presented elevated plasma levels of oxidized LDL. Furthermore, a highly significant positive correlation between monocyte ROS generation and ox-LDL concentrations was found when control and hyperlipidemic data were grouped. These data provide evidence that mitochondrial ROS production by circulating monocytes from hypercholesterolemic subjects may contribute to the oxidative stress and possibly to atherogenesis in these subjects.

Keywords: Reactive oxygen species; mitochondria; monocytes; hyperlipidemia; oxidized low-density lipoprotein

INTRODUCTION

Atherosclerosis is characterized by low density lipoprotein (LDL) deposition in the arterial wall. It is initiated by the recruitment of circulating monocytes into the vascular intima with their subsequent transformation in foam cells. Foam cell formation is a result of monocyte derived macrophage scavenging of modified lipoproteins that have undergone oxidative modification in the vascular wall [1,2]. The scavenger receptor (SR) and CD36 mediated ox-LDL uptake by macrophages leads to the initial formation of the well-defined fatty streaks in the arterial intima. Such lesions then progress to more complex ones and are prone to rupture precipitating clinical events such as heart attack and stroke [2].

Clinical studies have shown that traditional risk factors for atherosclerosis predispose to endothelial dysfunction [3,4]. One of the most consistent proposed mechanisms for endothelial dysfunction involves oxidative stress [4]. Reactive oxygen species (ROS) can be generated by aerobic cells during reduction of molecular oxygen by enzymatic reactions (NADH/NADPH oxidase, xanthine oxidase, lipoxygenase, and cyclooxygenase systems), mitochondrial electron transport chain and autoxidation of diverse substances [5]. Mitochondria represents a major intracellular source of ROS [6,7,8] and may mediate cellular oxidative stress leading to cell death [9]. Oxidative stress causes damage in nucleic acids, lipids and proteins [2,10,11].

ROS and their non-physiological derivatives may oxidize LDL *in vitro* or *in vivo*. Oxidation process increases the atherogenic potential of LDL [1] by 1) favoring the recruitment of circulating monocytes into the intimal space, 2) inhibiting the ability of resident macrophages to leave the intima, 3) enhancing the rate of lipoprotein uptake leading to foam cell formation, and 4) being cytotoxic, leading to dysfunction endothelial [2].

Oxidized LDL contains various toxic lipids such as lipid peroxides, oxysterols and aldehydes that can induce modifications in protein structure, and further increase cell ROS generation in a vicious cycle manner [3]. Defective

catabolism of LDL and other lipoproteins in hypercholesterolemic and hypertriglyceridemic states results in a prolonged half-life of these particles in the circulation, increasing the possibility of these lipoproteins to be exposed to ROS generated by circulating and vascular cells.

Although it is well established that ox-LDL undergoes oxidation and that oxidized LDL is present in the blood stream and in arterial lesions, the issues of how and when LDL become oxidized *in vivo* and whether all *in vitro* effects of ox-LDL are relevant to atherogenesis *in vivo* are still not clarified [1]. In this work, we investigated the contribution of ROS generation by circulating monocyte mitochondria to the oxidative stress frequently observed in high-risk hyperlipidemic subjects. In addition, we determined the mitochondrial electrical transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) in intact polymorphonuclear cells from these individuals and checked the association of these findings with oxidized LDL levels and other biochemical parameters.

MATERIAL AND METHODS

This study was approved by the Medical Ethics Committee of the Medical Sciences Faculty of the University of Campinas. Written consent was obtained from the patients or their relatives.

Fourteen primary hypercholesterolemic aged 37 ± 12 y (29% male and 71% female), 15 combined hyperlipidemic patients aged 42 ± 12 y (60% male and 40% female), with high cholesterol (> 200 mg/dL) and triglycerides (>150 mg/dL) levels, according to National Cholesterol Education Program (NCEP) [12] and 18 normolipidemic individuals (controls) aged 32 ± 6 y (33% male and 67% female) non-smokers, who have never received lipid-lowering or other treatment during the period study, were enrolled. Secondary causes of hyperlipoproteinemia, individuals with one or more myocardial infarction, coronary artery bypass grafting, percutaneous transluminal coronary angioplasty, stroke, transient ischemic attack and peripheral arterial disease were excluded from the study. The measurements

of fasting (12 hours) serum cholesterol (Chol), HDL-cholesterol (HDL-chol), triglycerides (TG) and glucose were made by enzymatic colorimetric methods in an automated system (Roche, Germany). The LDL-cholesterol (LDL-chol) and VLDL-cholesterol (VLDL-chol) were calculated by Friedewald's formula (only if TG levels <400 mg/dL). The apolipoproteins A1 (Apo A1), B100 (Apo B) and lipoprotein "a" [Lp (a)] were measured by nephelometric methods (Dade-Behring, USA). Free fatty acids (FFA) and free cholesterol (FC) were determined by enzymatic colorimetric methods (Wako Chemicals GmbH, Japan), ox-LDL by enzyme immunoassay (Mercodia Oxidized LDL ELISA, Sweden) and insulin by chemiluminescence assay (DPC MEDLAB, USA).

LDL particle size was estimated by LDL-chol/apo B-100 and TG/HDL-chol ratios [13,14]. The Homeostasis Model Assessment (HOMA), that estimates the insulin resistance, was calculated using the formula: fasting glucose level (mmol/L) x fasting insulin level (μ U/mL)/22.5 [14].

Red and white blood cell counts were made in automated system (SYSMEX SE or SYSMEX XE).

For evaluation of ROS generation and mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) the mononuclear cells were isolated by Ficoll-Hypaque gradient adjusted to 1.076 g/mL [15]. Cellular viability was done by trypan blue stain (used when the viability was >98%). The samples were analyzed in flow cytometer (FACSCalibur - Becton & Dickinson) equipped with an argon laser and CellQuest software. Ten thousand events were collected for each sample.

Determination of intracellular ROS levels was made in mononuclear cells (10^6 cells/mL) pre-incubated in RPMI 1640 medium supplemented with 1% bovine fetal serum (FBS) and glutamine 200 mM (Cutilab, Campinas, Brazil) at 37°C in a humidified CO₂ incubator (5% CO₂) for 30 min. After, the cells were incubated with 5 μ M dihydroethidium (DHE, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) at 37°C in a humidified CO₂ incubator (5% CO₂) for 70 min. The fluorescent probe DHE, a membrane-permeant cation that accumulates in higher

concentrations preferentially in the mitochondrial matrix than in the cell nucleus [16], after oxidation by ROS (particularly superoxide) is converted to ethidium that was measured by flow cytometry in FL2 channel (FACSCalibur - Becton & Dickinson) [17].

Mitochondrial electrical transmembrane potential was measured in intact mononuclear cells. Mononuclear cells (10^6 cells/mL) were incubated with 0.2 nM 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide [DiOC₆(3), Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA], with or without 1 μ g/mL oligomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA), in RPMI 1640 medium supplemented with 1% FBS and glutamine 200 mM at 37°C in a humidified CO₂ incubator (5% CO₂) for 20 min. One half of each cell sample (200 μ L) was separated and 50 μ M carbonyl cyanide m-chlorophenyl-hydrazone (CCCP, Sigma, St. Louis, MO, USA) was added and incubated for further 10 min. After both incubation periods, the cells were stained with fluorescein isothiocyanate (FITC) labeled anti-human CD14 or isotype-matched control (BD Pharmingen, San Diego, USA) for additional 10 minutes incubation. The samples were analyzed in a FACSCalibur flow cytometer. The lymphocytes and monocytes populations were identified by their light-scattering characteristics, enclosed in electronic gates, and analyzed for the intensity of the fluorescent probe signal. DiOC₆(3), at nonsaturating concentration, binds preferentially to mitochondria, since the magnitude of mitochondrial electrical membrane potential is much higher (-180 mV) than plasma membrane potential (-60 mV). Results from experiments were normalized using F/F_{CCCP} ratio where F is the mean fluorescence intensity of DiOC₆(3) (maximum fluorescence) and F_{CCCP} is the mean fluorescence intensity in the presence of CCCP (minimum fluorescence). CCCP, a protonophore, is an uncoupling agent that dissipates the mitochondrial electrical membrane potential [18].

The comparisons between the groups were done by the Analysis of Covariance (ANCOVA) in ranks, using age, sex and BMI as covariates. The Tukey-Kramer post-hoc test was used for multiple comparisons. The correlations were calculated by Spearman partial correlation coefficient. The differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Biochemical and anthropometric data are reported in Table I. Both hyperlipidemic groups of patients presented elevated total cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol, triglycerides, apolipoprotein B, and the insulin resistance index (HOMA) when compared to normolipidemic subjects. As expected, VLDL-cholesterol and triglycerides were higher in combined hyperlipidemia than in hypercholesterolemia. Combined hyperlipidemic patients presented additionally increased insulin and free fatty acids levels.

The two ratios that estimate the presence of small dense atherogenic LDL particles indicated significantly higher levels of this type of LDL in combined hyperlipidemic but not in hypercholesterolemic patients: LDL-chol/Apo B-100 (1.32 ± 0.17 , 1.34 ± 0.13 , 1.12 ± 0.20 for normolipidemic, hypercholesterolemic and combined hyperlipidemic, respectively. $p=0.0325$). On the other hand, the TG/HDL-chol ratio (1.39 ± 0.82 , 2.03 ± 0.81 , 9.83 ± 9.46 for normolipidemic, hypercholesterolemic and combined hyperlipidemic, respectively. $p<0.0001$) indicated that small dense LDL levels are significantly higher in both hyperlipidemic patients (Table 1).

The ROS generation by monocyte mitochondria and serum levels of ox-LDL were significantly higher in hypercholesterolemic patients ($p=0.0491$ and $p=0.0003$, respectively) when compared to normolipidemic individuals (Figures 1 and 2). However, in the combined hyperlipidemic subjects only ox-LDL levels was significantly higher than normolipidemic individuals. When controls and hyperlipidemic individuals were grouped for adjusted correlation analyses (age, sex and body mass index as covariables), a significant positive correlation ($r=0.35$, $p=0.0385$) between monocytes ROS generation and serum concentration of ox-LDL (Figure 3) was found. Also, a significant positive correlation between TG/HDL-chol and ox-LDL ($r=0.56$, $p=0.0002$) was found when normolipidemic and hyperlipidemic individuals were grouped. No significant correlations were found between HOMA index, FFA and HDL-chol levels with monocyte ROS generation and oxidized LDL.

Mitochondrial electrical transmembrane potential in monocytes and lymphocytes did not differ between groups and the inhibition of ATP-synthase by oligomycin increased the fluorescence ratio in all groups in a similar manner, indicating preserved oxidative phosphorylation (Figure 4).

The hematologic profiles of normolipidemic, hypercholesterolemic and combined hyperlipidemic patients were similar (data not shown). However, when hyperlipidemic subjects were grouped, significantly higher global counts of erythrocyte and leukocyte ($p=0.024$ e $p=0.037$, respectively) were detected when compared with the normolipidemic group. However, no statistical association was found between white cell count and monocyte ROS generation or oxidized LDL, suggesting that this condition of oxidative stress has no impact on the blood cell number.

DISCUSSION

A major target for oxidation in vascular atherosclerotic areas is the intimal low-density lipoproteins. The ox-LDL exhibits pro-inflammatory properties and is thought to lead to plaque formation and progression [19,20]. Ehara et al [21] found that plasma ox-LDL levels were higher in patients with coronary syndromes than in control subjects and these concentrations were directly related to the severity of disease.

Several studies have shown that LDL become oxidized when incubated with vascular wall cells [1,22]. Mitochondria are considered the most important cellular source of ROS and are also the main targets of their toxic actions [2,23,24]. In this work, we demonstrated that mitochondrial monocyte ROS generation was significantly higher in naive hypercholesterolemic patients. Considering that monocyte ROS production was not significantly elevated in combined hyperlipidemic patients, these results suggest that the causes of hypercholesterolemia, more than the hypertriglyceridemia, are responsible for the

mitochondrial ROS generation. Differently, Araujo and collaborators [25], that measured ROS release from mononuclear cells using the luminol-sensitized chemiluminescence method, observed a greater ROS production in combined hyperlipidemic than in normal and hypercholesterolemic patients. The reason for this discrepancy may be related to the methodology: while luminol signal is associated with the overall cell ROS, the DHE probe is preferentially attacked by mitochondrial source of ROS.

Small dense LDL, which is independently associated with the incidence and extent of coronary artery disease [26], is more susceptible to oxidation than the native LDL [27]. In the present study, we found increased levels of small dense LDL particles in combined hyperlipidemic subjects and increased levels of ox-LDL in both hyperlipidemic groups of patients when compared to normolipidemic individuals. Both, small dense LDL and ox-LDL, were positively correlated with ROS production by circulating monocytes in data grouped analysis. These analyses were possible because the variables distribution was uniform.

Our results are in agreement with an experimental study in the hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice [28] that showed higher ROS production by isolated mitochondria from several tissues like liver, heart, brain and spleen intact mononuclear cells. They showed that mice liver mitochondria did not sustain a reduced state of matrix NADPH, the main source of mitochondrial antioxidant defense. The authors suggested that this mitochondrially mediated redox imbalance could explain LDL oxidation seen in familiar hypercholesterolemia. On the other hand, several in vitro studies showed that oxidized LDL can increase mitochondrial ROS generation [3,29]. Together these evidences suggest the existence of a vicious cycle in hypercholesterolemia, i.e., ROS may increase LDL oxidation, and ox-LDL in its turn stimulates ROS generation. This concerted action leads to cell death and may be an important part of the pathogenesis of atherosclerosis.

