

PAOLLA FERNANDA CEZAR FERREIRA

**MODIFICAÇÕES OXIDATIVAS DE LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA
DENSIDADE E SEUS ANTICORPOS: ASSOCIAÇÃO COM COMPONENTES
DO TRANSPORTE REVERSO DE COLESTEROL E COM A
ATEROSCLEROSE CAROTÍDEA EM ADULTOS SEM DOENÇA
ATEROSCLERÓTICA ESTABELECIDADA**

CAMPINAS

UNICAMP

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

**MODIFICAÇÕES OXIDATIVAS DE LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA
DENSIDADE E SEUS ANTICORPOS: ASSOCIAÇÃO COM COMPONENTES
DO TRANSPORTE REVERSO DE COLESTEROL E COM A
ATEROSCLEROSE CAROTÍDEA EM ADULTOS SEM DOENÇA
ATEROSCLERÓTICA ESTABELECIDADA**

Paolla Fernanda Cezar Ferreira

Dissertação apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas, na área de concentração Ciências Biomédicas.

CAMPINAS

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652 - BIBLIOTECA DA FACULDADE
DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

F413m Ferreira, Paolla Fernanda Cezar, 1984 -
Modificações oxidativas de lipoproteínas de baixa
densidade e seus anticorpos: associação com
componentes do transporte reverso de colesterol e com
a aterosclerose carotídea em adultos sem doença
aterosclerótica estabelecida. / Paolla Fernanda Cezar
Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Eliana Cotta de Faria
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Aterosclerose. 2. Lipoproteínas. 3. Auto-
anticorpos. 4. Artérias carótidas. I. Faria, Eliana Cotta
de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Oxidative modification of plasma low density lipoproteins and their
antibodies: association with the reverse cholesterol transport and carotid atherosclerosis
in adults without established atherosclerotic disease

Palavra-chave em inglês:

Atherosclerosis

Lipoproteins

Auto-antibodies

Carotid arteries

Área de Concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Eliana Cotta de Faria [Orientador]

Valéria Sutti Nunes

Andrei Carvalho Sposito

Data da defesa: 26-05-2011

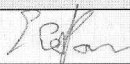
Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado
Paolla Fernanda Cezar Ferreira

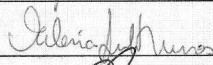
Orientador(a): Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria

Membros:

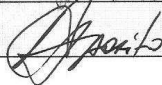
1. Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria -



2. Profa. Dra. Valéria Sutti Nunes -



3. Prof. Dr. Andrei Carvalho Sposito -



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

Data: 26/05/2011

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Magali, que sempre foi meu orgulho, exemplo de vida e minha fonte de incentivo. Obrigada por acreditar em mim e pelo carinho e amor incondicional, que me confortaram nos momentos mais difíceis.

Ao meu pai, Aparecido, pelo amor, apoio e confiança de sempre.

Ao meu irmão, Bruno, pela colaboração e por ser meu verdadeiro amigo e companheiro.

Ao meu amado Júnior, pelo carinho, amor, incentivo, companheirismo e conversas de apoio durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria, minha orientadora, por ter dedicado à mim horas preciosas. Obrigada pela oportunidade, pela confiança e ensinamentos valiosos. Você é com certeza um exemplo de dedicação e amor à ciência.

À Profa. Dra. Lúcia Nassi Castilho, de quem fui aluna especial para realização da disciplina TCC (Trabalho de Conclusão de Curso), a quem devo ser grata pela oportunidade e por abrir as portas para realização da pós-graduação. Obrigada pelo incentivo, confiança e amizade.

À toda equipe da Seção de Bioquímica Clínica do Hospital das Clínicas (HC/UNICAMP), do Departamento de Patologia Clínica e do Laboratório de Lípidos (NMCE) que, direta ou indiretamente, me ajudaram na execução deste trabalho, especialmente à Cidinha, Miriam e Regina.

Ao Setor de Estatística da Faculdade de Ciências Médicas pela atenção e auxílio nas análises estatísticas deste trabalho.

Aos voluntários, que generosamente aceitaram participar deste trabalho e à todos os envolvidos na seleção, convocação e coleta do material.

À Vanessa, pela amizade ao longo desses anos, pela bondade em ajudar sempre que necessitei, pela palavra amiga e positiva, por me apoiar sempre.

À Eliane, pela amizade, companheirismo, dedicação e empenho, por estar sempre disposta a ajudar.

À Natália, pela amizade, apoio e disposição e por me ajudar e ensinar tudo o que aprendeu no laboratório.

À Luiza, Fernanda e Aline, pela agradável companhia do meu dia-a-dia e pela disposição nas horas em que precisei.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Lípidos, pelo apoio e amizade.

Às grandes amigas Bruna, Elaine, Flávia, Débora e Kátia pela amizade sincera e valiosa, por inúmeras conversas terapêuticas e momentos de diversão.

À minha família, pela paciência, confiança, respeito e apoio.

À todos os amigos e colegas não citados, que de alguma forma contribuíram significativamente para a realização deste trabalho.

Obrigada à todos!

*"Aprenda como se fosse viver para sempre;
Viva como se fosse morrer amanhã"*

Gandhi

	<i>Página</i>
RESUMO.....	XXIII
ABSTRACT.....	XXVII
1. INTRODUÇÃO.....	31
1.1 Aterosclerose.....	33
1.2 Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL)	35
1.2.1 Oxidação da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDLox).....	36
1.3 Anticorpos Anti-LDL oxidada (acLDLox) e Imunocomplexos (IC).....	45
1.4 Outras Modificações Químicas da LDL.....	59
1.5 Proteínas Reguladoras do Metabolismo lipídico, sua relação com LDLox e sua resposta imunológica.....	60
1.6 Espessura do Complexo Íntimo-Medial das artérias carótidas (EIM).....	63
2. OBJETIVOS.....	67
2.1 Geral.....	69
2.2 Específicos.....	69
3. MATERIAS E MÉTODOS.....	71
3.1 População do Estudo.....	73
3.2 Análises Laboratoriais.....	74
3.3 Determinação do Marcador de Oxidação: LDL oxidada.....	74
3.4 Determinação do Marcador Imunológico: Anticorpos Anti-LDL oxidada.....	75
3.5 Determinação das atividades de LH, LPL, CETP e PLTP.....	75

3.6 Determinação da Espessura íntimo-medial das artérias carótidas.....	77
3.7 Análises estatísticas.....	77
4. RESULTADOS.....	79
5. DISCUSSÃO GERAL.....	89
6. CONCLUSÃO.....	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
8. ANEXOS.....	119
Anexo 1: Aprovação Comitê de Ética.....	121
Anexo 2: Manuscrito 1.....	123
Anexo 3: Banco de Dados.....	151

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA1 - transportadores de membrana do tipo ATP-“Binding Cassette” (ABC), sub-família A1

aboxLDL - autoanticorpos anti LDL oxidada

acLDLox - autoanticorpos anti LDL oxidada

AE - angina estável

AGPI - ácidos graxos poliinsaturados

AI - angina instável

apoAI - apolipoproteína AI

apoB100 - apolipoproteína B100

apoE - apolipoproteína E

AVC - acidente vascular cerebral

CuSO₄ -- íons cobre

BMI - Índice de massa corpórea

B/E - receptores da lipoproteína de baixa densidade

C - colesterol

CC - circunferência da cintura

CE - colesterol ésteres ou ésteres de colesterol

CETP - proteína de transferência de colesterol éster

cGMP - guanosina monofosfato cíclica

CL - colesterol livre

DAC - doença arterial coronariana

DCV - doença cardiovascular

DM - diabetes mellitus

cEIM - espessura do complexo íntimo-medial de carótidas

ERO - espécie reativa de oxigênio

ERN - espécie reativa de nitrogênio

FL - fosfolípidos

HDL - lipoproteína de alta densidade

HDL₂ - sub-fração 2 de lipoproteína de alta densidade

HDL₃ - sub-fração 3 de lipoproteína de alta densidade

HF - hipercolesterolemia familiar

IAM - infarto agudo do miocárdio

ICAM-1 - molécula de adesão intercelular-1

IDL - lipoproteína de densidade intermediária

IgG - imunoglobulina G
IgG2 - imunoglobulina G subclasse 2
IgM - imunoglobulina M
IL-1 β - interleucina-1 β
IL-4 - interleucina-4
IL-6 - interleucina-6
IMC - índice de massa corpórea
LCAT - lecitina: colesterol acil-transferase
LDL - lipoproteína de baixa densidade
LDL(-) - lipoproteína de baixa densidade eletronegativa
LDL₁ - sub-fração 1 de lipoproteína de baixa densidade
LDL₂ - sub-fração 2 de lipoproteína de baixa densidade
LDL₃ - sub-fração 3 de lipoproteína de baixa densidade
LDLac - lipoproteína de baixa densidade acetilada
LDLag - lipoproteína de baixa densidade agregada
LDLgli - lipoproteína de baixa densidade glicada
LDLmet - lipoproteína de baixa densidade metilada
LDLmm - lipoproteína de baixa densidade minimamente modificada
LDLox - lipoproteína de baixa densidade oxidada
LES - lúpus eritematoso sistêmico
LH - lipase hepática
Lp(a) - lipoproteína (a)
LPL - lipoproteína lipase
LPO - peroxidação lipídica
LO $\cdot$ - radical alcoxila
LOO $\cdot$ - radical peroxila
LOOH - hidroperóxidos lipídicos
MCP-1 - proteína quimioatrativa de monócitos-1
MDA - malondialdeído
NF- κ B - fator nuclear Kappa de células B ativadas
NO - óxido nítrico
O $_2^{\cdot-}$ - radicais superperóxido
OH $\cdot$ - hidroxila
OMS - Organização Mundial da Saúde
p - valor de probabilidade
PA - pressão arterial

PAD - pressão arterial diastólica
PAF- AH - PAF-acetil-hidrolase
PAS - pressão arterial sistólica
PL - fosfolípidos
PLTP - proteína de transferência de fosfolípidos
PON - paraoxonase
RL - radicais livres
SAF - síndrome antifosfolipídica
SCA - síndrome coronariana aguda
SR - receptores scavengers
SR-A - receptores scavengers de classe A
SR-B1 - receptores scavengers de classe B tipo 1
SR-PSOX - receptores scavengers ligados à fosfatidilserina
LOX - receptor de LDLox semelhante à lectina 1
TRC - transporte reverso do colesterol
TG - triglicérides
VCAM-1 - molécula de adesão de célula vascular-1
VLDL - lipoproteína de densidade muito baixa
4- HNE - 4-hidroxinonenal
β2-GPI - beta (2)-glicoproteína I

LISTA DE TABELAS

		<i>Página</i>
Tabela 1	Estudos clínicos dos últimos 5 anos envolvendo LDLox, títulos de anticorpos anti-LDL oxidada, imunocomplexos e aterosclerose	57
Tabela 2	Características clínicas da população total estudada e por tercís de acLDLox e LDLox	81
Tabela 3	Lípides, Lipoproteínas, Apolipoproteínas, Lipases e atividades proteínas de transferência dos anticorpos anti-LDL oxidada e LDL oxidada na população total e por tercís de acLDLox e LDLox	82
Tabela 4	Anticorpos anti-LDL oxidada, LDL oxidada, razões LDLox/apoB100 e LDLox/LDL-C na população total e por tercís de acLDLox e LDLox	83
Tabela 5	Coeficientes parciais de correlação de Spearman para acLDLox, LDLox, razões LDLox/apoB100 e LDLox/LDL-C com variáveis bioquímicas, lipases e proteínas de transferência na população total	84
Tabela 6	Análise de regressão multivariada para acLDLox, LDLox, razões LDLox/apoB100 e LDLox/LDL-C na população total	85
Tabela 7	Espessura da artéria carótida comum na população total e por tercís de acLDLox e LDLox	86

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Eventos iniciais do desenvolvimento da placa aterosclerótica 44
Figura 2	Correlações parciais entre EIM média com acLDLox, LDLox, razões LDLox/apoB100 e LDLox/LDL-C na população total 87

RESUMO

A doença cardiovascular (DCV) é a causa mais comum de morte nas sociedades ocidentais, afetando ambos os sexos, sendo a aterosclerose a mais importante patologia subjacente. A aterosclerose é aceita mundialmente como uma doença imune-inflamatória, na qual, a participação do sistema imunológico é crucial para o início da disfunção endotelial, formação da estria gordurosa, progressão da lesão e ruptura da placa. A modificação oxidativa das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), é considerada essencial no processo aterosclerótico, gerando LDL oxidadas (LDLox), que possuem propriedades quimiotáticas e imunogênicas, levando à formação de anticorpos (acLDLox). É fundamental o conhecimento das repercussões metabólicas e ateroscleróticas da LDLox e seus anticorpos no plasma de adultos assintomáticos. Os objetivos deste estudo foram determinar a ação aterogênica da LDLox e dos acLDLox e seus determinantes metabólicos e antropométricos. Foram selecionados 107 indivíduos e classificados em tercís de acordo com os níveis de LDLox e acLDLox. As análises bioquímicas foram realizadas por métodos enzimáticos-colorimétricos, nefelométricos e radiométricos (CETP, PLTP, LH e LPL). A LDLox plasmática foi determinada por ELISA (Mercodia) e os acLDLox contra a LDL inteira, utilizou LDL altamente oxidada. A medida da EIM foi realizada através da ultrassonografia Doppler. Verificamos uma redução na atividade da LH no maior tercil de acLDLox, além de uma tendência no aumento da EIM ($p \leq 0.068$). O maior tercil de LDLox apresentou maiores concentrações de C, LDL-C e apoB100 ($p \leq 0.001$), porém redução na atividade da CETP ($p \leq 0.029$) e maior EIM ($p \leq 0.003$). Observamos correlação significativa ($p = 0,041$) entre acLDLox e EIM independente de LDLox ou correlação entre LDLox e EIM independente de acLDLox. Correlações similares com EIM entre acLDLox, LDLox, LDLox/apoB100 e LDLox/LDL-C foram encontradas. Os títulos séricos de acLDLox e provavelmente a sua presença na lesão foram independentes das concentrações de LDLox. Nas análises multivariadas, observamos que a apoA1 mostrou-se preditora de acLDLox ($R^2 = 3.98$), e para LDLox apoB100 ($R^2 = 23,49$), e CETP ($R^2 = 1,99$), e PLTP ($R^2 = 1,78$). O comportamento menos aterogênico e a explicação destes biomarcadores por componentes do TRC, mostraram-se coerentes com a atenuação da aterosclerose carotídea observada em indivíduos com maiores títulos de anticorpos. Entretanto, sua semelhança com a LDLox quanto à correlação com a EIM e EIM máxima igual, revelam duplo comportamento com relação à aterosclerose. Este trabalho estimula novas investigações para a elucidação dos mecanismos envolvidos na aterogenicidade destes biomarcadores em adultos assintomáticos e em estados patológicos.

ABSTRACT

Cardiovascular disease (DCV) is the most common cause of death on western societies, affecting both sexes, with atherosclerosis being the most important underlying pathology. Atherosclerosis is accepted worldwide as an immune-inflammatory disease, in which the participation of the immune system is crucial for the beginning of endothelial dysfunction, fatty streak formation, progression of lesion and plaque rupture. The oxidative modification of low density lipoproteins (LDL) is an essential step on the atherosclerotic process, generating oxidized LDL particles (oxLDL), which have chemotactic, cytotoxic and immunogenic properties, leading to the formation of specific antibodies (aboxLDL). Thus, it is very important to understand the metabolic and atherosclerotic repercussions of plasma oxLDL and their antibodies on asymptomatic adults. The aims of this study were to determine the atherogenic effects of oxLDL and aboxLDL and their metabolic and anthropometric determinants. For this study, 107 adult individuals were selected, who were classified in tertiles according to serum values of oxLDL and aboxLDL. The biochemical parameters were analyzed through enzymatic-colorimetric, nephelometric and radiometric methods (CETP, PLTP, LH e LPL). The plasma oxLDL was determined using ELISA (Mercodia) and aboxLDL against full LDL using highly oxidized LDL. EIM was measured by Doppler ultrasonography. We observed a reduction on LH activity on the higher tertile of aboxLDL and a borderline increase on EIM ($p \leq 0.068$). The higher oxLDL tertile presented higher concentrations of C, LDL and apoB100 ($p \leq 0.001$), but also presented reduction on CETP activity ($p \leq 0.029$) and higher cIMT ($p \leq 0.003$). We observed significant correlation ($p = 0.041$) between aboxLDL and cIMT independent of oxLDL or correlation between oxLDL and cIMT independent of aboxLDL. Similar correlations with cIMT between aboxLDL, oxLDL, oxLDL/apoB100 and oxLDL/LDL-C were observed. Serum titres of aboxLDL and probably its presence in the lesion were independent of concentrations of oxLDL. Multivariate regression analysis revealed apoA1 as a predictor of aboxLDL ($R^2 = 3.98$), and for oxLDL, the predictors were apoB100 ($R^2 = 23.49$), CETP ($R^2 = 1.99$), and PLTP ($R^2 = 1.78$). The behavior and less atherogenic explanation of these biomarkers by components of the TRC were consistent with the attenuation of carotid atherosclerosis observed in individuals with higher levels of antibodies. However, its similarity to oxLDL marker regarding the association with cIMT and its maximum value reveal a double behavior of aboxLDL regarding atherosclerosis. This study encourages further investigations to elucidate the mechanisms involved in the atherogenicity of these biomarkers in asymptomatic adults and in pathological states.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aterosclerose

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2010), estima-se que até 2030, cerca de 23,6 milhões de pessoas no mundo irão morrer em consequência de doenças cardiovasculares. A doença arterial coronariana (DAC) possui elevado índice de mortalidade no mundo e no Brasil, afetando tanto homens como mulheres (OMS, 2010; Tsompanidi *et al*, 2010, Dahlof, 2010), sendo a aterosclerose a mais importante patologia subjacente (Wick *et al*, 2001; Park *et al*, 2009; Perdomo e Dong, 2009; Mizuno *et al*, 2011).