Mitochondrial electrical transmembrane potential in monocytes and lymphocytes did not differ between groups. Increased fluorescence ratio after inhibition of ATP-synthase by oligomycin indicates preserved oxidative phosphorylation in all groups, suggesting that the raised serum ox-LDL in hyperlipidemic patients does not affect this mitochondrial function. Our results are different from that obtained by Ou et al. [30] that observed a depolarization of the mitochondrial transmembrane electric potential in endothelial cell culture from human umbilical vein induced by ox-LDL. These results may reflect cell specific differential responses.

In summary, we found that besides the expected atherogenic lipoprotein profile of both hyperlipidemic groups, they presented increased ROS production by circulating monocytes which correlated positively with the levels of oxidized LDL. These data provide evidence that mitochondrial ROS production by circulating monocytes from hypercholesterolemic subjects may contribute to the oxidative stress and possibly to atherogenesis in these subjects.

REFERENCES

- [1]Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(12): 1815-2186.
- [2]Stocker R, Keaney-Jr JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; (84): 1381-478.
- [3]Napoli C. Oxidation of LDL, atherogenesis, and apoptosis. *Ann NY Acad. Sci* 2003; 1010: 698-709.
- [4]Duvall WL. Endothelial dysfunction and antioxidants. *Mt Sinai J Med* 2005; 72(2): 71-80.
- [5]Halliwell B, Gutteridge JMC. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Molec Aspects Med* 1985; 8: 89-193.
- [6]Boveris A. Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol* 1977; 78: 67-82.
- [7]St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002; 277: 44784-90.
- [8] Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci* 2004; 24: 7779-88.
- [9]Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.* 2001; 495: 12-5.
- [10]Crack PJ, Taylor M. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radic Biol Med* 2005, 38 (11): 1433-44.
- [11]Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int Biochem Cell Biol* 2006, doi:org/10.1016/j.biocel.2006.07.001

- [12]National Cholesterol Education Program. Executive summary of the third report the National Cholesterol Education Program. Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adults Treatment III). JAMA 2001; 285: 2486-97.
- [13]Hirano T, Ito Y, Yoshino G. Measurement of small dense low-density lipoprotein particles. J Atheroscler Thromb 2005; 12 (2): 67-72.
- [14]Maruyama C, Imamura K, Teramoto T. Assessment of LDL particle size by triglyceride/HDL-cholesterol ratio in non-diabetic, healthy subjects without prominent hyperlipidemia. J Atheroscler Thromb 2003; 10(3): 186-191.
- [15]Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. Scand J Immunol 1976; 5: 9-15.
- [16]Nicholls G, Ferguson SJ. Mitochondria in the cell. Nicholls G, Ferguson SJ. Bioenergetics 3. Second edition. London: Academic Press Elsevier; 2002. p.267.
- [17]Becker LB, Hoek TLV, Shao Z-H, Li C-Q, Schumacker PT. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. Am J Physiol 1999; 277:H2240-6.
- [18]Rottenberg H, Wu S. Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells. Biochim Biophys Acta, 1998; 1404:393-404.
- [19]Jessup W, Kritharides L, Stocker R. Lipid oxidation in atherogenesis: an overview. Biochem Soc Trans 2004; 32: 134-38.
- [20]Robbesyn F, Garcia V, Auge N, Vieira O, Frisach M-F, Salvayre R, et al. A. HDL counterbalance the proinflammatory effect of oxidized LDL by inhibiting intracellular reactive oxygen species rise, proteasome activation, and subsequent NF- κ B activation in smooth muscle cells. FASEB J 2003; 17(6): 743-5.
- [21]Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, et al. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. Circulation 2001; 103: 1955-60.

- [22]Steinberg D, Parthasaraty S, Crew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. N Engl J Med 1989, 320: 915-924.
- [23]Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. J Biol Chem , 2003; 278(38): 36027-31.
- [24]Cadenas E. Mitochondrial free radical production and cell signaling. Molecular Aspect of Medicine 2004; 25: 17-26.
- [25]Araujo FB, Barbosa DS, Hsin CY, Maranhão RC, Abdalla DSP. Evaluation of oxidative stress in patients with hyperlipidemia. Atherosclerosis 1995; 117: 61- 71.
- [26]Kwon SW, Yoon SJ, Kang TS, Kwon HM, Kim JH, Rhee J, et al. Significance of small dense low-density lipoprotein as a risk factor for coronary artery disease and acute coronary syndrome. Yonsei Med J 2006; 47(3): 405-14.
- [27]Homma Y. Predictors of atherosclerosis. J Atheroscler Thromb 2004; 11(5): 265-70.
- [28]Oliveira HCF, Cosso RG, Alberici LC, Maciel EN, Saleno AG, Dorighello GG, et al. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. FASEB J 2005; 19(2): 278-80, Epub 2004 nov 29.
- [29]Zmijewski JW, Moellering DR, Goffe CL, Landar A, Ramachandran A, Darley-Usmar, VM. Oxidized low density lipoprotein induces mitochondrially associated reactive oxygen/nitrogen species formation in endothelial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005; 289(2): H852-61.
- [30]Ou H-C, Chou F-P, Sheen H-M, Lin T-M, Yang C-H, Sheu WH-H. Resveratrol, a polyphenolic compound in red wine, protects against oxidized LDL-induced cytotoxicity in endothelial cells. Clin Chim Acta 2006; 364(1-2): 196-204.

Acknowledgments

Financial support for the study was provided by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão (FAEPEX/FCM). The authors are grateful to Helymar da Costa Machado (Statistical Research Group of UNICAMP) Larissa Sayuri Kato (undergraduate student) and Aparecida Sousa Pereira for their excellent technical assistance.

Table 1- Physics and chemical characteristics of lipoproteins, biochemical and anthropometric profiles of normolipidemic, hypercholesterolemic and combined hyperlipidemic individuals

Variables	Normolipidemic (n=18)	Hypercholesterolemic (n=14)	Combined hyperlipidemic (n=15)	p value
Cholesterol (mg/dL)	168.1±28.3 ^a	244.1±30.5 ^b	274.3±84.8 ^b	<0.0001
HDL-cholesterol (mg/dL)	57.8±13.0	62.9±13.8	50.7±14.6	0.5819
LDL-cholesterol (mg/dL)	110.1±28.2 ^a	169.4±30.5 ^b	156.0±45.6 ^b	<0.0001
VLDL- cholesterol (mg/dL)	14.7±5.6 ^a	23.7±4.8 ^b	52.9±11.1 ^c	<0.0001
TG (mg/dL)	73.5±28.9 ^a	118.9±24.0 ^b	445.5±400.2 ^c	<0.0001
Apolipoprotein A1 (mg/dL)	152.2±20.6	167.9±23.2	154.7±33.8	0.0768
Apolipoprotein B (mg/dL)	83.0±20.4 ^a	126.6±17.3 ^b	137.8±24.8 ^b	<0.0001
Lipoprotein “a” (mg/dL)	13.4±16.4	43.8±55.8	34.7±31.5	0.2392
Free fatty acids (mEq/L)	0.47±0.2 ^a	0.5±0.2 ^a	1.4±0.6 ^b	<0.0001
Free cholesterol (mg/dL)	33.0±7.3 ^a	45.6±7.7 ^b	73.1±53.6 ^b	<0.0001
Cholesteryl ester (mg/dL)	132.9±24.0 ^a	194.0±18.0 ^b	219.1±70.0 ^b	<0.0001
Ox-LDL (U/L)	52.2±27.5 ^a	74.4±11.8 ^b	80.9±17.3 ^b	0.0003
LDL-chol/Apo B	1.3±0.2 ^a	1.3±0.1 ^a	1.1±0.2 ^b	0.0325
TG/HDL-chol	1.4±0.8 ^a	2.0±0.8 ^b	9.8±9.5 ^c	<0.0001
Glucose (mg/dL)	80.9±8.8	83.6±5.6	91.7±15.4	0.3553
Insulin (μUI/mL)	6.6±2.8 ^a	8.5±4.0 ^a	17.5±9.4 ^b	0.0002
HOMA	1.2±0.5 ^a	1.8±0.9 ^b	3.4±2.0 ^b	0.0003
Weight (Kg)	62.8±12.2 ^a	64.4±13.2 ^b	77.6±15.9 ^c	<0.001
BMI (kg/m ²)	22.5±2.4 ^a	23.8±3.1 ^b	27.2±4.5 ^c	<0.001
WC (cm)	80.8±10.6 ^a	86.4±10.8 ^b	99.2±11.0 ^c	<0.001

Values are expressed as mean ± standard deviation. HOMA: Homeostasis Model Assessment; waist circumference: WC; body mass index : BMI. Statistical analyses by ANCOVA (age, sex and BMI as covariable) for biochemical analyses and ANOVA for anthropometric measurement, both with Tukey-Kramer' post test. Different letters indicate significant differences between groups.