No Brasil, ocorrem aproximadamente 300 mil óbitos/ano, causados por doenças cardiovasculares associadas à arterosclerose. Dados ainda mais alarmantes são encontrados nos Estados Unidos, onde as doenças cardiovasculares são responsáveis por cerca de 80% das mortes de pessoas acima de 65 anos (Girollo *et al*, 2007).

Estudos populacionais prospectivos apontam como principais fatores de risco para a aterosclerose a idade, o gênero e a predisposição genética, esses, classificados como constitucionais. Entretanto, fatores como dislipidemias, hipertensão arterial, obesidade, composição da dieta, sedentarismo, tabagismo e o diabetes mellitus (DM) tem grande influência na patogênese da doença aterosclerótica (Mozaffarian *et al*, 2008; Perk, 2009). Esses fatores isolados ou em combinação podem acelerar a progressão da aterosclerose e o desenvolvimento da DAC (Perdomo e Dong, 2009).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, progressiva, de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial (Hansson e Hermansson, 2011). Acomete principalmente a camada íntima da parede de artérias de médio e grande calibre, sendo caracterizada pelo acúmulo de lipídios e elementos fibróticos na íntima arterial (Park *et al*, 2009; Maa *et al*, 2009), o que causa espessamento da parede arterial, redução da elasticidade e do suprimento sanguíneo. Por diferenças na dinâmica do fluxo sanguíneo, há locais predispostos para a formação das lesões. Os vasos sanguíneos mais comumente afetados e clinicamente relevantes incluem as artérias aorta, as coronárias, carótidas e artérias cerebrais (Perdomo e Dong, 2009).

Várias são as hipóteses que explicam os processos associados ao desenvolvimento da aterosclerose. A hipótese da resposta à lesão aponta a lesão do endotélio vascular como evento inicial do processo aterosclerótico. Em contraste, a teoria da resposta à retenção coloca as interações entre as lipoproteínas e a matriz endotelial como o ponto crítico da aterosclerose, enquanto que a hipótese da

modificação oxidativa ressalta a importância da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) como o principal fator desencadeante da doença. Embora divergentes estas teorias sugerem mecanismos para explicar a aterosclerose, e alguns pontos comuns entre elas são o envolvimento da inflamação e da LDL como partícula central no processo (Stocker e Keaney, 2004).

A disfunção endotelial é o evento inicial do desenvolvimento da aterosclerose (Victor *et al*, 2009; Libby *et al*, 2009). O endotélio vascular desempenha um papel ativo na regulação do fluxo sanguíneo, reações de coagulação, ativação plaquetária, adesão leucocitária, função muscular e vascular (Bahia *et al*, 2006). Estes efeitos são mediados por uma variedade de moléculas em células endoteliais, que incluem o óxido nítrico (NO), prostaciclina, ativadores de plasminogênio e trombosmodulina, entre outros (Amorin *et al*, 2011).

Por definição, a disfunção endotelial compromete a vasodilatação dependente do endotélio. Na presença de fatores de risco para doença cardiovascular o endotélio disfuncional promove o aumento da susceptibilidade à permeabilidade às lipoproteínas plasmáticas, redução na produção de fatores vasodilatadores e aumento da adesão de leucócitos causando um desequilíbrio local de fatores pró e antitrombóticos, e estimuladores e inibidores de crescimento celular (Hansson, 2005).

Um dos mecanismos definitivos resultantes da disfunção endotelial é redução da biodisponibilidade do NO com o conseqüente impedimento das vasodilatações derivadas do endotélio (Kawashima *et al*, 2004; Versari, *et al*, 2009). Para Higashi *et al* (2009), a diminuição da biodisponibilidade de NO pode ocorrer tanto através da diminuição de sua produção quanto pelo aumento de sua inativação, induzindo a disfunção endotelial. Células endoteliais lesadas podem promover a migração e proliferação de células do músculo liso do vaso, liberando menos NO.

O NO é um potente vasodilatador que ativa a adenilato ciclase solúvel no músculo vascular, resultando em acúmulo de cGMP (guanosina monofosfato cíclica) e relaxamento local (Amorin *et al*, 2011). Além disso, está diretamente relacionado à prevenção da oxidação de lipoproteínas, é um regulador de mediadores inflamatórios, previne a adesão de monócitos ao endotélio e controla a expressão de proteínas envolvidas na aterogênese, além de inibir a proliferação e migração das células da musculatura lisa (Vanhoutte *et al*, 2008). A diminuição da biodisponibilidade de NO pode contribuir para a trombose e aterosclerose (Vanhoutte *et al*, 2008; Odeberg *et al*, 2008; Amorin *et al*, 2011).

Células imuno competentes tais como monócitos/macrófagos e linfócitos T e B e proteínas do sistema imunológico são encontradas em todos os estágios da lesão

aterosclerótica (Ohashi *et al*, 2004; Hansson *et al*, 2006; Hansson e Hermansson, 2011). Além das células do sistema imune, múltiplas vias de sinalização são responsáveis pela coordenação da resposta imune e parecem estar ativadas na aterosclerose em todas as fases do processo.

Portanto, o processo inflamatório é precoce e as lesões têm início na primeira década de vida, estando associado à interação de fatores genéticos e ambientais. Devido à sua lenta e progressiva evolução, suas complicações aparecem acentuadamente após a terceira década de vida.

1.2. Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL)

As LDL constituem um grupo heterogêneo de lipoproteínas com diferentes tamanhos, densidades, cargas e composição química, sendo responsáveis pelo transporte de colesterol plasmático aos tecidos periféricos. As LDL surgem do catabolismo das IDL (lipoproteínas de densidade intermediária) no plasma, e é constituída por ésteres de colesterol (29% da massa total), fosfolípides (28%), proteína (21%), colesterol livre (11%) e triglicérides (9%) (Itabe, 1998). A LDL corresponde cerca de 50% do total das lipoproteínas plasmáticas (Mahley *et al*, 2003). Sua principal apolipoproteína é a apoB100, mas também possui traços de apoE (Itabe, 1998; Mahley *et al*, 2003; Fitzgerald *et al*, 2010). Possui densidade entre 1,019-1,063 g/mL (Matsuura *et al*, 2006), sendo considerada a principal classe de lipoproteínas aterogênicas.

O acúmulo da LDL no plasma pode ocorrer por aumento de síntese endógena de colesterol e/ou diminuição do catabolismo da LDL pelo fígado. Estes processos são secundários às dislipidemias primárias, tais como hipercolesterolemia familiar (Hansson e Hermansson, 2011), hiperlipidemia familiar combinada (Masoura *et al*, 2011) e disbetalipoproteinemia (Smelt e Beer 2004) e à causas secundárias tais como dieta rica em colesterol ou gordura saturada e diversas patologias secundárias.

Mutações do receptor de LDL ou da apoB100 dificultam a captação celular da partícula, resultando na remoção plasmática deficiente da mesma e conseqüente aumento de sua concentração plasmática. Isso faz com que a LDL permaneça mais tempo na corrente sanguínea, aumentando a chance de ser quimicamente modificada (Ilan *et al*, 2010; Mendivil *et al*, 2010).

Por outro lado, uma porção da LDL plasmática pode atravessar o espaço entre as células endoteliais até o espaço subendotelial dos vasos, sendo removidas da

circulação geral (Matsuura *et al*, 2008) podendo se acumular no espaço da íntima arterial.

O principal fator responsável por esta retenção de lipoproteínas não está totalmente elucidado. Entretanto, acredita-se que características bioquímicas da LDL, tais como tamanho, carga e a composição química, estejam relacionadas com a susceptibilidade à retenção. Além disso, as subfrações de LDL mais densas (LDL₂ e LDL₃) tendem a permanecer na circulação sanguínea por mais tempo, e são mais suscetíveis às oxidações e outras modificações quando comparadas com a subfração de LDL menos densa (LDL₁) (de Graaf *et al*, 1991), o que favorece a captação pelos macrófagos, resultando na formação de lesões ateroscleróticas (Satoh *et al*, 2008).

Como consequência as partículas de LDL ficam propensas às modificações químicas, como a oxidação (LDLox) (Yoshida e Kisugi, 2010; Miller *et al*, 2010). Esse é um importante fator para início da aterosclerose precoce.

1.2.1. Oxidação da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDLox)

A oxidação da LDL confere a esta suas principais características aterogênicas (Libby *et al*, 2009; Sigala *et al*, 2010; Hansson e Hermansson, 2011) onde os componentes lipídicos e proteicos da LDL modificada são os principais responsáveis pelo início da resposta inflamatória (Stocker, 1994) podendo gerar substâncias capazes de danificar as células endoteliais e iniciar a lesão (Sigala *et al*, 2010).

Após a internalização da LDL no espaço sub-intimal essas lipoproteínas sofrem modificações químicas e enzimáticas, que ativam as células endoteliais para o recrutamento de moléculas de adesão (Hansson e Hermansson, 2011). Várias moléculas de adesão vêm sendo investigadas como fundamentais nesse processo, dentre elas a molécula de adesão de célula vascular-1 (VCAM-1) e molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1). A expressão de moléculas de adesão é induzida por citocinas sintetizadas em pequenas concentrações pelo endotélio arterial, tais como interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-18, mas também por angiotensina II. Na vigência de disfunção endotelial, as concentrações destas citocinas se elevam, estimulando a produção de moléculas de adesão, assim favorecendo o recrutamento e adesão de monócitos à superfície endotelial (Libby *et al*, 2009).