Figure 1

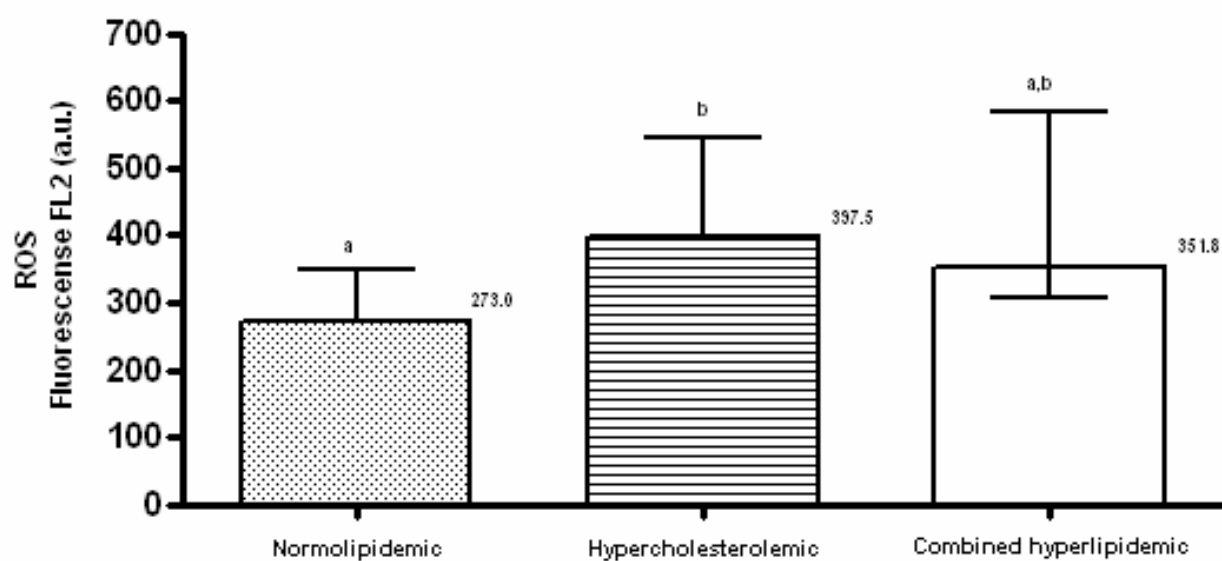


Figure 2

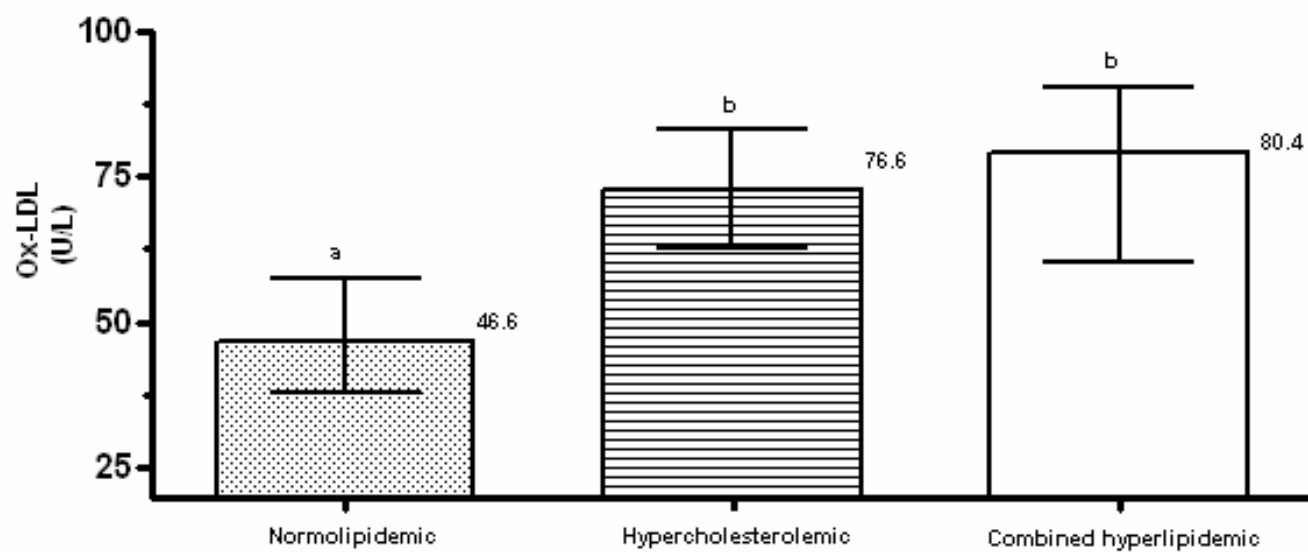


Figure 3

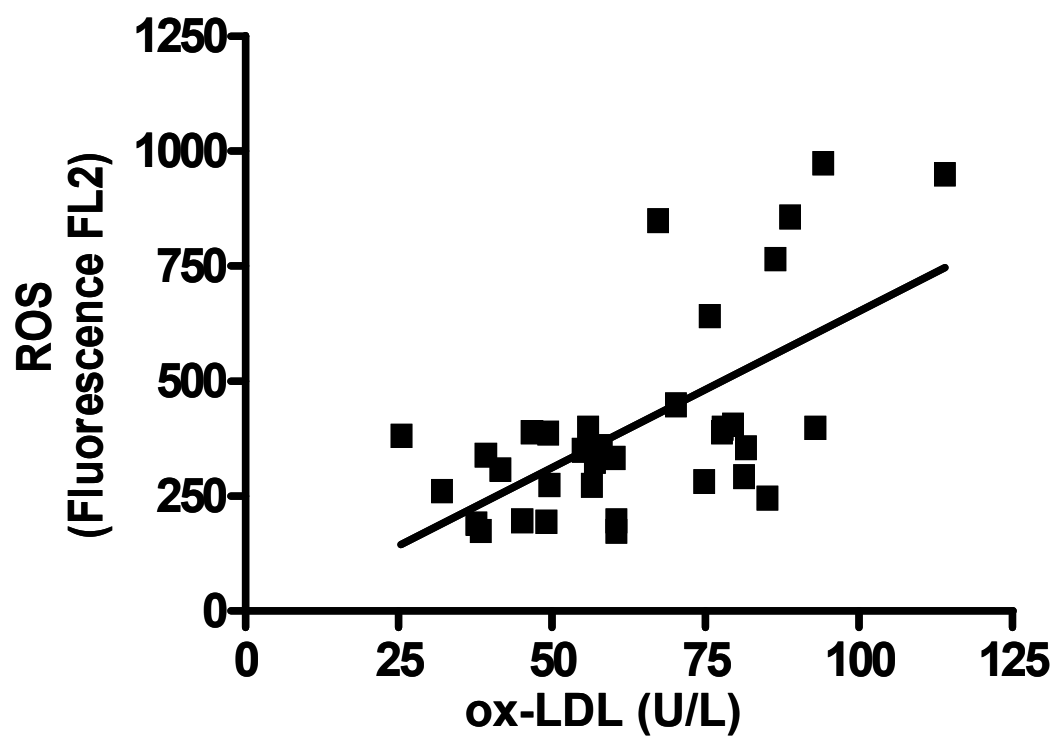
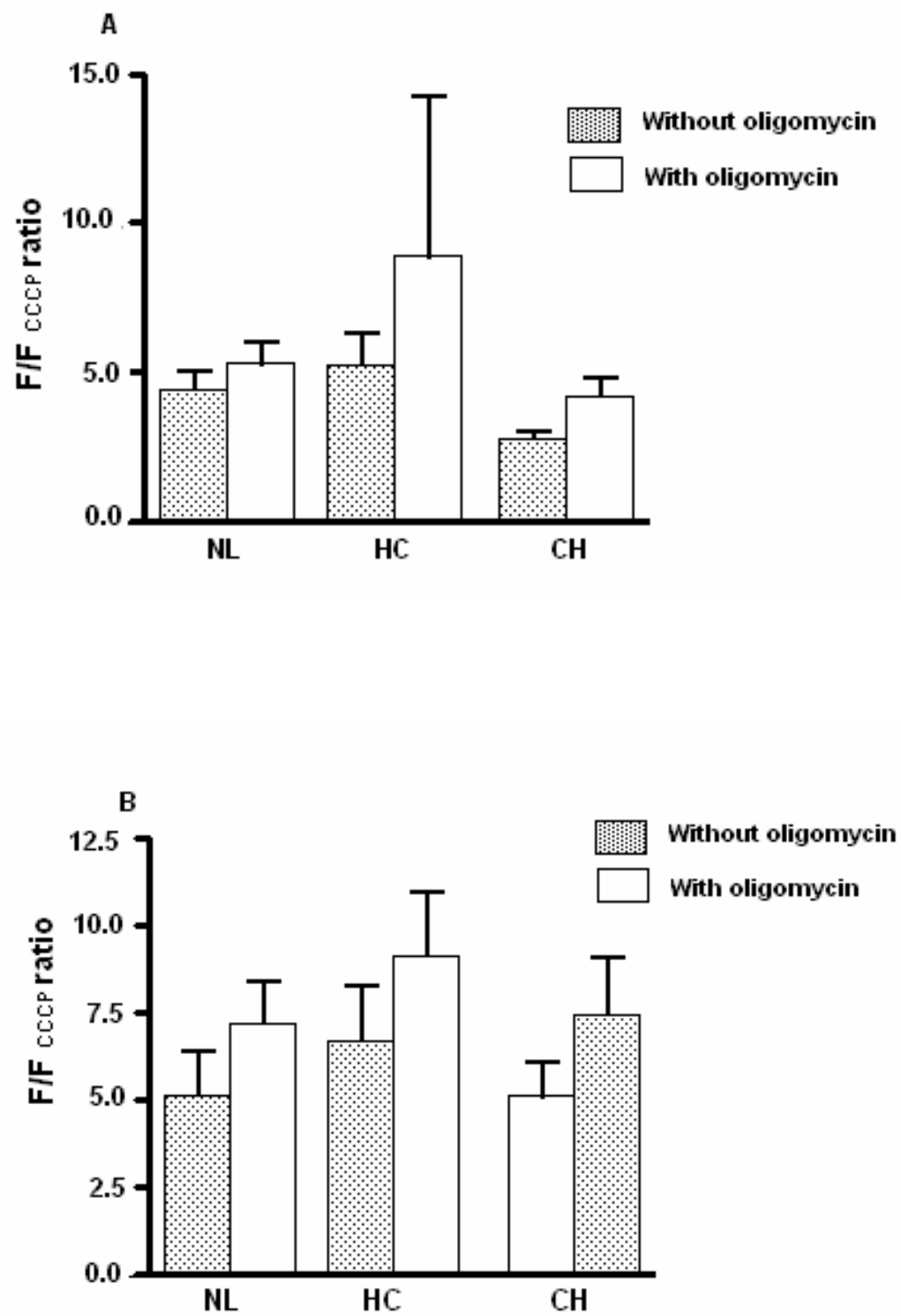


Figure 4



LEGENDS FOR THE FIGURES

Figure 1. Mitochondrial ROS generation in monocytes of normolipidemic (n=17), hypercholesterolemic (n=12) and combined hiperlipidemic patients (n=12) measured by flow citometry. Monocytes were loaded with DHE (5uM) for 70 minutes. The DHE was oxidized by mitochondrial monocytes ROS and the average of ethidium fluorescence intensity was detected in FL2 channel (arbitrary unit - a.u.). ANCOVA (age, sex and BMI as covariable) with Tukey-Kramer' post test. Data expressed as median and interquartile range. Different letters mean $p < 0.05$

Figure 2. Oxidized LDL serum levels in normolipidemic, hypercholesterolemic and combined hiperlipidemic individuals. ANCOVA (age, sex and BMI as covariable) with Tukey- Kramer' post test. Data expressed as median and interquartile range. Different letters mean $p < 0.05$.

Figure 3. Correlation between monocyte ROS generation and serum ox-LDL (n=38). Spearman's test (corrected for age, sex and BMI), $r = 0.35$ and $p = 0.04$.

Figure 4. Mitochondrial electrical transmembrane potential evaluation, measured by flow citometry, in lymphocytes (panel A) and monocytes (panel B) of normolipidemic (NL), hyipercholesterolemic (HC) and combined hyperlipidemic (CH) groups. The ratio of DiOC₆(3) fluorescence in the absence and in the presence of 50 μ M CCCP , experiments performed without (gray bars) or with 1 μ M oligomycin (white bars) was measured to estimate changes in $\Delta\psi_m$. ANCOVA (age, sex and BMI as covariables) with Tukey- Kramer' post test. Data expressed as standard error mean (SEM).

ARTIGO 2

Reactive oxygen species generation by circulating monocytes in hyperlipidemic patients is associated with serum monocyte chemoattractant protein-1

Edilma Maria de Albuquerque Vasconcelos¹; Aníbal Eugênio Vercesi²; Rômulo Tadeu Dias Oliveira³; Maria Heloisa Souza Lima Blotta³; Eliana Cotta de Faria¹; Lucia Nassi Castilho¹

¹Laboratórios de Lípidos, ²Bioenergética do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental e ³Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Patologia Clínica da FCM/UNICAMP, UNICAMP, Campinas, SP-Brazil

Corresponding author: Dr. Lucia Nassi Castilho.

Departamento de Patologia Clínica, CP 6111, 13084-971, Campinas, SP, Brasil.

Tel. 55 19 35219452 Fax. 55 19 35219434

Email: nassi@fcm.unicamp.br

ABSTRACT

Inflammation plays an important role in pathogenesis of atherosclerosis and serum inflammatory markers have been shown to predict the risk of acute cardiovascular events. The aim of the present study was to evaluate the possible correlations between serum inflammatory markers levels and oxidative stress parameters in hyperlipidemia. The serum concentrations of inflammatory markers like interleukin-6 (IL-6), high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interferon-inducible protein 10 (IP-10), monokine induced by interferon- γ (Mig) and uric acid were determined by chemiluminescence turbidimetry, enzyme immunoassay and enzymatic colorimetric method respectively, in 18 normolipidemic and 29 hyperlipidemic individuals. The mitochondrial monocyte reactive oxygen species (ROS) generation and serum oxidized LDL (ox-LDL) were measured by flow cytometry and enzyme immunoassay, respectively. Besides of high levels of total, free and esterified cholesterol, LDL-chol, VLDL-chol and triglycerides, hyperlipidemic subjects presented significantly high monocyte ROS generation, ox-LDL, uric acid levels and leukocyte count. Chemokines (MCP-1, IP-10 and Mig) and IL-6 levels were similar between hyperlipidemic and normolipidemic subjects, although ROS generation has been positively associated with MCP-1 and IL-6 negatively correlated with IP-10 concentrations. The high mitochondrial ROS generation by circulating monocytes in hyperlipidemic individuals and its positive association with MCP-1 levels indicate the importance of oxidative stress in modulating immunological response in these patients. Moreover, the highly significant negative correlation detected between serum IL-6 and IP-10 may indicate an anti-inflammatory role of IL-6, in hyperlipidemia.

INTRODUCTION

Atherosclerosis is an inflammatory disease of the vascular wall that leads to acute cardiovascular events [1]. It is characterized by low density lipoprotein (LDL) deposition and oxidation in the arterial wall [2,3] and recruitment of circulating monocytes into the vascular intima, with their subsequent transformation in foam cells [3]. The reactive oxygen species (ROS) generation by monocytes/macrophages appears to be essential for LDL oxidation [4]. Cytokines and other biomolecules are implicated in atherosclerosis process and are considered markers to identify and monitor the different stages of disease [5].

Interleukin-6 (IL-6) has been associated with the inflammatory events in coronary artery disease (CAD) [6]. IL-6 is a pleiotropic cytokine that is commonly produced at local tissue sites and released into circulation in almost all situations of homeostatic perturbation such as atherosclerosis, coronary artery disease, endotoxemia and trauma [7,8]. IL-6 is a pro-inflammatory cytokine induced by LPS, TNF- γ and IL-1. Although it is a potent inducer of the acute-phase protein response, it has anti-inflammatory properties [9]. Schieffer et al. [10] verified that in *ApoE*/IL-6 double-knockout mice, the IL-6 deficiency enhances atherosclerotic plaque formation and baseline levels of IL-6 are required to modulate lipid homeostasis, vascular remodeling, and plaque inflammation in atherosclerosis.

C-reactive protein (CRP), an acute-phase reactant biomolecule, is produced in the liver in response to acute injury or other inflammatory stimuli [11] and is the most widely studied marker of inflammation in atherosclerosis [5]. In addition to its role as an inflammatory marker, it has been demonstrated that CRP deposition in the arterial wall is involved in stimulation of monocyte chemotaxis, inhibition of neutrophil chemotaxis and promotes the progression of inflammatory areas into manifest early atherosclerosis lesions [12,13].

Proinflammatory chemokines have also been implicated in the pathogenesis of atherosclerosis. The chemokines are a family of potent chemotactic cytokines that regulate leukocyte trafficking and are rapidly up

regulated at sites of vascular inflammation [14]. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2), a chemokine produced by a variety of cells including leucocytes, endothelial cells and fibroblasts, is responsible for the recruitment of monocytes and lymphocytes to inflammatory areas [15] and appears to play an important role in intimal hyperplasia formation after arterial injury. Many studies [14,15,16] have addressed the role of MCP-1 in atherosclerosis, however this mechanism is still unclear. Acute thrombosis is an often fatal complication of atherosclerotic plaque rupture and recent evidence suggests that MCP-1 contributes to thrombin generation and thrombus formation by generating tissue factor [14]. In addition to MCP-1, interferon- γ induced CXC chemokines (IP-10 and Mig) also participate of cell recruitment in atherosclerosis. IP-10 and Mig share the same G-protein-coupled receptor CXCR3, and selectively attract activated T lymphocytes to arterial intima [17]. Mach et al. [18] demonstrated expression of IP-10 and Mig in human atherosclerotic plaques but not in normal vessel wall.

The hyperuricaemia in chronic heart failure is associated with chronic inflammation due its association with circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and tumour necrosis factor- α (TNF- α) [19]. Uric acid induced inflammation is mediated by the activation of the nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) and also by increasing MCP-1 expression [20].

Since atherosclerosis is early characterized by macrophage overload with oxidized lipids in the vascular intima and increased serum levels of inflammatory markers, the aim of the present study was to compare the serum levels of inflammatory markers in normolipidemic and hyperlipidemic individuals and to evaluate its association with reactive oxygen species generation by circulating monocytes and serum oxidized-LDL.

MATERIAL AND METHODS

This study was approved by the Medical Ethics Committee of the Medical Sciences Faculty of the University of Campinas.

Twenty nine hyperlipidemic (HL) patients aged 39 ± 12 y (45% male and 55% female) with high cholesterol (>200 mg/dL) and triglycerides (>150 mg/dL) levels, according to National Cholesterol Education Program-NCEP [21] and 18 normolipidemic (NL) individuals aged 32 ± 6 y (33% male and 67% female), non-smokers, who have never received lipid-lowering or other treatment during the period study, were enrolled. Secondary causes of hyperlipoproteinemia, individuals with one or more myocardial infarction, coronary artery bypass grafting, percutaneous transluminal coronary angioplasty, stroke, transient ischemic attack and peripheral arterial disease were excluded from the study. The fasting (12 hours) serum cholesterol (Chol), HDL-cholesterol (HDL-chol), triglycerides (TG), uric acid (URAC) and glucose were measured by enzymatic colorimetric methods in an automated system (Roche, Germany). The LDL-cholesterol (LDL-chol) and VLDL-cholesterol (VLDL-chol) were calculated by Friedewald's formula (only if TG levels <400 mg/dL). The apolipoproteins A1 (Apo A1), B100 (Apo B) and lipoprotein "a" [Lp (a)] were measured by nephelometric methods (Dade-Behring, USA) and serum oxidized-LDL (ox-LDL) level was determined by enzyme immunoassay (Mercodia Oxidized LDL ELISA, Sweden).

Serum concentration of IL-6 was determined by chemiluminescence (Immulite-USA) and high sensitive C reactive protein (hs-CRP) by turbidimetric method in an automated system (Roche- Germany). MCP-1, IP-10 and Mig serum concentrations were measured by EIA (R & D systems, USA). To minimize run-to-run variability, all samples from a given patient were analyzed in the same micro-titre plate.

Red and white blood cell counts were made in an automated cell counting system (SYSMEX SE or SYSMEX XE).

For evaluation of ROS generation the mononuclear cells were isolated by Ficoll-Hypaque (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA), gradient adjusted to 1.076 g/mL [22]. Cellular viability was done by trypan blue stain (used when the viability was >98%). Mononuclear cells (10^6 cells/mL) were pre-incubated in RPMI 1640 medium supplemented with 1% FBS and glutamine 200 mM (Cutilab, Campinas, Brazil) at 37°C in a humidified CO₂ incubator (5% CO₂) for 30 min. After, the cells were incubated with 5 μ M dihydroethidium (DHE, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) at 37°C in a humidified CO₂ incubator (5% CO₂) for 70 min. The fluorescent probe DHE, a membrane-permeant cation that accumulates in higher concentrations preferentially in the mitochondrial matrix than in the cell nucleus [23], after oxidation by ROS (particularly superoxide) is converted to ethidium that was measured by flow cytometry in FL2 channel (FACSCalibur - Becton & Dickinson) [24].

The comparisons between the groups were done by the Analysis of Covariance (ANCOVA) in ranks using age, sex and body mass index (BMI) as covariates. The Tukey-Kramer post-hoc test was used for multiple comparisons. The correlations were calculated by Spearman partial correlation coefficient. The differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Biochemical data are reported in Table 1. Except for HDL-chol and Lp "a" and glucose, all serum parameters were significantly higher in hyperlipidemic patients. Also the mitochondrial monocyte ROS generation was significantly higher in HL when compared with NL subjects.

A tendency of a positive correlation ($r=0.30$, $p=0.0678$) between serum uric acid levels and monocytes mitochondrial ROS generation was found when NL and HL data were grouped (data not shown).

The immunological markers CRP, IL-6, MCP-1, IP-10 and Mig were similar in both groups (Table 2). However, a highly significant positive correlation between MCP-1 serum level and monocytes mitochondrial ROS generation (Figure 1; $r=0.84$, $p=0.0187$) and also a tendency of positive correlation with ox-LDL ($r=0.66$, $p=0.0746$), in HL patients were found (data not shown). Differently, a significant negative correlation between serum IL-6 and IP-10 levels (Figure 2; $r=-0.71$, $p=0.0473$) was found in HL patients. There was a tendency of a negative correlation ($r=-0.73$, $p=0.0533$) between serum Mig levels and monocytes mitochondrial ROS generation, in hyperlipidemic patients (data not shown).

The hematologic profile of hyperlipidemic subjects (Table 2) showed a significantly higher global count of erythrocytes and leukocytes ($p=0.0240$ and $p=0.0366$, respectively) when compared to normolipidemic ones.

DISCUSSION

In this work, we demonstrated that monocyte ROS generation and oxidized LDL were significantly higher in naive hyperlipidemic patients. ROS generation and ox-LDL have been show to play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis [25,26]. ROS may oxidize LDL *in vitro* or *in vivo* and increases the atherogenic potential of LDL [1] favoring the recruitment of circulating monocytes into the intimal space, inhibiting the ability of resident macrophages to leave the intima, enhancing the rate of lipoprotein uptake leading to foam cell formation and leading to loss of endothelial integrity [2].

Inflammation has become an important topic in the pathogenesis of heart disease over past decade [27] and is accompanied by cytokine-induced alterations in lipid and lipoprotein metabolism and acute-phase protein synthesis [28].

The role of uric acid as a risk marker or risk factor to cardiovascular disease remains controversial [29,30]. In the present study we found higher levels of uric acid in HL subjects, when compared to NL individuals and a tendency of

positive correlation with mitochondrial ROS generation by monocytes. Uric acid level upper 1/3 of normal range becomes prooxidant [30]. Mellin et al. [31] observed a transitory reduction of myocardial ROS production and a diminished myocardial inflammatory response in rats with chronic heart failure after long-term treatment with xanthine oxidase inhibitor. In accordance with our results we speculate that uric acid has an oxidative capacity, in hyperlipidemia.

The association between leukocytosis and increased morbidity and mortality of ischemic vascular disease has been observed for more than half a century [32]. Prospective study by Grau et al. [33] showed that in a high-risk population, elevated leukocyte count independently predicts ischemic events and is also associated with the risk of stroke and vascular death in patients with previous ischemic diseases. Here, we found that leukocyte count was significantly higher in HL patients, however the mechanisms linking leukocyte counts to cardiovascular risk are insufficiently understood. Such a predictive value of white blood cell count is plausible and satisfying because stronger activation of circulating leukocytes could actively contribute to atherogenesis and organ ischemia by increased adhesion to and damage of the endothelium and by disturbance of microvascular flow [34].

The most relevant use of hs-CRP remains in the setting of primary prevention to arterial coronary disease by risk stratification that is classified as high risk patients when hs-CRP levels is above 3.0 mg/L [13]. Both groups presented serum concentrations of hs-CRP below 3.0 mg/L and no significant differences were found between them, although higher levels have been observed in HL group. Recently Lee et al. [6] does not find statistically differences in hs-CRP and IL-6 in patients with or without coronary artery disease.

Our results showed that the circulating levels of cytokines IL-6, MCP-1, IP-10 and Mig were similar in HL and NL groups. Also Holven et al do not found significant differences in serum concentration of MCP-1 in familial hypercholesterolaemia patients and control subjects [35]. However our results are different from that obtained in patients with coronary artery disease by Oliveira [36]

that observed higher serum levels of IP-10 and Mig in patients with unstable angine when compared with healthy individuals. Differently Fernandes et al. [37] found lowest levels of IP-10, Mig and CXCR3 receptor in circulating leukocytes in patients with acute coronary syndromes and speculate a possible migration of these cells to atherosclerotic plaques.

Mach et al. [18] found that lesional T lymphocytes express CXCR3, which is in agreement with the concept that Mig and IP-10 play a role in the recruitment and retention of activated T lymphocytes in vascular wall lesions. The neutralization of this pathway *in vivo* can modulate the immune migration of cells inside of the vascular wall during the atherogenesis. In *Klebsiella*-infected mice the neutralization of IP-10 by a specific antibody lead to a significant reduction in the number or activation status of IFN- γ -producing cells and decrease IFN- γ mRNA expression [38]. Also a study with ApoE^{-/-} CXCL10^{-/-} mice fed a Western-style diet showed that the absence of the CXCL10 gene confers a 2-fold reduction in early lesion in all regions of the aorta when compared with ApoE^{-/-} control mice [39].

In present study a significant negative correlation was found between IL-6 and IP-10 in HL individuals. It has been proposed that IL-6 may act as an anti-inflammatory and immunosuppressive cytokine since it induced IL-1 receptor antagonist and the release of soluble TNF receptor p55 in macrophages *in vivo* [39]. Moreover, it was reported that TNF levels were elevated in IL-6 deficient mice and anti-IL-6 treated mice [40]. Recently it was demonstrated that IL-6 impairs functional maturation of dendritic cells suppressing maturation of chemokine receptor CCR7 as well as inhibiting the production of NF- κ B dependent factors like TNF- α and IP-10 [41]. A negative association between IL-6 and IP-10 found in our study may suggest an antiinflammatory property of IL-6 in modulating the migration of activated T lymphocytes to the sub endothelial space.

A highly positive correlation between MCP-1 serum levels and monocytes ROS generation was found in HL. As these patients present higher monocytes ROS generation but similar MCP-1 levels, when compared with NL

individuals, we hypothesize that HL patients could be in the early stage of the inflammatory process. A tendency of a positive correlation between MCP-1 and ox-LDL serum levels can reinforce this hypothesis. Chen et al. [42] reported that ROS generation plays an important role in MCP-1 gene expression in endothelial cells demonstrating that the activation of MCP-1 is mediated by oxi-reduction mechanisms. Studies by Cushing et al. [43] showed that minimally oxidized LDL induced MCP-1 production by endothelial and smooth muscle cells. Thus MCP-1 emerges as a possible molecular link between oxidized lipoproteins and foam cell recruitment to the vessel wall [14].

Monocytes mitochondrial ROS generation in HL patients showed a tendency of negative correlation with serum Mig levels. Results presented by Fulkerson et al. [44], in experiments *in vitro* with eosinophils, showed that Mig is capable to inhibit superoxide anion formation through the inhibition of eosinophil oxidase activity, providing evidence that Mig blocks the effector function of this leukocyte. Probably in advanced stages of inflammatory process the same action may occur with monocytes cells.

Concluding, in hyperlipidemia the association of circulating MCP-1 with ROS generation by monocyte and ox-LDL levels may demonstrate the importance of oxidative stress in modulating the immunological response and establish a direct link between MCP-1 and oxidized LDL and foam cell formation in the vessel wall. In addition, a highly negative correlation detected between serum IL-6 and IP-10 can show an antiinflammatory property of IL-6, present in these patients.

REFERENCES

- [1] Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005; 111: 3481-8.
- [2] Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(12): 1815-2186.
- [3] Stocker R, Keaney-Jr JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; (84): 1381-478.
- [4] Chisolm 3rd GM, Hazen SL, Fox PL, Cathcart MK. The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 1999; 274: 25959-62.
- [5] Pinon P, Kaski JC. Inflammation, atherosclerosis and cardiovascular disease risk: PAPP-A, Lp-PLA2 and cystatin C. New insight or redundant information? *Rev Esp Cardiol* 2006; 59: 247-58.
- [6] Lee KWJ, Hill JS, Walley KR, Frohlich JJ. Relative value of multiple plasma biomarkers as risk factors for coronary artery disease and death in an angiography cohort. *CMAJ* 2006; 174(4): 461-6.
- [7] Bermudez EA, Rifai N, Buring J, Manson JE, Ridker PM. Interrelationships among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1668-73.
- [8] Francisco G, Hernández C, Simó Rafael. Serum Markers of vascular inflammation in dyslipemia. *Clin Chim Acta* 2006; 369: 1-16.
- [9] Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000; 117: 1162-72.
- [10] Schieffer B, Selle T, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Grote K, Tietge UJF, et al. Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation* 2004; 110: 3493-500.