A oxidação é um dos processos de modificação mais estudados, podendo ocorrer tanto *in vitro* como em *in vivo*, apresentando características diferentes das LDL

nativas, o que as tornam ainda mais aterogênicas (Gleissner *et al*, 2007) tanto em modelos animais, como em humanos (Siqueira *et al*, 2006).

In vitro, a LDLox pode ser reproduzida após a indução da peroxidação lipídica por azoindicadores radicalares lipossolúveis, hidrossolúveis ou, mais comumente pelos íons cobre (CuSO_4), os quais funcionam como catalisadores de decomposição de lipoperóxidos, reduzindo os hidroperóxidos lipídicos pré-formados dos ácidos graxos presentes na lipoproteína, gerando o radical alcoxila ($\text{LO}\cdot$).

O processo de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) em sua fase de iniciação começa pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado e propagada por radicais peroxilas. Resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e aldeídos, tais como o malondialdeído (MDA), 4-hidroxinonenal (4-HNE) e isoprostanos, que são subprodutos tóxicos. Esses produtos podem ser detectados em amostras biológicas, e podem servir como marcadores do processo de oxidação e utilizados para avaliar o estresse oxidativo. A peroxidação lipídica é um dos mecanismos envolvidos na conversão da LDL nas formas oxidadas (Matsuura *et al*, 2006). Na fase de propagação, os radicais alcoxila e peroxila ($\text{LOO}\cdot$) inicialmente formados interagem com outras moléculas de ácidos graxos polinsaturados oxidando-as. A propagação das reações em cadeia de lipoperoxidação é proporcional à quantidade de ácidos graxos insaturados da LDL. Na fase de terminação, etapa em que ocorre a reação entre $\text{LO}\cdot$ e $\text{LOO}\cdot$ formam-se produtos não-radicalares. Esta fase é caracterizada por uma concentração constante de dienos conjugados, seguida da decomposição em aldeídos, como o MDA finalizando o processo de lipoperoxidação (Zarev *et al*, 2003).

In vivo, a LDL pode ser oxidada por diferentes mecanismos, entretanto ainda não está claro qual seria o mecanismo mais importante. A modificação oxidativa da LDL *in vivo* parece ocorrer em dois estágios. O primeiro deles ocorre antes da ativação dos monócitos, resultando na oxidação dos lípidos da LDL, com pequena alteração na parte protéica da partícula (LDL minimamente oxidada ou LDLmm). No entanto, as LDLmm possuem várias propriedades pró-aterogênicas (Matsuura *et al*, 2006). O segundo estágio tem início após a ativação dos monócitos e conseqüente conversão em macrófagos, o que contribui para sua grande capacidade oxidativa. Dependendo do grau de oxidação, ocorre modificação da apoB100, por oxidação direta ou por reagir com os produtos resultantes da oxidação lipídica.

A apoB100 é modificada pela oxidação através de duas vias: há cisão oxidativa direta de ligações peptídicas (Fong *et al* 1987) e alguns dos produtos da peroxidação lipídica reagem com os grupos amino livre de apoB100, formando adutos covalentes

(Sparrow *et al*, 1992). Estes adutos aumentam a carga negativa das partículas, que podem ser facilmente detectadas por eletroforese em gel de agarose (Henriksen *et al*, 1983). Mais importante ainda, é a presença destes adutos que favorecem o reconhecimento de LDL oxidada pelos receptores *scavenger* dos macrófagos (Steinbrecher *et al*, 1989), levando a sua captação e à formação de células espumosas *in vivo* (Steinberg *et al*, 1989).

Em condições de estresse oxidativo, são geradas espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), conhecidas genericamente como radicais livres (RL) (Hansson e Hermansson, 2011). ERO e ERN são os principais mediadores da modificação oxidativa da partícula, aumentando a produção e liberação de íons superóxido, levando assim a uma extensiva oxidação da LDL. A geração de RL ocorre como parte do processo fisiológico do metabolismo aeróbio celular, mas pode ser estimulado por fontes endógenas ou exógenas, ou por situações patológicas.

EROS, como exemplo os radicais superperóxido (O_2^-) e hidroxila ($OH^\cdot$), são produzidos por células endoteliais e macrófagos. Esses RL estão envolvidos em eventos patofisiológicos e levam à lesão tecidual e celular. O processo decorrente da ação de ERO e ERN sobre os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) presentes nas lipoproteínas favorece a peroxidação lipídica (Dayan *et al*, 2005).

Vários reativos intermediários, derivados das ERO e/ou ERN são conhecidos por mediar a modificação da LDL, como o peroxinitrito, que é o produto da reação entre NO e ânions superperóxido, e o MDA, produto da peroxidação lipídica. Esses produtos são potentes oxidantes, os quais modificam a LDL (Sigala *et al*, 2010). Além disso, a modificação oxidativa da LDL também pode estar associada com alterações na produção de NO vascular (Pinho *et al*, 2008).

A geração de EROS em células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos é essencial para a defesa do organismo, porém sua produção excessiva implica em uma variedade de doenças, como Alzheimer, câncer e aterosclerose.

Além das substâncias oxidantes, diversas enzimas proteolíticas e lipolíticas presentes na íntima arterial podem modificar a partícula de LDL. Diferentes proteases têm sido estudadas nesse processo, incluindo plasmina, calicreína, trombina, as quais podem induzir uma pequena fragmentação da apoB100. Enquanto que a tripsina, α -quimotripsina e pronase podem induzir uma degradação extensiva da apoB100, a qual pode resultar na formação de agregados e fusão das partículas de LDL (Piha *et al*, 1995). A fragmentação da apoB100 influencia a ligação com proteoglicanos, promovendo assim, a retenção da LDL na íntima arterial e contribuindo para a patogênese da aterosclerose (Pentikainen *et al*, 1997); a interação da LDL ocorre

através de interações iônicas, (Jawien *et al*, 2008; Tabas *et al*, 2007; Hansson e Hermansson; 2011). Esta ligação induz a formação de agregados aumentando a susceptibilidade ao processo oxidativo.

Entretanto, para que ocorra fusão das partículas, é necessária não apenas a fragmentação da apoB100, mas também a perda de fragmentos, a qual contribuirá para a perda da estabilidade de toda a partícula de LDL, alterando assim a sua hidrofobicidade, o que permitirá a fusão entre elas (Piha *et al*, 1995). Além disso, anticorpos que reagem contra fragmentos da LDL gerados após clivagem por tripsina, também mostraram reatividade contra epítopos presentes na íntima arterial (Torzewski *et al*, 1998).

Dessa forma, a fragmentação da apoB100 pela ação de enzimas pode induzir a liberação de alguns fragmentos protéicos, os quais podem interagir com as células desempenhando funções biológicas e/ou ativando o sistema imunológico. Entretanto, pouco se sabe a respeito das funções biológicas desses fragmentos

Com o processo de oxidação, ocorrem mudanças graduais nas propriedades físico-químicas da partícula, que podem variar de acordo com o tipo, concentração carga, tamanho, teor de lipídios e tempo de exposição ao agente oxidante (Jessup *et al*, 2002; Hansson e Hermansson, 2011) além de outras funções.

As modificações da LDL via oxidação não enzimática (aldeídos, cobre, peroxinitrito) ou via lipoxigenases e peroxidases aumentam a carga negativa das partículas de LDL e podem contribuir para a geração *in vivo* de uma subfração de LDL eletronegativa, denominada LDL(-).

A LDL(-) é encontrada predominantemente nas frações mais densas da LDL e apresenta maior conteúdo de hidroperóxidos lipídicos, óxidos de colesterol, lisofosfatidilcolina, dienos conjugados, aldeídos e ácidos graxos não-esterificados em comparação à LDL nativa, além da diminuição do conteúdo de antioxidantes lipossolúveis. LDL(-) apresenta-se elevada em indivíduos com alto risco cardiovascular, incluindo aqueles com dislipidemia (Benítez *et al*, 2004), diabetes mellitus (Apolinário *et al*, 2006), doença arterial coronariana (Oliveira *et al*, 2006), e os pacientes em hemodiálise (Lobo *et al*, 2008). Apesar de algumas semelhanças, LDL nativa, LDLox, e a LDL(-) possuem características distintas que provavelmente determinam os seus efeitos biológicos.

Dessa forma, em um processo extenso de oxidação, que chega a atingir lipídios do núcleo da lipoproteína e a parte protéica da partícula, ocorre um aumento de subprodutos tóxicos, que podem servir como marcadores do processo de oxidação (Stocker, 1994). A natureza exata de cada uma dessas alterações depende do agente

oxidante (Hansson e Hermansson, 2011). A LDL modificada por oxidação apresenta características diferentes das LDL nativas, como aumento da carga negativa, densidade e citotoxicidade, conteúdo elevado de lisolecitina, óxidos de colesterol e hidroperóxidos lipídicos e reduzido de ácidos graxos poliinsaturados, fragmentação da apoB100, maior atividade quimiotática para monócitos circulantes, menor taxa de captação através dos receptores B/E e aumento na captação pelos receptores *scavenger* dos macrófagos (Hansson e Hermansson, 2011).