- [11] Ballantyne C, Nambi V. Markers inflammation and their clinical significance. *Atherosclerosis* 2005; suppl 6: 21-9.
- [12] Torzewski M, Rist C, Mortensen RF, Zwaka TP, Bienek M, Waltenberger J. C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2094-9.
- [13] Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, III Cannon RO, Criqui M, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease application to clinical and public health practice a statement for healthcare professional from the centers for disease control and prevent and the American Heart Association. *Circulation* 2003; 107: 499-511.
- [14] Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res* 2004; 95: 858-66.
- [15] Lemos JA, Morrow DA, Sabatine MS, Murphy SA, Gibson CM, Antman EM, et al. Association Between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003; 107: 690-5.
- [16] Namiki M, Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M, Hirase T, Ishida T, et al. Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophage and formation of atherosclerosis lesion. Synergism with hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 115-20.
- [17] Clark-Lewis I, Mattioli I, Gong JH, Loetscher P. Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *J Biol Chem* 2003; 278 (1): 289-95.
- [18] Mach F, A Sauty A, Larossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P et al. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest* 1999; 104:1041–50.

- [19] Levya F, Anker SD, Godsland IF, Teixeira M, Hellwell PG, Kox WJ, et al. Uric acid chronic heart failure: a marker of chronic inflammation. *Eur Heart J* 1998; 19: 1746-7.
- [20] Kanellis J, Watanabe S, Li JH, Kang DH, Li P.; Nakagawa T, et al. Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2. *Hypertension* 2003; 41(6): 1287-1293.
- [21] National Cholesterol Education Program. Executive summary of the third report the National Cholesterol Education Program. Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adults Treatment III). *JAMA* 2001; 285: 2486-97.
- [22] Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol* 1976; 5: 9-15.
- [23] Nicholls G, Ferguson SJ. Mitochondria in the cell. Nicholls G, Ferguson SJ. *Bioenergetics 3*. Second edition. London: Academic Press Elsevier; 2002. p.250-70.
- [24] Becker LB, Hoek TLV, Shao Z-H, Li C-Q, Schumacker PT. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *Am J Physiol* 1999; 277:H2240-6.
- [25] Heinecke JW, Baker L, Rosen H, Chait A. Superoxide-mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1986; 77(3): 757-61.
- [26] Steinberg D, Parthasaraty S, Crew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989, 320: 915-24.
- [27] Mehra VC, Ramgolam VS, Bender JR. Cytokines and cardiovascular disease. *J Leukoc Biol* 2005; 78:805-18.

- [28] Khovidhunkit W, Kim MS, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR et al. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *Lipid Res.* 2004; 45: 1169-96.
- [29] Culleton BF, Larson MG, Kannel WB, Levy D. Serum uric acid and risk for cardiovascular disease and death: the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med* 1999; 131(1): 7-13.
- [30] Hayden MR, Tyagi SC. Uric acid: a new look at an old risk marker for cardiovascular disease, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus: the urate redox shuttle. *Nutr Metab* 2004; 1(1):10.
- [31] Mellin M, Isabelle M, Oudot A, Vergely-Vandriesse C, Monteil C, Di Meglio B, et al. Transient reduction in myocardial free oxygen radical levels is involved in the improved cardiac function and structure after long-term allopurinol treatment initiated in established chronic heart failure. *Eur Heart J* 2005; 26: 1544–50. 2004; 101(7): 1987-92.
- [32] Collier BS. Leukocytosis and ischemic vascular disease morbidity and mortality: is it time to intervene? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:658-70.
- [33] Grau JA, Boddy AW, Dukovic DA, Buggle F, Lichy C , Brandt T, et al. Leukocyte count as an independent predictor of recurrent ischemic events. *Stroke* 2004; 35: 1147-52.
- [34] Ernst E, Hammerschmidt DE, Bagge U, Matrai A, Dormandy JA. Leukocytes and the risk of ischemic diseases. *JAMA.* 1987; 257: 2318–24.
- [35] Holven KB, Myhre AM, Aukrust P, Hagve TA, Ose L, Nenseter MS. Patients with familial hypercholesterolaemia show enhanced spontaneous chemokine release from peripheral blood mononuclear cells ex vivo. Dependency of xanthomas/xanthelasms, smoking and gender. *Eur Heart J* 2003; 24: 1756–62.
- [36] Oliveira RTD. [Expression of cytokines, chemokines and chemokines receptors in peripheral blood mononuclear cells in patients with coronary artery disease.Port.]. [dissertation]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2006.

- [37] Fernandes JL, Mamoni RL, Orford JL, Garcia C, Selwyn AP, Coelho OR, et al. Increased Th1 activity in patients with coronary artery disease. *Cytokine* 2004; 26: 131-7.
- [38] Zeng X, Moore TA, Newstead MW, Deng JC, Kunkel SL, Luster AD, et al. Interferon-inducible protein 10, but not monokine induced by gamma interferon, promotes protective type 1 immunity in murine *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *Infect immun* 2005; 73(12):8226-36.
- [39] Heller EA, Liu E, Tager AM, Yuan Q, Lin AY, Ahluwalia N, et al. Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells. *Circulation* 2006; 113: 2301-12.
- [40] Tilg H, Dinarello CA, Mier JW. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol Today* 1997; 18:428-32.
- [41] Hegde S, Pahne J, Smola-Hess Sigrun. Novel immunosuppressive properties of interleukin-6 in dendritic cells: inhibition of NF-kappaB binding activity and CCR7 expression. *FASEB J* 2004; 18:1439-41.
- [42] Chen XL, Zhang Q, Zhao R, Medford RM. Superoxide, H₂O₂, and iron are required for TNF-alpha-induced MCP-1 gene expression in endothelial cells: role of Rac1 and NADPH oxidase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H1001-7.
- [43] Cushing SD, Berlinert JA, Valentet AJ, Territo MC, Navab M, Parhamit F. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5134-8.
- [44] Fulkerson PC, Zimmermann N, Brandt EB, Muntel EE, Doecker MP, Kavanaugh JL, et al. Negative regulation of eosinophil recruitment to the lung by the chemokine monokine induced by IFN-(Mig, CXCL9). *Proc Natl Acad Sci U S A*

Acknowledgments

Financial support for the study was provided by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão (FAEPEX/FCM)). The authors are grateful to Helymar da Costa Machado (Statistical Research Group of UNICAMP), Giovanna Rosa Degasperi (graduate student), Larissa Sayuri Kato (undergraduate student) and Aparecida Sousa Pereira for their excellent technical assistance.

Table 1- Biochemical data of normolipidemic (NL) and hyperlipidemic (HL) individuals

	NL (n=18)	HL (n=29)	p-value
Cholesterol (mg/dL)	168.1±28.3	259.7±65.3	<0.0001
HDL-cholesterol (mg/dL)	57.8±13.0	56.6±15.2	0.3690
LDL-cholesterol (mg/dL)	110.1±28.2	163.0±38.4	<0.0001
VLDL- cholesterol (mg/dL)	14.7±5.6	36.6±16.8	<0.0001
TG (mg/dL)	73.5±28.9	287.8±328.6	<0.0001
Apolipoprotein A1 (mg/dL)	152.2±20.6	161.1±29.4	0.0229
Apolipoprotein B (mg/dL)	83.0±20.4	132.4±21.9	<0.0001
Lipoprotein "a" (mg/dL)	13.4±16.4	39.2±44.7	0.0969
Ox-LDL (U/L).	52.2±27.5	77.6±14.9	<0.0001
Glucose (mg/dL)	80.9±8.8	87.5±11.8	0.1514
Uric acid (mg/dL)	4.4±1.6	5.9±1.8	0.039
ROS (fluorescence-a.u.)	270.5±78	462.3±236.9	0.0138

Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation. OX-LDL - oxidized-LDL; ROS - Reactive Species Generation; a.u.-arbitrary units. Statistical analyses by ANCOVA in ranks (age, sex and BMI as covariables).

Table 2- Immunological and hematological profiles in normolipidemic (NL) and hyperlipidemic (HL) individuals

	NL (n=18)	HL (n=29)	P value
IL-6 (pg/mL)	0.4±0.3	0.6±0.6	0.9480
CRP (mg/L)	0.5±0.5	0.6±0.9	0.2607
MCP-1 (ng/mL)*	45.8±23.1	115.1±251.1	0.7478
IP-10 (ng/mL)*	117.0±130.3	143.4±91.7	0.4358
Mig (ng/mL)*	554.2±334.9	635.0±148.6	0.1198
Erythrocyte ($10^6/\text{mm}^3$)	4.6±0.6	4.8±0.5	0.0240
Hemoglobin (g/dL)	13.7±1.5	14.5±1.8	0.3050
Hematocrit (%)	40.8±3.5	42.7±4.0	0.1789
Leukocyte ($10^3/\text{mm}^3$)	5.4±0.9	6.4±1.4	0.0366
Lymphocyte ($10^3/\text{mm}^3$)	2.0±0.4	2.4±0.7	0.0530
Monocyte ($10^3/\text{mm}^3$)	0.4±0.1	0.4±0.1	0.6413

Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation. *NL group (n=10-18) and HL group (n=12-29). Statistical analyses by ANCOVA in ranks (age, sex and BMI as covariables)

Figure1

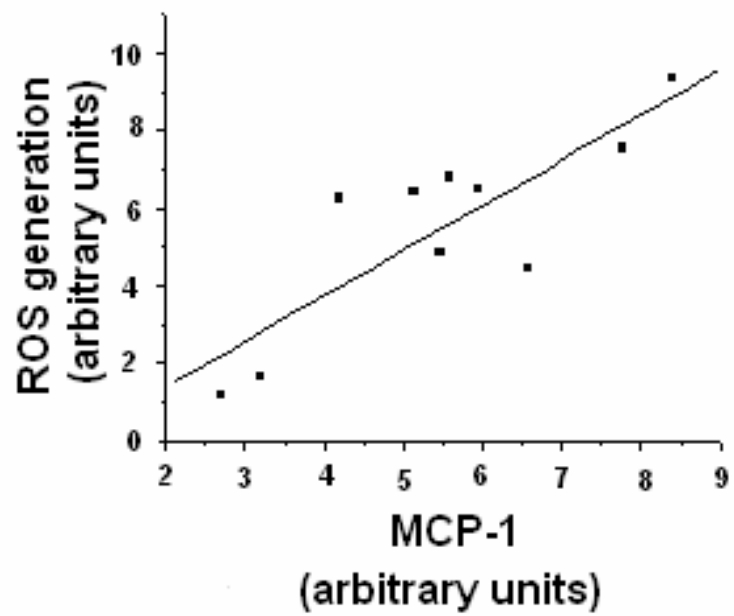
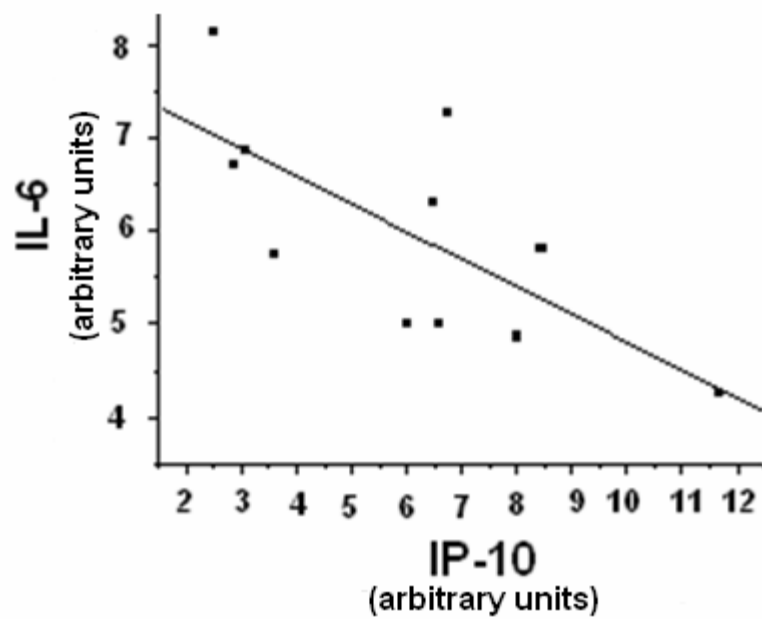


Figure 2



LEGENDS FOR THE FIGURES

Figure 1. Correlation between monocyte ROS generation and serum MCP-1 in HL group (n=10). Spearman's test (corrected for age, sex and BMI), arbitrary units: values of ROS generation and MCP-1 level adjusted by ranks, $r=0.84$, $p=0.01$.

Figure 2. Correlation between IL-6 and IP-10 serum in HL group (n=11). Spearman's test (corrected for age, sex and BMI), arbitrary units: values adjusted by ranks, $r=-0.71$, $p=0.0473$.

4- DISCUSSÃO GERAL

Atualmente, sabe-se que a aterosclerose é resultante da complexa interação entre fatores genéticos (diabetes e dislipidemia) e ambientais como idade, hábito de fumar e estilo de vida (Spence et al., 1999; Libby, 2000). Vários estudos mostram que há uma correlação positiva entre a concentração plasmática de lipoproteínas remanescentes do catabolismo das VLDL, bem como uma correlação inversa com a concentração sérica da HDL e a suscetibilidade para o desenvolvimento da aterosclerose (Castelli et al., 1986; Ng e Hegele, 1993; Kihouche et al., 1998; Kihouche et al., 2000; Robbesyn et al., 2003; Barter, 2005). Além disso, o papel da inflamação na patogênese da aterosclerose tem sido bem estabelecido com o passar dos anos, bem como o aumento da atividade inflamatória no sangue periférico associado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Pearson et al., 2003; Nijm et al., 2005).

A “teoria da oxidação” proposta por Steinberg et al. (1989) mostrou que os produtos da oxidação dos lípides/proteínas são os responsáveis pela formação e desenvolvimento da aterosclerose. A LDL intimal é considerada o principal alvo para a oxidação (Jessup et al., 2004), tendo sido detectada nas lesões ateroscleróticas, exibindo várias propriedades pró-inflamatórias, desempenhando um importante papel na formação e progressão da placa aterosclerótica (Robbesyn et al., 2003). Ehara et al. (2001) observaram que a concentração plasmática da LDL-ox encontrava-se significativamente mais elevada em pacientes com doença arterial coronariana do que nos indivíduos controles e que também havia uma correlação positiva com a gravidade da doença, isto é, os pacientes com infarto do miocárdio apresentavam concentrações séricas mais elevadas de LDL-ox do que os pacientes com angina instável e com angina estável. No presente trabalho, os pacientes hipercolesterolêmicos (HC) e com dislipidemia mista (DLM) apresentaram maior concentração sérica de LDL-ox do que os indivíduos controle (CTR) ($p=0,0003$).

A importância do tamanho e da composição da LDL na progressão das doenças cardiovasculares tem sido descrita na literatura. As partículas de LDL pequenas e densas e as LDL-oxidadas estão, independentemente, associadas ao

aumento do risco para o desenvolvimento da aterosclerose (Austin et al., 1988; Yoshino et al., 2003). Ao estimarmos o tamanho das LDL, usando a razão TG/HDL-col, foi constatado que os pacientes hiperlipidêmicos apresentavam a razão significativamente mais elevada ($p < 0,0001$) quando comparados ao grupo CTR e, em média, superior a dois, segundo Maruyama et al. (2003) o valor desta razão está associado a altas concentrações séricas de LDL pequenas e densas. No presente trabalho, uma correlação positiva entre a razão TG/HDL-col e a concentração sérica da LDL-ox foi encontrada, mostrando que as LDL pequenas e densas são mais suscetíveis ao estresse oxidativo. Segundo Hirano et al. (2005) as LDL com diâmetro inferior a 25,5 nm e, portanto mais aterogênicas, apresentam a razão LDL-col/Apo B-100 menor do que 1,2. Ao utilizar este índice, observamos que os pacientes com DLM apresentavam esta razão, em média, inferior a 1,2 e, significativamente, mais baixa do que os indivíduos CTR e HC, confirmando a presença de LDL pequenas e densas no soro desses pacientes. Além disso, os pacientes com DLM apresentaram a concentração sérica de VLDL-colesterol significativamente mais elevada, quando comparados aos HC e aos CTR ($p < 0,0001$). Segundo Nakajima et al. (2006) as VLDL também podem ter acesso ao espaço subendotelial e, sem sofrer modificações oxidativas, exercem importante papel no processo inicial da aterogênese.

A mitocôndria é considerada a mais importante fonte de radicais livres, bem como o principal alvo para o processo regulatório dos radicais livres e suas ações tóxicas (Cadenas, 2004). A taxa de produção de EROs mitocondrial está elevada em diversas condições patológicas, incluindo hipóxia, isquemia, reperfusão e inibição da respiração mitocondrial (Chen et al., 2003). Trabalhos realizados por Chen et al. (2003) e Zmijewski et al. (2005) demonstraram que geração de EROs pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial se dá nos complexos I, II e III.

A *probe* fluorescente diidroetídio, um cátion permeável à membrana que se acumula em altas concentrações, preferencialmente, na matriz mitocondrial em relação ao núcleo celular (Nicholls e Fergunson, 2002_a) foi utilizada neste trabalho

para medir a geração de EROs pelos monócitos. A geração de EROs mitocondrial foi significativamente maior nos indivíduos HC ($p=0,0491$) do que nos CTR. Diferentemente, Araújo et al. (1995) ao medirem a geração de EROs em células mononucleares ativadas, usando o método de quimioluminescência, observaram uma maior produção de EROs em pacientes com dislipidemia mista do que em pacientes hipercolesterolêmicos. A razão para esta discrepância pode estar relacionada à metodologia utilizada isto é, o luminol mede preferencialmente EROs extracelular enquanto que o DHE mede o intracelular (Rinaldi, 2006). Entretanto, nossos resultados são semelhantes aos observados por Oliveira et al. (2005) que ao estudarem mitocôndrias isoladas de fígado, coração e cérebro e células mononucleares intactas de baço verificaram maior geração de EROs nos camundongos hipercolesterolêmicos ("knock-out" para receptor de LDL) quando comparadas com camundongos "wild-type". Por outro lado, estudo realizado por Alberici (2006) demonstrou que a geração de EROs por células mononucleares de camundongos hipertrigliceridêmicos é semelhante a de camundongos normolipidêmicos. Estes resultados sugerem que a hipercolesterolemia mais do que a hipertrigliceridemia é responsável pela geração de EROs mitocondrial. Além disso, o estudo realizado por Oliveira et al. (2005) constatou que mitocôndria de fígado de camundongos hipercolesterolêmicos não mantém o estado reduzido do NADPH da matriz, a principal defesa antioxidante da mitocôndria. Portanto, a maior geração de EROs por nós observada, nos indivíduos com hipercolesterolemia familiar, pode ser conseqüência da redução da defesa antioxidante destes indivíduos, sendo porém necessários estudos que confirmem esta hipótese. Segundo estudo realizado por Furukawa et al. (2004) o acúmulo de gordura pode levar ao aumento da geração de EROS. No presente estudo, os pacientes hipercolesterolêmicos possuíam, em média, IMC maior do que o grupo-controle, porém dentro do intervalo considerado saudável ($20-25 \text{ Kg/m}^2$) e inferior aos indivíduos com dislipidemia mista.

Nessa pesquisa, uma correlação positiva e significativa entre a geração mitocondrial de EROs pelos monócitos com a LDL-ox plasmática foi encontrada, quando os indivíduos controles e hiperlipidêmicos foram analisados em conjunto

($r=0.35$, $p=0.0385$). Estes resultados são concordantes com a proposta de Chisolm et al. (1999) de que os monócitos/macrófagos são fortes candidatos a mediadores da oxidação *in vivo* das lipoproteínas através da ação das proteínas ceruloplasmina, 15-lipoxigenase e mieloperoxidase. Também é sabido que o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é o principal agente promotor da oxidação da LDL mediada por macrófagos e células musculares lisas (Heinecke et al., 1986). A LDL-ox, por outro lado, é capaz de induzir a geração de EROs pela mitocôndria por meio de um mecanismo que requer ferro, ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (ONSe) e a atividade do complexo II (Zmijewsk et al., 2005). Em um estudo com 25 indivíduos saudáveis, submetidos à intensa atividade física, Wang et al. (2006) demonstraram que a LDL-ox induziu a geração de EROs pelos monócitos através da diminuição da atividade das enzimas superóxido dismutase citosólica e mitocondrial e que a utilização de inibidores da NADPH oxidase e do complexo mitocondrial I e II impediram a geração de EROs mitocondrial pelos monócitos, induzida pela LDL-ox. Juntas essas evidências sugerem a existência de um ciclo vicioso no desenvolvimento do estresse oxidativo na hipercolesterolemia, ou seja, as espécies reativas de oxigênio geradas pela mitocôndria são deletérias para a célula, aumentando a oxidação da LDL e esta, por sua vez, também pode causar danos à mitocôndria. A associação destes processos leva à morte celular e pode ser parte importante da patogênese da aterosclerose.

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta \psi_m$) representa a expressão funcional da cadeia respiratória e a integridade da membrana interna da mitocôndria (Yao e Tabas, 2001). Não foram encontradas, no presente trabalho, diferenças estatisticamente significativas entre os potenciais de membrana mitocondrial, avaliados em monócitos e linfócitos de indivíduos normo e hiperlipidêmicos. Houve, entretanto, aumento da fluorescência após a adição da oligomicina (um inibidor da ATP sintase), sugerindo que a fosforilação oxidativa estava preservada em ambos os grupos, apesar dos pacientes hiperlipidêmicos apresentarem maior geração de EROs e maior concentração sérica da LDL-ox. Nossos resultados diferem do estudo *in vitro*, com cultura de células endoteliais de veias umbilicais humanas, efetuado por Ou et al. (2006), onde foi detectada

despolarização do $\Delta\Psi_m$ na presença de LDL-ox. Essas diferenças podem ser, provavelmente, em virtude das especificidades de respostas por diferentes tipos celulares.

Nenhuma associação foi encontrada entre o número de leucócitos e a geração de EROs mitocondrial ou LDL-ox, sugerindo que a condição de estresse oxidativo não tem influência sobre o número destas células no sangue periférico.

Os pacientes portadores de DLM apresentaram maior concentração sérica de insulina ($p=0,0002$), quando comparados aos controles e hipercolesterolêmicos. O índice que avalia a resistência à insulina (Homeostasis Model Assessment-HOMA-R) foi maior tanto nos pacientes com DLM quanto nos HC, quando comparado ao grupo-controle ($p=0,0003$). Apesar de não ter sido encontrada correlação entre a concentração sérica da insulina e a geração de EROs, a insulina poderia estar contribuindo para o aumento da geração de radicais livres por meio da ativação do sistema renina-angiotensina que leva ao aumento do angiotensinogênio II, um potente indutor endógeno da NADPH oxidase, aumentando a síntese de NAD(P)H (Hayden e Tyagi, 2004; Higashi et al., 2005). Ceolotto et al. (2004), trabalhando com cultura de fibroblastos humanos, constataram que a concentração elevada da insulina gera $O_2^{\cdot-}$ via NAD(P)H através de um mecanismo que envolve a ativação da fosfatidilinositol 3'-kinase. O HOMA-R correlacionou-se, positivamente, com a presença de LDL pequenas e densas (razão TG/HDLcol, $r=0,6404$) que são mais suscetíveis à oxidação. Reaven (2002) obteve resultados semelhantes ao correlacionar a razão TG/HDLcol e a concentração plasmática da insulina após sobrecarga de glicose, em 400 indivíduos saudáveis.

O processo inflamatório tem se tornado um dos temas centrais na patogênese das doenças cardiovasculares nas últimas décadas (Mehra et al., 2005). Atualmente é prática clínica corrente usar a redução do colesterol da LDL como uma estratégia efetiva para reduzir (ou reverter) o processo aterosclerótico e inibir a inflamação associada a esta condição (Barter, 2005).

O papel do ácido úrico como marcador de risco de doenças cardiovasculares é controverso (Hayden e Tyagi, 2004). Culleton et al. (1999) ao analisarem os dados obtidos no estudo prospectivo de Framingham realizado em 6.763 adultos, demonstraram não haver associação entre a concentração elevada do ácido úrico e a elevação do risco para o desenvolvimento de doenças arteriais coronarianas ou morte por doenças cardiovasculares. No presente trabalho, foi encontrado que os pacientes hiperlipidêmicos têm maior concentração sérica de ácido úrico ($p=0,039$), quando comparados aos indivíduos normolipidêmicos. A análise conjunta dos dados dos pacientes hiperlipidêmicos e controle mostrou uma tendência de correlação positiva entre a geração de EROs e a concentração plasmática de ácido úrico ($r=0,30$, $p=0,0678$). Estes resultados estão de acordo com observações contidas no estudo de revisão realizado por Hayden e Tyagi (2004) ao mostrar que em humanos, quando as concentrações séricas de ácido úrico estão elevadas ($>6,5$ a 7 mg/dL para homens e > 6 mg/dL para mulheres) este metabólito pode passar a exibir propriedades pró-oxidantes em determinadas condições: pH ácido, diminuição do sistema de defesa e aumento da geração de EROs. O estudo realizado por Mellin et al. (2005) mostrou que ratos com insuficiência cardíaca crônica, quando tratados em longo prazo com a xantina oxidase (uma enzima importante no metabolismo das purinas e síntese do ácido úrico) melhoram a hemodinâmica cardíaca, têm redução da dilatação ventricular esquerda, hipertrofia e acúmulo do colágeno, e assim têm melhora das funções cardíacas sistólicas e diastólicas. Os autores concluem que estes efeitos do tratamento podem estar relacionados com a redução transitória da produção de EROs pelo miocárdio e/ou diminuição da resposta inflamatória miocárdica.

A associação entre a leucocitose e o aumento da morbidez e mortalidade das doenças vasculares isquêmicas tem sido observada desde a metade do século passado (Coller, 2005). Estudo prospectivo realizado por Grau et al. (2004) mostrou que, em população de alto risco, a contagem global de leucócitos é um preditor independente de eventos de isquemia e que também está associada ao risco de morte por doenças vasculares, em pacientes com história prévia de doenças isquêmicas. Neste trabalho, nós demonstramos que a

contagem global de leucócitos foi significativamente mais elevada nos pacientes hiperlipidêmicos ($p=0,0366$). Os mecanismos que ligam a contagem global de leucócitos ao risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares não são totalmente compreendidos. A ativação dos leucócitos circulantes pode contribuir para a aterogênese e para a isquemia de órgãos por aumentar a adesão e o dano endotelial e causar distúrbio no fluxo microvascular (Ernst et al., 1987).