A retenção das partículas de LDL, somada as modificações lipídicas e protéicas características de sua oxidação, promove a ativação e proliferação das células de músculo liso, a expressão de moléculas de citocinas pró-inflamatórias, à adesão em células endoteliais, a migração de linfócitos T e B para o espaço subendotelial assim como os monócitos que, por sua vez, se diferenciam em macrófagos - que através dos receptores *scavenger* captam a LDL modificada, resultando na formação das células espumosas.

A LDLox é quimiotática para monócitos por meio da regulação positiva de expressão dos genes para citocinas como o fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF) e a proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1) derivada de células endoteliais (Mizuno *et al*, 2011).

As modificações na LDL vêm sendo estudadas por vários enfoques metodológicos. Na maioria dos estudos em animais experimentais e em humanos, a oxidação da LDL é avaliada por métodos indiretos tais como a medida de dienos conjugados, modificação da mobilidade eletroforética, determinação de produtos da peroxidação lipídica, dosagem de hidroperóxidos lipídicos, de malondialdeído (MDA), de F2-Isoprostanos, de outros produtos de peroxidação lipídica.

Dentre estes métodos, a dosagem dos níveis séricos de MDA-LDL podem ser úteis para a identificação de pacientes com aterosclerose avançada (Tanaga *et al*, 2002). Também foi mostrado que as concentrações plasmáticas de MDA-LDL são elevadas em pacientes com síndrome coronariana aguda, por exemplo angina instável ou infarto agudo do miocárdio (IAM) (Holvoet *et al*, 1999).

Além disso, métodos imunológicos também são utilizados, através da determinação de autoanticorpos anti-LDLox (acLDLox). De fato, até recentemente os principais meios para acessar a oxidação da LDL *in vivo* têm sido a quantificação de autoanticorpos contra a LDLox e a LDLox por métodos imunológicos (Duarte *et al*, 2008).

As concentrações de LDLox não dependem somente do grau do estresse oxidativo, mas também da quantidade de substrato para oxidação, por exemplo o

número de partículas de LDL. De fato, concentrações de LDLox foram fortemente correlacionados com LDL e em muitos estudos (Meisinger *et al*, 2005; Tsuzura *et al*, 2004) tornando-se difícil distinguir suas contribuições separadas para as DCV. Portanto, para estabelecer um valor adicional para LDLox no risco cardiovascular, se faz necessário contabilizar o número de partículas. LDL e apoB100 têm sido usadas para esse propósito, mas seus méritos nunca foram comparados. Têm-se utilizado as razões LDLox/apoB100 e LDLox/LDL-C para medir o grau de oxidação das partículas de LDL, na intenção que essas razões sejam mais informativas quando comparadas à cada variável separadamente (Van der Zwan *et al*, 2009). Um estudo realizado por Wang *et al* (2007) demonstraram que a razão LDLox/LDL-C apresentou-se significativamente elevada em pacientes hiperlipidêmicos e hipertrigliceridêmicos.

A oxidação da LDL ocorre principalmente na parede vascular e, em menor proporção, na circulação (Ishigaki *et al*, 2009). Acredita-se que essa menor proporção seja em parte por causa das propriedades antioxidantes da HDL circulante. Embora a LDL oxidada represente uma pequena fração do total de LDL plasmática, observa-se forte relação entre LDL oxidadas circulantes e doença cardiovascular. Essas partículas induzem o estresse oxidativo em células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos, resultando na progressão da aterosclerose (Ishigaki *et al*, 2009).

Embora a LDL pouco modificada seja ainda reconhecida por seus receptores específicos (LDLr) ou B/E, cujas expressões são reguladas negativamente pela concentração de colesterol intracelular, a modificação extensa da proteína da LDL impede a captação por estes receptores, levando à alterações da carga total da superfície passando a ser reconhecida pelos receptores *scavengers* (SR) (Silverstein e Febbraio, 2009). Esses receptores não sofrem esse tipo de regulação (Choy *et al*, 2004), ou seja, não são regulados pela concentração intracelular de colesterol. Desse modo, o acúmulo progressivo de colesterol nos macrófagos leva à formação de células espumosas, que são precursoras da lesão aterosclerótica (Matsuura *et al*, 2006; Silverstein e Febbraio, 2009).

Os macrófagos expressam pelo menos seis tipos estruturalmente diferentes de receptores na superfície celular para formas modificadas de LDL, que reconhecem de maneira específica essas partículas. Dentre elas podemos citar os receptores *scavengers* A e B (SR-A e SR-BI), CD36, CD68, LOX-1 (*lecitin like oxLDL receptor*) e SR-PSOX (SR ligados a fosfatidilserina). CD36 e SR-A são relatados serem os principais responsáveis pela captação da LDL modificada, levando ao carregamento lipídico de macrófagos (Silverstein e Febbraio, 2009; Goldstein e Brown 2009).

Dentre estes receptores destaca-se o SR CD-36, que apresenta grande distribuição celular, incluindo monócitos, macrófagos, endotélio microvascular, adipócitos, músculo esquelético e células dendríticas. Esse receptor apresenta diversos ligantes, dentre eles LDL modificadas. O CD-36 apresenta alta afinidade com fosfolípidos oxidados encontrados em LDL oxidadas, além de também reconhecer fosfatidilserina oxidada da superfície de células apoptóticas (Silverstein e Febbraio, 2009).

A exposição a LDL oxidadas leva ao aumento da expressão de CD-36 em macrófagos, promovendo, desse modo, a captação dessas partículas. Esse ciclo acelera a formação de células espumosas na íntima arterial (Silverstein, 2009).

Outro receptor implicado na remoção de proteínas modificadas é o receptor SR-A. Ele é altamente expresso em células espumosas derivadas de macrófagos em placas ateroscleróticas, possuindo afinidade por LDL acetiladas, LDL oxidadas, fosfolípidos aniônicos, células apoptóticas e produtos finais da glicação avançada (AGE) (Suzuki *et al*, 1997). Além disso, o SR-A também atua na resposta imune, uma vez que reconhece diversos patógenos e moléculas associadas a patógenos (Moore e Freeman, 2006).

Juntos, os receptores SR-A e CD-36 são responsáveis pela preponderância na captação de lipoproteínas modificadas (Kuchibhotla *et al*, 2008). A ávida captação de LDLox por esses receptores leva a formação de células espumosas e desenvolvimento de estrias gordurosas na parede arterial, que é um dos primeiros passos na progressão da placa aterosclerótica. Brown *et al* (2007), observaram acúmulo tempo-dependente de colesterol esterificado em macrófagos derivados de monócitos humanos quando esses foram incubados com LDL modificadas por metilglioxal e glicolaldeído em relação à incubação com LDL nativa.

O receptor SR-BI, é outro membro da classe dos receptores *scavenger*, como o CD-36. É um receptor de HDL que medeia a captação seletiva do colesterol esterificado da HDL pelo fígado, é também expresso por macrófagos em lesões ateroscleróticas. Este receptor é capaz de se ligar a lipoproteínas modificadas, fosfolípidos aniônicos, células apoptóticas e AGE (Kuchibhotla *et al*, 2008).

A formação dos AGE está associada ao aumento da geração de RL de oxigênio, os quais levam a processos oxidativos das lipoproteínas (Younis *et al*, 2008). Os AGE interagem com receptores de produtos finais da glicação avançada (RAGE), ativando vias de sinalização celulares, principalmente fator nuclear kB (NF-kB) (Yeh *et al*, 2001), que aumenta a transcrição de várias proteína, incluindo ICAM-1, E-selectina, endotelina-1 e citocinas pró-inflamatórias (Haslbeck *et al*, 2004).

Em condições de diminuição de antioxidantes plasmáticos o processo oxidativo da LDL *in vitro* e possivelmente *in vivo*, torna-se mais intenso, ou seja, torna-se não-fisiológico. LDLox têm sido identificadas no plasma humano, mas se elas são oxidadas no plasma ou se sofrem modificação oxidativa na parede vascular e depois regressam ao compartimento plasmático, é ainda motivo de investigação.