A PCR-us parece ser útil na estratificação do risco de eventos coronarianos. São considerados de alto risco, indivíduos com valores sérico de PCR-us acima de 3,0 mg/L (Pearson et al, 2003). No presente trabalho, todos os grupos estudados tiveram concentração sérica da PCR-us inferior a 3,0 mg/dL e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos, embora concentrações mais altas nos pacientes com dislipidemia mista tenham sido detectadas. Lee et al. (2006) ao compararem as concentrações séricas de PCR-us e IL-6 de pacientes com e sem DAC não encontraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações séricas da MCP-1, IP-10, Mig e IL-6 entre os grupos hiperlipidêmicos e controles. Holven et al. (2003) também não encontraram diferença significativa entre as concentrações séricas de MCP-1 de pacientes com hipercolesterolemia familiar e a de indivíduos-controle. Entretanto, em estudo realizado por Oliveira (2006) foi encontrada maior concentração plasmática de IP-10 e Mig em pacientes com angina estável e uma tendência de maior concentração de Mig em pacientes com angina instável, quando comparados a indivíduos controles. A razão para essa diferença entre os resultados pode estar relacionada ao fato de que os pacientes, nos dois estudos, possuíam condições clínicas e terapêuticas diferentes.

Observamos que, quando somente os dados dos pacientes hiperlipidêmicos foram analisados, notou-se uma correlação positiva significativa entre a concentração plasmática da MCP-1 e a geração mitocondrial pelos monócitos ($r=0,84$, $p= 0,0187$) e uma tendência de correlação positiva com a

concentração sérica da LDL-ox ($r=0,66$, $p=0,0746$). Estes resultados estão de acordo com os estudos realizados por Chen et al. (2004) que, ao trabalharem com cultura de células endoteliais de aorta humana demonstraram que a geração de EROs (H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$), pela NADPH-oxidase, aumenta a expressão da MCP-1 induzida pelo TNF- α confirmando, portanto, que a ativação da expressão do gene da MCP-1 é mediada por mecanismos de oxi-redução e com o estudo *in vitro* conduzido por Li e Mehta (2000) que mostraram que a incubação de células endoteliais de artéria coronariana humana com LDL-ox levou a um aumento tanto da expressão do MCP-1 RNAm quanto da proteína. Estudos *in vitro* também demonstraram a indução da expressão de MCP-1 em células endoteliais e células musculares lisas, por LDL minimamente modificadas (Cushing et al., 1990; Rajavashisth et al., 1990). Assim a MCP-1 surge como uma possível ligação entre a LDL-oxidada e a formação de células espumosas na parede arterial (Charo e Taubman, 2004).

Estudo *in vitro* demonstrou importância da IP-10 e Mig na regulação do recrutamento dos linfócitos para a área da lesão (Mach et al., 1999). A neutralização destas vias *in vivo* poderia modular a migração de células imunes para esta região vascular, durante a aterogênese. No presente estudo, quando somente os pacientes hiperlipidêmicos foram analisados, foi observada uma significativa correlação negativa entre as concentrações séricas da IL-6 e da IP-10 ($r=-0,71$, $p=0,0473$). A IL-6 tem sido considerada, há muito tempo, como uma citocina pró-inflamatória induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS). Como muitas outras citocinas a IL-6 tem ambas as propriedades pró e antiinflamatórias, embora seja um potente indutor das proteínas de fase aguda. É descrito na literatura que a IL-6 inibe a produção das citocinas pró-inflamatórias, porém tem pouco efeito sobre as interleucinas antiinflamatórias, além de induzir a síntese de glicocorticóides. Todos esses efeitos imunológicos fazem com que a IL-6 pertença ao grupo de citocinas antiinflamatórias (Tilg et al., 1994; Xing et al., 1998; Opal e DePalo, 2000). A correlação negativa obtida entre a IL-6 e a IP-10, nos pacientes hiperlipidêmicos, talvez possa indicar que a IL-6 esteja exercendo um papel antiinflamatório, atuando na modulação da migração de células imunes para o

subendotélio. Entretanto, são necessários mais estudos que comprovem a ação antiinflamatória da IL-6 na aterogênese.

No presente trabalho, uma tendência de correlação negativa ($r=-0,73$, $p=0,0533$) foi encontrada entre a concentração sérica da Mig e a geração mitocondrial de EROs. Este resultado é concordante com o resultado obtido por Fulkerson et al. (2004) que constataram que a Mig é capaz de inibir a geração de ânion superóxido pelos eosinófilos, por meio da inibição da atividade da oxidase eosinofílica, bloqueando, desta forma, a função efetora destes leucócitos, e, além disso, observaram que esta quimiocina é uma inibidora natural do recrutamento dos eosinófilos.

A correlação positiva entre a concentração plasmática de IL-6 e a medida de circunferência da cintura ($r=0,58$, $p=0,0002$), observada no presente estudo, sugere que a IL-6 participa de processos regulatórios do peso corporal, uma vez que o tecido adiposo libera grande quantidade desta citocina (Mohamed-Ali et al., 1997).

5- CONCLUSÃO GERAL

- A geração mitocondrial de EROs, avaliada em monócitos isolados de pacientes hipercolesterolêmicos, é maior do que a dos indivíduos normolipidêmicos
- Maiores concentrações séricas de LDL-oxidada e de presença de LDL pequenas e densas, foram encontradas nos pacientes hiperlipidêmicos
- Provavelmente, existe um ciclo vicioso entre a geração mitocondrial de EROs e a concentração sérica de LDL-oxidada
- A produção de EROs pelos monócitos circulantes dos indivíduos hiperlipidêmicos pode contribuir para o estresse oxidativo e, possivelmente, para a aterogênese nestes indivíduos
- Na presente condição de hiperlipidemia primária, a elevação da LDL-ox sérica não afetou a função mitocondrial
- Na hiperlipidemia primária, a associação da geração mitocondrial de EROs em monócitos circulantes com a concentração sérica da MCP-1 demonstra a importância do estresse oxidativo na modulação da resposta imunológica e estabelece uma ligação direta entre a MCP-1 e a LDL-oxidada
- A correlação negativa entre a concentração sérica da IL-6 e da IP-10 pode demonstrar uma propriedade antiinflamatória da IL-6, presente nestes pacientes

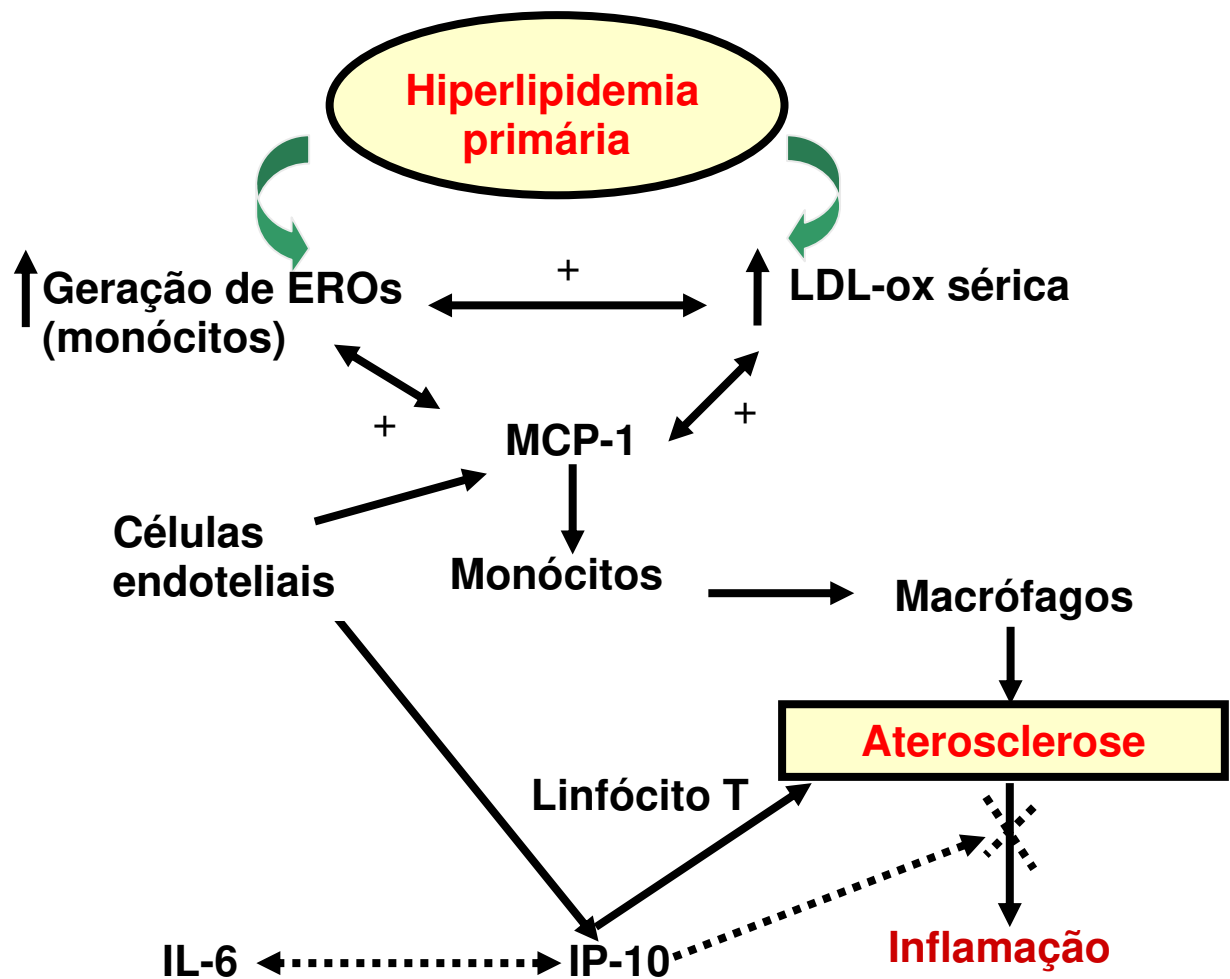


Figura 1- A hiperlipidemia primária leva a maior produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (EROs) em monócitos circulantes e ao aumento da concentração sérica da LDL oxidada (LDL-ox), que estão positivamente correlacionados, criando, portanto, um ciclo vicioso. As correlações positivas detectadas entre a concentração sérica MCP-1 (monocina induzida pelo interferon-gama) com a geração de EROs pelos monócitos e com a concentração sérica da LDL-ox podem indicar que esses parâmetros podem ser os responsáveis pela ativação das células endoteliais assim como pela lesão do endotélio, uma vez que a MCP-1 é responsável pelo recrutamento dos monócitos circulantes para a área de lesão endotelial, dando início ao processo aterosclerótico. A aterosclerose, processo imunoinflamatório complexo e contínuo, também é caracterizada pela presença de linfócitos T atraídos para a área de lesão pela ação da IP-10 (proteína induzida pelo interferon gama) e da Mig (monocina induzida pelo interferon-gama), liberadas pelas células endoteliais ativadas. A forte correlação negativa entre a IL-6 e a IP-10 pode ser indicativa do papel modulador da IL-6 sobre a migração dos linfócitos T para a área de lesão, levantando a possibilidade de que, nestes pacientes, a IL-6 esteja exercendo um papel antiinflamatório.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cytokines. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. Fourth edition. Philadelphia: WB Saunders Company; 2000. p.235-69.

Alberici LC. Camundongos hiperlipidêmicos transgênicos para a apolipoproteína-CIII tem aumento de catabolismo corporal e atividade do canal mitocondrial de K⁺ sensível a ATP[Tese - Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2006.

Araujo FB, Barbosa DS, Hsin CY, Maranhão RC, Abdalla DSP. Evaluation of oxidative stress in patients with hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1995; 117: 61- 71.

Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1988; 260: 1917-21.

Barter P. The inflammation: Lipoprotein cycle. *Atherosclerosis supplements* 2005; 6: 15–20.

Ball RY, Stowers EC, Burton JH, Cary NR, Skepper JN, Mitchinson MJ. Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma. *Atherosclerosis* 1995; 114: 45-54.

Bea F, Hudson FN, Chait A, Kavanagh TJ, Rosenfeld ME. Induction of glutathione synthesis in macrophages by oxidized low-density lipoproteins is mediated by consensus antioxidant response elements. *Circ Res* 2003; 92: 386-93.

Bhakdi S, Torzewski M, Klouche M, Hemmes M. Complement and Atherogenesis Binding of CRP to Degraded, Nonoxidized LDL Enhances Complement Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19: 2348-54.

Brasil-Ministério da Saúde. Dislipidemias em pacientes de alto risco de desenvolver eventos cardiovasculares. Disponível em www.saude.gov.br. Acesso em 29 de setembro de 2006

Cadenas E. Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Molecular Aspect of Medicine* 2004; 25: 17-26.

Carmena R. Hiperlipoproteinemias: conceito e classificação. In: CARMENA, R. & ORDOVAS, J.M. Hiperlipidemias-Clínica e tratamento. São Paulo. Ed.Americana de Publicações; 2000. p. 33-9.

Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. JAMA 1986; 256: 2835-8.

Cathcart MK, Morel DW, Chisolm GM 3rd. Monocytes and neutrophils oxidize low density lipoprotein making it cytotoxic. J Leukoc Biol 1985; 38(2): 341-350.

Ceolotto G, Bevilacqua M, Papparella I, Baritono E, Franco L, Corvaja C, et al. Insulin generates free radicals by an NAD(P)H, phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent mechanism in human skin fibroblasts ex vivo. Diabetes 2004; 53(5): 1344-51.

Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. Circ Res 2004; 95: 858-66.

Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnfsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. J Biol Chem, 2003; 278(38): 36027-31.

Chen XL, Zhang Q, Zhao R, Medford RM. Superoxide, H₂O₂, and iron are required for TNF-alpha-induced MCP-1 gene expression in endothelial cells: role of Rac1 and NADPH oxidase. AM J Physiol Heart Circ Physiol 2004; 286: H1001-7.

Chisolm 3rd GM, Hazen SL, Fox PL, Cathcart MK. The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. Journal of Biological Chemistry, 1999; 274: 25959-62.

Clark-Lewis I, Mattioli I, Gong JH, Loetscher P. Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. J Biol Chem 2003; 278 (1): 289-95.

Coller BS. Leukocytosis and ischemic vascular disease morbidity and mortality: is it time to intervene? Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25:658-70.

Cohen MC, Cohen S. Cytokine function: a study in biology diversity. *Am J Clin Pathol* 1996; 105: 589-598.

Culleton BF, Larson MG, Kannel WB, Levy D. Serum uric acid and risk for cardiovascular disease and death: the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med* 1999; 131(1): 7-13.

Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 5134-38.

Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118: 503-8.

Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, et al. Elevated levels of oxidized Low Density Lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 2001; 103: 1955-60.

Ernst E, Hammerschmidt DE, Bagge U, Matrai A, Dormandy JA. Leukocytes and the risk of ischemic diseases. *JAMA*. 1987; 257: 2318-24.

Fang J, Alderman MH. Serum uric acid and cardiovascular mortality the NHANES I epidemiologic follow-up study, 1971-1992. National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2000; 283(18): 2404-10.

Fulkerson PC, Zimmermann N, Brandt EB, Muntel EE, Doecker MP, Kavanaugh JL, et al. Negative regulation of eosinophil recruitment to the lung by the chemokine monokine induced by IFN-(Mig, CXCL9). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(7):1987-92.

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; 114: 1752-61.

Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N England J Med* 1992; 326(4): 242-50.

Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76 (1):333-37.

Grau JA, Boddy AW, Dukovic DA, Buggle F, Lichy C , Brandt T, et al. Leukocyte count as an independent predictor of recurrent ischemic events. *Stroke* 2004; 35: 1147-52.

Hayden MR, Tyagi SC. Uric acid: a new look at an old risk marker for cardiovascular disease, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus: the urate redox shuttle. *Nutr Metab* 2004; 1(1):10.

Heinecke JW, Baker L, Rosen H, Chait A. Superoxide-mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1986; 77(3): 757-61.

Hiramatsu K, Rosen H, Heinecke JW, Wolfbauer G, Chait A. Superoxide initiates oxidation of low density lipoprotein by human monocytes. *Arteriosclerosis* 1987; 7(1): 55-60.

Higashi Y, Peng T, Du J, Sukhanov S, Li Y, Itabe H, et al. A redox-sensitive pathway mediates oxidized LDL-induced downregulation of insulin-like growth factor-1 receptor. *J Lipid Res* 2005; 46: 1266–77.

Hirano T, Ito Y, Yoshino G. Measurement of small dense low-density lipoprotein particles. *J Atheroscler Thromb* 2005; 12 (2): 67-72.

Holven KB, Myhre AM, Aukrust P, Hagve TA, Ose L, Nenseter MS. Patients with familial hypercholesterolaemia show enhanced spontaneous chemokine release from peripheral blood mononuclear cells ex vivo. Dependency of xanthomas/xanthelasms, smoking and gender. *Eur Heart J* 2003; 24: 1756–62.

Jessup W, Kritharides L, Stocker R. Lipid oxidation in atherogenesis: an overview. *Biochem Soc Trans* 2004; 32: 134-8.

Johnson RJ, Kang DH, Feig D, Kivlighn S, Kanellis J, Watanabe S, et al. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *Hypertension* 2003; 41(6): 1183-90.

Kanellis J, Watanabe S, Li JH, Kang DH, Li P.; Nakagawa T, et al. Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2. *Hypertension* 2003; 41(6): 1287-1293.

Klouché M, Gottschling S, Gerl V, Hell G, Husmann M, Dorweiler B, et al. Atherogenic properties of enzymatically degraded LDL selective induction of MCP-1 and cytotoxic effects on human macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1376-85.

Klouché M, Rose-John S, Schmiedt W, Bhakdi S. Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth cell activation, foam cell transformation, and proliferation. *Circulation* 2000; 101: 1799-805.

Knight JA. Free radicals and atherosclerosis. In Knight JA .Free radicals, antioxidants, aging, and disease. USA, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 1999. p.75-110.

Kodama T, Pranhitha R, Kishimoto C, Krieger M. Purification and characterization of a bovine acetyl low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:9238-42.

Kume N, Murase T, Moriwaki H, Aoyama T, Sawamura T, Masaki T, et al. Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Cir Res* 1998; 83(3): 322-7.

Lee KWJ, Hill JS, Walley KR, Frohlich JJ. Relative value of multiple plasma biomarkers as risk factors for coronary artery disease and death in an angiography cohort. *CMAJ* 2006; 174: 461-6.

Lemos JA, Morrow DA, Sabatine MS, Murphy SA, Gibson CM, Antman EM, et al. Association Between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003; 107: 690-5.

- Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Wilson TM, Palinski W, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 2000; 106(4): 523-31.
- Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *Journal of Internal Medicine* 2000; 247: 349-58.
- Li D, Mehta JL. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation* 2000; 101: 2889-95.
- Lubrano V, Cocci F, Battaglia D, Papa A.; Manaccini P, Zucchelli GC. Usefulness of high-sensitivity IL-6 measurement of clinical characterization of patients with coronary artery disease. *J Clin Lab Anal* 2005; 19: 110-4.
- Mach F, A Sauty A, Larossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P et al. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest* 1999; 104: 1041–50.
- Mahley RW, Weisgraber KH, Farese RV JR. Disorders of lipid metabolism. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR. *Williams textbook of endocrinology*. 9.ed. USA. W.B. Saunders Company; 1998. p.1099-153.
- Maruyama C, Imamura K, Teramoto T. Assesment of LDL particle size by triglyceride/HDL-cholesterol ratio in non-diabetic, healthy subjects without prominent hyperlipidemia. *J Atheroscler Thromb* 2003; 10(3): 186-191.
- Mellin M, Isabelle M, Oudot A, Vergely-Vandriesse C, Monteil C, Di Meglio B, et al. Transient reduction in myocardial free oxygen radical levels is involved in the improved cardiac function and structure after long-term allopurinol treatment initiated in established chronic heart failure. *Eur Heart J* 2005; 26: 1544–50.
- Mehra VC, Ramgolam VS, Bender JR. Cytokines and cardiovascular disease. *J Leukoc Biol* 2005; 78:805-18.
- Mitchinson MJ, Hardwick SJ, Bennett MR. Cell death in atherosclerotic plaques. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7(5): 324-9.

Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(12): 4196-200.

Motulsky AG. Genetic aspects of familial hypercholesterolemia and its diagnosis. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 13-17.

Nakajima K, Nakano T, Tanaka A. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: the comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clin Chim Acta* 2006; 367:36-47.

Napoli C. Oxidation of LDL, atherogenesis, and apoptosis. *Ann NY Acad. Sci* 2003; 1010: 698-709.

National Cholesterol Education Program. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program. Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285(19): 2486-97.

Ng DS, Hegele RA. High-density-lipoprotein cholesterol and atherosclerosis. *CMAJ* 1993; 149: 1807-8.

Nijm J, Wikby A, Tompa A, Olsson AG, Jonasson L. Circulating levels of proinflammatory cytokines and neutrophil-platelet aggregates in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2005; 95:452–56.

Nicholls G, Fergunson SJ. Respiratory chain. In: Nicholls G, Fergunson SJ. *Bioenergetics 3*. Second edition. London: Academic Press Elsevier; 2002_a. p.89-154.

Nicholls G, Fergunson SJ. Mitochondria in the cell. In: Nicholls G, Fergunson SJ. *Bioenergetics 3*. Second edition. London: Academic Press Elsevier; 2002_b. p.250-70.

Oliveira HCF, Cosso RG, Alberici LC, Maciel EN, Saleno AG, Dorighello GG, et al. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. *FASEB J* 2005; 19(2): 278-80.

Oliveira RTD. Expressão de citocinas, quimiocinas e seus receptores em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com doença arterial coronariana [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2006.

Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000; 117: 1162-72.

Ou H-C, Chou F-P, Sheen H-M, Lin T-M, Yang C-H, Sheu WH-H. Resveratrol, a polyphenolic compound in red wine, protects against oxidized LDL-induced cytotoxicity in endothelial cells. *Clin Chim Acta* 2006; 364(1-2): 196-204.

Parthasarathy S, Printz DJ, Boyd D, Joy L, Steinberg D. Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis* 1986; 6(5):505-10.

Pasceri V, Chang BS, Willerson JT, Yeh ETH. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation* 2001; 103: 2531-4.

Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, III Cannon RO, Criqui M, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease application to clinical and public health practice a statement for healthcare professional from the centers for disease control and prevent and the American Heart Association. *Circulation* 2003; 107: 499-511.

Rajavashisth TR, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low density lipoproteins. *Nature* 1990; 344: 254-57.

Reaven G. Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. *Circulation* 2002; 106: 286-8.

Rifai N, Bashorick PS, Albers JA. Lipids, lipoproteins, and apolipoprotein. In: Burtis CA, Ashwood CA. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd USA, W.B. Saunders Company; 1999. p.809-61.

Rinaldi M, Moroni P, Paape MJ, Bannerman DD. Evaluation of assays for the measurement bovine neutrophil reactive oxygen species. *Vet Immunopathol* 2006; 115: 107-25.

Robbesyn F, Garcia V, Auge N, Vieira O, Frisach M-F, Salvayre R, et al. A. HDL counterbalance the proinflammatory effect of oxidized LDL by inhibiting intracellular reactive oxygen species rise, proteasome activation, and subsequent NF-kB activation in smooth muscle cells. *FASEB J* 2003; 17(6): 743-5.

Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Yuichi A, et.al. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature*, 1997. 386: 73-7.

Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA. A modern view of atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1993; 7: 9B-14B.

Sesnilo G, Miller KK, Hayden D, Klibanski A. Inflammatory Cardiovascular Risk Markers in Women with Hypopituitarism. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5774–81.

Shanmugam N, Ransohoff' RM, Natarajan R. Interferon-gamma -inducible protein-10 mRNA stabilized by RNA binding proteins in monocytes treated with S100b. *J Bio Chem* 2006; <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M602445200>.

Spence JD, Barnett PA, Bulman DE, Hegele AR. An approach to ascertain probands with a non-traditional risk factor for carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999; 144: 429–34.

Steinberg D, Parthasaraty S, Crew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989, 320: 915-24.

Stocker R, Keaney-Jr JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; (84): 1381-478.

Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin-6 as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor. *Blood* 1994; 83: 113-8.

Torzewski M, Rist C, Mortensen RF, Zwaka TP, Bienek M, Waltenberger J. C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2094-9.

Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998; 101: 311-20.

Yang X, Chu Y, Wang Y, Zhang R, Xiong S. Targeted in vivo expression of IFN- γ -inducible protein 10 induces specific antitumor activity. *Leukoc Biol*. 2006; DOI:10.1189/jlb.0306212

Yao PM, Tabas I. Free Cholesterol Loading of Macrophages Induces Apoptosis Involving the Fas Pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 23807-13.

Yao PM, Tabas I. Free Cholesterol Loading of Macrophages Is Associated with Widespread Mitochondrial Dysfunction and Activation of the Mitochondrial Apoptosis Pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 42468-76.

Yoshino G, Hirano T, Kazumi T, Takemoto M, Ohashi N. Fluvastatin increases LDL particle size and reduces oxidative stress in patients with hyperlipidemia. *J Atheroscler Thromb* 2003; 10: 343-7.

Wang CH, Li SH, Weisel RD, Fedak PW, Dumont AS, Szmitko P, et al. C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation* 2003; 107: 1783-90.

Wang JS, Lee T, Chow SE. Role of exercise intensities in oxidized low-density lipoprotein-mediated redox status of monocyte in men. *J Appl Physiol* 2006; 101: 740-4.

Zhao R, Shen GX. Functional modulation of antioxidant enzymes in vascular endothelial cells by glycated LDL. *Atherosclerosis* 2005; (179): 277–84.

Zmijewski JW, Moellering DR, Goffe CL, Landar A, Ramachandran A, Darley-Usmar, VM. Oxidized low density lipoprotein induces mitochondrially associated reactive oxygen/nitrogen species formation in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289(2): H852-61.

Zwaka TP, Hombach V, Torzewsk J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation* 2001; 103(9): 1194-7.