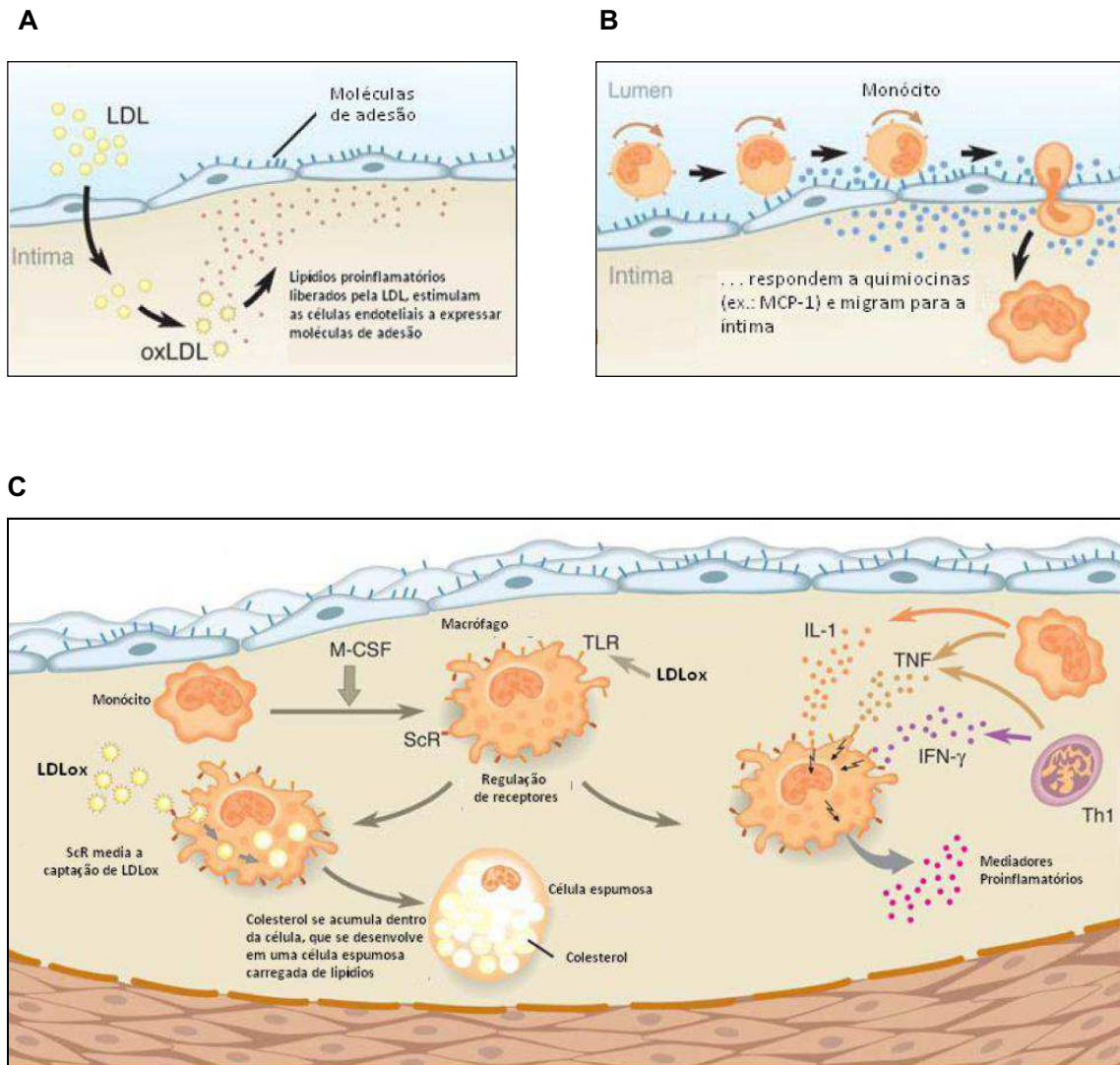
A inibição da oxidação da LDL pela HDL pode ser atribuída à capacidade antioxidante de proteínas e enzimas associadas a ela, como a apoAI, paraoxonase (PON-1), o fator de ativação plaquetária acetil-hidrolase (PAF-AH), lecitina: colesterol acil-transferase (LCAT) e glutiona peroxidase (Sviridov *et al*, 2008). Essas enzimas hidrolisam espécies moleculares pró-inflamatórias de lípidos oxidados e previnem seu acúmulo na LDL (Kontush *et al*, 2004). A capacidade de acumular altas concentrações de hidroperóxidos lipídicos permite que a HDL atue como carreadora desses compostos, removendo das LDL os produtos de sua oxidação e transportando-os ao fígado, onde são destoxificados (Nègre-Salvayre *et al*, 2006). A apoAI previne a LDL da oxidação pela remoção de hidroperóxidos da LDL (Nègre-Salvayre *et al*, 2006; Sviridov *et al*, 2008). O efeito antioxidante da HDL pode ser atribuído também à sua habilidade no processo de quelação de metais de transição e na remoção de produtos de oxidação lipídica de lipoproteínas oxidadas ou membranas celulares (Nègre-Salvayre *et al*, 2006). Ao prevenir a oxidação, a HDL também protege o endotélio dos efeitos citotóxicos da LDL oxidada (LDLox) e da migração e adesão de monócitos, ambos induzidos pela LDLox (Barter *et al*, 2007).

Modificações genéticas podem afetar a propriedade antioxidante da HDL. Como exemplos, temos os portadores da apoAI_{Milano} e apoAI_{Paris}, variantes da apoAI com substituições de cisteína, que apresentam menores concentrações de HDL-C sem elevação do risco de DAC (Sviridov, 2008). Ambas as variações são consideravelmente mais ativas na prevenção da oxidação dos fosfolípidos mediada pela lipoxigenase quando comparadas com a apoAI selvagem. Acredita-se que a capacidade antioxidante aumentada dessas variantes contribua para sua capacidade ateroprotetora aumentada (Bielicki e Oda, 2002).

Estudos mostram que antioxidantes como ácido ascórbico, α -tocoferol e β -caroteno inibem a oxidação de lipídeos em solução, membranas e lipoproteínas como a LDL, podendo ser uma importante ferramenta exógena na modulação da formação da LDL oxidada (Zarev *et al*, 2003).

As modificações oxidativas da LDL, mesmo que mínimas, transformam-na em uma partícula altamente imunogênica e com características inflamatórias. Fosfolípidios contendo ácidos graxos poliinsaturados. Após sofrerem modificações oxidativas,

ligam-se aos resíduos de lisina na apoB100 (Siqueira *et al*, 2006), gerando neo-epítomos antigênicos e desencadeando, uma resposta auto-imune com produção de anticorpos e formação de imunocomplexos.



Adaptado de Hansson, Robertson e Soderberg-Nauclér, 2006.

Figura 1: Eventos iniciais do desenvolvimento da placa aterosclerótica. **A:** LDL penetra no endotélio e é retida na íntima, onde sofrerá modificação. **B:** Monócitos circulantes aderem às células endoteliais, expressando VCAM-1 e outras moléculas de adesão. **C:** ativação de macrófagos e formação das células espumosas.

1.3. Anticorpos Anti-LDLox (acLDLox) e Imunocomplexos (IC)

A LDLox resulta na geração de auto-anticorpos (acLDLox) (Wang *et al*, 2007; Hansson, *et al*, 2006). A presença de acLDLox plasmático sugere que os mecanismos de oxidação se processam *in vivo* tornando-se um indicador importante no monitoramento das reações oxidativas (Stocker e Keaney, 2004; Lopez *et al*, 2009).

Durante o processo aterosclerótico, diferentes antígenos, dentre eles LDLox e seus produtos de degradação, desencadeiam uma resposta inflamatória que resulta na ativação de diversos genes em células endoteliais, células musculares lisas, monócitos/macrófagos, células B e T. Estes eventos podem induzir o aumento ou diminuição de moléculas de adesão e co-estimulatórias na secreção de citocinas, a expressão de receptores, na diferenciação celular entre outras propriedades consideradas alvo em potencial para o tratamento e prevenção da aterosclerose (Hansson e Hermansson, 2011).

As células T são recrutadas pelos macrófagos por um mecanismo semelhante envolvendo moléculas de adesão e quimiocinas e essas células são ativadas na lesão aterosclerótica, produzindo mediadores pro-aterogênicos e contribuindo para o crescimento da lesão e agravamento da doença (Hansson *et al*, 2006; Tedgui e Mallat, 2006). As células B e os mastócitos estão presentes ocasionalmente nas lesões, porém estão em abundância na adventícia da artéria (Kovanen, 2007; Grabner *et al*, 2009). Todas essas observações indicam que o mecanismo imune tanto inato como adaptativo possuem papel importante na aterosclerose (Hansson *et al*, 2002).

Os produtos de peroxidação lipídica como MDA e o 4-HNE, presentes na LDLox, são altamente reativos, interagindo com os aminoácidos da apoB100, principalmente com a lisina. Neo-epítomos também são gerados durante a oxidação (Gounopoulos *et al*, 2007). Têm sido identificados múltiplos epítomos nas LDLox capazes de desencadear respostas auto-imunes (Kearney, 2000). Os lípidos modificados na superfície da LDL são biologicamente ativos e reconhecidos por vários receptores do sistema imune inato.

A LDLox é também capaz de ativar o sistema imune adaptativo induzindo a formação de anticorpos, predominantemente isotipos inflamatórios IgG1 e IgG3 (Al Gadban *et al*, 2010). A consequência direta da síntese desses anticorpos é a formação dos imunocomplexos (IC), através da interação com a LDLox (Al Gadban *et al*, 2010; Lopes-Virella *et al*, 2011).

Tanto a LDLox como o IC são encontrados em placas ateroscleróticas humanas e os IC são considerados mais eficientes que as LDLox na formação das células espumosas (Al Gadban *et al*, 2010).

Estes complexos são internalizados pelo receptor Fc gama dos macrófagos presentes na lesão aterosclerótica, induzindo também a formação de células espumosas (Burut *et al*, 2010). O envolvimento desses receptores são muito importantes pois proporciona maior ativação de sinais de células fagocíticas do que o envolvimento de receptores *scavenger*.

Existem dois principais mecanismos pelos quais a formação dos IC pode levar à progressão da aterosclerose: a ligação entre anticorpos e LDLox para formação dos IC através do receptor Fc da IgG e a ativação do sistema complemento. Em ambos, estudos *in vitro* sugerem papel predominantemente pró-aterogênico para os IC (Burut *et al*, 2010). Muitas formas de receptores Fc têm sido identificadas. Essas formas reconhecem diferentes isotipos de anticorpos: Fc gama, Fc-alpha (Fc α), Fc-epsilon (Fc ϵ) e Fc—mu (Fc μ). Cada tipo com muitos membros, cada um com uma função diferente (Monteiro, 2010).

A ligação destes complexos imunes aos macrófagos induz a produção de mediadores que promovem a migração de monócitos e amplifica o processo inflamatório na lesão aterosclerótica (Singh *et al*, 2008).

Portanto, diferentes funções biológicas podem ser sugeridas para os acLDLox, dependendo se eles estão circulando livremente no plasma ou como IC (Tinahones *et al*, 2005).

Tendo em vista evidências recentes, têm-se especulado sobre a existência de diferentes “famílias” de auto-anticorpos contra LDLox, os “pró-aterogênicos” e os “anti-aterogênicos” (Sherer *et al*, 2002).

Isso se deve ao fato de que a população de anticorpos é diversa; os epítomos formados durante a modificação da LDL a qual se ligam os anticorpos são heterogêneos; a população pode em princípio constituir de fragmentos diferentes de apoB100 (Hansson e Hermansson, 2011), de epítomos de fosfolípidos e até mesmo de outras proteínas que funcionariam como co-fatores.

Nesse sentido, é possível que os trabalhos apresentados até hoje na literatura estejam analisando anticorpos com funções diferentes e em respostas a compostos diferentes, o que de certa forma explicaria os resultados contraditórios encontrados até o momento.

Algumas evidências sugerem que autoanticorpos IgG para a LDLox estão associados com propriedades pró-aterogênicas e autoanticorpos IgM para a LDLox

desempenham um papel ateroprotetor (Chou *et al*, 2008; Burut *et al*, 2010). Se tais anticorpos possuem papel na modulação ou se são refletores da aterosclerose, não está totalmente determinado. Entre outras propriedades, esses anticorpos podem estar envolvidos na manutenção das funções de ligação e compensação de lipídios oxidados pró-inflamatórios e, portanto, sendo ateroprotetores. O que não se sabe é se esses acLDLox são somente uma indicação do status oxidativo da LDL ou se eles contribuem para aterogênese (Santos *et al*, 2009). Deste modo, os autoanticorpos IgG e IgM podem ter ações antagônicas (Tsimikas *et al*, 2007).

Anticorpos contra células apoptóticas e fosfolípidos oxidados inibem a ligação da LDLox aos macrófagos e têm demonstrado efeitos ateroprotetores em experimentos com animais (Binder *et al*, 2003; Schiopu *et al*, 2004). O efeito ateroprotetor desses anticorpos pode ser através dessa inibição com consequente inibição da formação das células espumosas (Binder *et al*, 2003). Esses anticorpos não reconhecem somente os fosfolípidos modificados oxidativamente na LDLox e células apoptóticas de membrana, mas também fosfocolina na parede celular de *Staphylococcus aureus* (pneumococos) (Binder *et al*, 2003).

A LDLox é a principal lipoproteína encontrada em lesões ateroscleróticas, juntamente com a β 2-glicoproteína I (β 2-gp1) e linfócitos imunorreativos. Os anticorpos contra β 2-gp1 têm sido implicados no processo imuno-patológico da aterosclerose. Embora a função fisiológica da β 2-gp1 ainda permaneça distante de um consenso, a β 2-gp1 têm sido mostrada participando da regulação de vários mecanismos fisiológicos.

Foi descrita uma ação antioxidante para a β 2-gp1 por inibir a oxidação e a internalização da LDL por macrófagos e, assim, prevenir a progressão da aterosclerose (Lin *et al*, 2001). A interação da β 2-gp1 ligada à LDLox com anticorpos antifosfolípidos favorecem a endocitose de partículas de LDLox por macrófagos. Entretanto, o papel destes autoanticorpos na aterogênese é ainda obscuro.

Na parede arterial, as LDLox interagem com β 2-gp1 formando o complexo LDLox/ β 2-gp1, que é liberado na circulação. Esses complexos LDLox/ β 2-gp1 são estáveis devido às ligações eletrostáticas promovidas pelos ligantes oxLig1 e oxLig2 e são potencialmente patogênicos no processo da aterosclerose (Lopez, 2005). Alguns anticorpos contra β 2-gp1 reconhecem β 2-gp1 apenas quando estes formam complexos com a LDLox. O complexo LDL-ox/ β 2-gp1 é dependente do respectivo anticorpo para que possa ser fagocitado por macrófagos (Lopez *et al*, 2009). A captação de IC contendo LDLox através de receptores Fc gama tipo 1 transforma macrófagos em células espumosas e acelera o processo aterosclerótico (Bassi *et al*,

2007). Auto-anticorpos contra esse complexo têm sido demonstrado em pacientes com lúpus e/ou síndrome antiposfolipídica e mostram associação significativa com trombose arterial.

Vários pesquisadores têm investigado a relação entre acLDLox e DCV e seus fatores de risco, porém os resultados encontrados são controversos (Shoenfeld *et al*, 2004; Gounopoulos *et al*, 2007; Chen *et al*, 2008; Santos *et al*, 2009). Estudos demonstraram que anticorpos anti-LDLox se correlacionam com a progressão e extensão da aterosclerose e com outros fatores de risco clássicos para doença coronariana (Salonen, 1992; Palinski, 2000).

Um grande número de investigações têm encontrado altos títulos de acLDLox em indivíduos com a aterosclerose carotídea, doença coronária, diabetes mellitus, doença vascular periférica, hipertensão e pré-eclampsia (Marchesi *et al*, 1996; Shaw *et al*, 2001; Wilson *et al*, 2006; Medeiros *et al*, 2010). Esses anticorpos têm sido também encontrados em pacientes com distúrbios auto-imunes, como esclerose sistêmica, vasculites, lúpus eritematoso sistêmico (LES) e síndrome antifosfolipídica (SAF) (Lopez *et al*, 2009). Além disso, anticorpos anti-LDLox estão também presentes em populações aparentemente saudáveis (Shoenfeld *et al*, 2004; Medeiros *et al*, 2010) e até em crianças (Iughetti *et al*, 1999).

Uma variedade de produtos de oxidação de lipídios e proteínas têm sido identificados nas lesões de ateroma, o que não significa que pertençam necessariamente às LDL. Contudo, algumas lipoproteínas isoladas dessas lesões apresentam características das LDLox, como a mobilidade e reatividade com os anticorpos acLDLox (Yla-Herttuala *et al*, 1989). No entanto, devemos levar em consideração que os acLDLox podem reagir cruzadamente com outros epítomos antigênicos, presentes por exemplo, nas células apoptóticas. Assim, a reatividade com estes anticorpos nem sempre é sinônimo de presença de LDLox. Além de diferentes epítomos, diferentes títulos de anticorpos tem sido investigado (Watson *et al*, 1999).

Muitos estudos experimentais em coelhos e camundongos em que a LDLox é usada para imunização têm mostrado correlações positivas entre altos títulos de acLDLox e o grau de proteção contra aterosclerose (Palinski *et al*, 1995; Nilsson *et al*, 2005). A situação é mais complexa em humanos, vários estudos mostram correlação tanto positiva, negativa como nenhuma correlação entre títulos de acLDLox e aterosclerose e suas manifestações (Hulthe *et al*, 1998; Sjogren *et al*, 2008).

Estudos que investigam a relação entre doença aterosclerótica subclínica nas artérias carótidas e femorais e títulos de IgG para LDLox mostram resultados

contrastantes: associações positivas e negativas foram encontradas (Shoji *et al*, 2003; Sjogren *et al*, 2008).

Salonen *et al* (1992) mostraram que elevados títulos de autoanticorpos IgG para LDLox estavam associados com a progressão de lesão obtida por ultrassonografia. Estudos de caso-controle sugerem que elevados títulos de IgG contra LDLox estão presentes em pacientes com DAC (Puurunen *et al*, 1994; Heitzer *et al*, 1996; Hulthe 2004).

Meraviglia *et al* (2002) mostraram que elevados títulos de autoanticorpos IgG e IgM para a LDLox predizem progressão da aterosclerose carotídea após realização de endarterectomia carotídea. Do mesmo modo, estudos com pacientes com IAM apresentaram elevação dos títulos (Inoue *et al*, 2002). Entretanto, em outros estudos essa afirmação não é confirmada. Schumacher *et al* (1995) estudaram 15 pacientes consecutivos com IAM e média de idade de 66 anos e mostraram diminuição dos níveis de autoanticorpos IgG para LDLox.

A classe de autoanticorpos IgM para a LDLox, reconhece epítomos específicos para a oxidação, podendo estar envolvida na captação e detoxicação de lipídios oxidados pró-inflamatórios (Gounopoulos *et al*, 2007).

Em alguns estudos, mas não em todos, a relação entre os títulos de IgM e os diferentes aspectos da doença cardiovascular foi examinada. Em pacientes com IAM, foram encontrados baixos níveis de IgM quando comparados aos controles (Dotevall *et al*, 2001; Hulthe *et al*, 1998). Títulos de autoanticorpos IgM para a LDLox estão diminuídos em pacientes com aterosclerose carotídea e femoral (Hulthe *et al*, 2001). Resultados semelhantes foram observados no estudo realizado por Karvonen (2003), onde houve uma associação inversa entre títulos de IgM e aterosclerose carotídea, mas nenhuma associação foi encontrada entre IgG ou IgG2 e aterosclerose.

Por outro lado, estudo realizado por Fredrikson *et al* (2003) mostrou que aumentos nos títulos de IgM foi associada com infarto do miocárdio e aterosclerose carotídea, mas somente em indivíduos abaixo de 60 anos, nos demais, nenhuma associação foi encontrada.

Existem muitas razões descritas na literatura para explicar esses resultados tão conflitantes, das quais podemos citar por exemplo, as diferenças existentes entre as populações estudadas, que variam desde pacientes com hipercolesterolemia familiar, pacientes no estágio final da doença renal, diabéticos e também os indivíduos clinicamente saudáveis. Outra razão descrita se baseia na maneira em que os acLDLox foram definidos nos estudos, ora pela razão entre abLDLox/abLDLnativa, ora pela razão entre abLDLox/padrão interno, também pelos valores de absorbância, ou

ainda obtidos por meio de kits comerciais de diferentes fornecedores. Outro motivo se deve às diferenças relatadas para os diferentes impactos da formação dos imunocomplexos nas diferentes populações. Além disso, preparação da LDLox varia de uma para outra, portanto, o isolamento da LDL para os estudos nunca é idêntica.

Muitos estudos estão sendo realizados para avaliar o papel dos anticorpos contra LDLox, quer através de imunização ativa usando LDLox ou modelos de epítomos específicos oxidados ou através de imunização passiva com anticorpos humanos. A imunização de camundongos apoE *-/-* com homólogo homogeneizado de placa aterosclerótica ou MDA-LDL causa redução da lesão (George *et al*, 1998; Zhou *et al*, 2001). Estes estudos mostraram que a presença de anticorpos IgG contra estes antígenos foi o motivo dessa redução. Outros estudos observaram que a imunização de animais apoE com peptídeos específicos da apoB100 também reduziram a aterosclerose (Fredrikson *et al*, 2003; Chyu *et al*, 2005). Tratamento com IgG humana recombinante contra peptídeos da apoE também reduzem a aterosclerose experimental (Schiopu *et al*, 2004).

Durante a última década, pesquisas com animais vêm sendo realizadas, sugerindo que tanto o sistema imune inato como o sistema imune adaptativo modulam a progressão da aterosclerose. Muitos antígenos têm sido sugeridos estar envolvidos nesta reação imune (Hansson *et al*, 2002).

Estudos prévios demonstraram explicações de mecanismo para a relação entre a formação de anticorpos em modelos animais e diferentes manifestações da doença (Reardon *et al*, 2001; Binder *et al*, 2002).

Por exemplo, o tamanho da lesão se mostrou diminuída em 40-80% em camundongos *knockout* para células T e B com dieta padrão (Dansky *et al*, 1997; Reardon *et al*, 2001). Entretanto, quando esses animais foram submetidos à uma dieta aterogênica com altos níveis de colesterol, nenhuma diferença no desenvolvimento da aterosclerose foi observada quando comparados com animais controles com função imune normal. Estes dados sugerem função pró-aterogênica para as células T e B, pelo menos em condições normocolesterolêmicas. Entretanto, existem muitos exemplos de efeitos protetores quando o sistema imune é ativado. Estudos prévios mostraram redução em 40-60% na aterosclerose após imunização com LDLox em coelhos hipercolesterolêmicos. Observações semelhantes foram encontradas posteriormente, em camundongos *knockout* em receptores para LDL e apoE (Freigang *et al*, 1998; Zhou *et al*, 2001).

Dansky *et al* (1997), num estudo com camundongos *knockout* em apoE, demonstrou que, na ausência de fatores de risco aterogênicos, a imunidade

desempenha papel significativo no desenvolvimento da aterosclerose, enquanto que na aterogênese, esse papel se torna menos importante. É possível que a imunidade humoral contribua em todos os estágios precoces do processo aterosclerótico, quando vários fatores de risco relevantes ainda não causaram a doença severa. Conseqüentemente pode-se deduzir que a resposta imune para LDLox é uma importante variável nos vários estágios da aterosclerose.

A resposta imune humoral contra LDLox têm sido alvo de muitos estudos que tentam correlacionar modificações oxidativas e seus produtos gerados, com o desenvolvimento da placa aterosclerótica, porém existe uma grande dificuldade neste tipo de estudo devido à variedade de componentes que podem ser gerados e encontrados durante o processo de oxidação da LDL e conseqüentemente na variedade de anticorpos potencialmente gerados contra esses produtos. Estudos clínicos em modelos animais mostram que autoanticorpos contra LDLox estão correlacionados com a modulação do processo aterosclerótico e ou com o risco de desenvolvimento de patologias por conseqüência a aterosclerose.

George *et al* (1997) mostraram que a imunização ativa de camundongos *knockout* em receptores de LDL-C com cardiolipina ou com β 2-gp1 induziu o aumento das lesões de aterosclerose.

Um estudo que utilizou coelhos como modelo experimental, determinou o efeito da imunização com LDL ou com LDLox na formação da placa aterosclerótica. Encontraram-se anticorpos em todos os grupos de animais, os alimentados com colesterol e não imunizados e os alimentados com colesterol e imunizados, tanto com LDL ou com LDLox. No entanto, os títulos de acLDLox foram superiores nos animais imunizados, embora sem diferença entre os que receberam LDLox ou LDL não oxidada. Este último resultado faz supor que as LDL sejam oxidadas *in vivo* durante a imunização. A imunização com LDL e LDLox reduziu a formação de lesões ateroscleróticas na aorta proximal em 74% ($p < 0,05$) e em 48% (p não significativo), respectivamente (Ameli *et al*, 1996).

Outros trabalhos no mesmo modelo animal demonstraram igualmente um aparente benefício das respostas imunes, humoral e celular, às lipoproteínas oxidadas. Os autores admitem que os acLDLox e os linfócitos T (ativados pelos imunocomplexos LDLox/acLDLox) possuem capacidade de eliminar as LDLox da circulação, impedir sua entrada na íntima arterial e a sua captação pelos macrófagos (Palinski *et al*, 1995; Horkko *et al*, 1999).

Em estudos com humanos, alguns trabalhos têm procurado uma relação significativa positiva ou negativa entre a presença e os títulos de acLDLox com as

diferentes formas de doença vascular e modificações metabólicas, já em outros, têm investigado as possíveis ações fisiopatológicas dos acLDLox e da imunidade celular sobre a aterosclerose.

Estudos recentes mostraram que pacientes com síndrome coronariana aguda (SCA), incluindo IAM e angina instável (AI), apresentam níveis mais elevados de acLDLox do que pacientes com angina estável (AE) e controles (Soltesz *et al*, 2007). Outros estudos questionam a efetiva contribuição dos acLDLox na aterogênese, Não tendo sido observado diferenças significativas entre os títulos destes anticorpos em controles normais e em pacientes com doença arterial coronariana (DAC) crônica ou aguda (Rossi *et al*, 2003).

Wilson *et al* (2006), encontraram que acLDLox são positivamente associados com idade, mas não na presença de doença cardiovascular. Por outro lado, Tinahones *et al* (2005), em seu estudo mostrou que pessoas com idade entre 16 à 35 anos possuem maiores títulos de acLDLox quando comparados com pessoas acima dos 36 anos de idade. Esses dois estudos revelam que ainda há conflito sobre o papel patofisiológico e na importância dos acLDLox.

Em estudos anteriores, níveis séricos de acLDLox foram encontrados em concentrações elevadas em pacientes com severa ateromatose das artérias coronárias (Virella *et al*, 1993), artérias carótidas (Salonen *et al*, 1992; Maggi *et al*, 1993) e artérias periféricas (Bergmark *et al*, 1995), porém em níveis reduzidos em pacientes hipercolesterolêmicos.

Estudos que observaram a relação desses acLDLox na população saudável, têm encontrado resultados controversos. Em alguns dos estudos, foram observados tanto correlações positiva (Iribarren *et al*, 1997; Hulthe *et al*, 2001) como negativas (Fukamoto *et al*, 2000; Hulthe *et al*, 2001) entre acLDLox e EIM nas artérias carótidas.

Essas diferenças discrepantes encontradas nas pesquisas têm sido justificadas pelas diferentes metodologias utilizadas para processar os acLDLox, além da diferença nos perfis da população estudadas.

Uma abordagem adotada por alguns autores para verificar o quanto os acLDLox podem ser considerados marcadores de oxidação da LDL e aterosclerose é verificar os níveis desses acLDLox em jovens, os quais, na teoria possuem “pouca” aterosclerose. Deste ponto de vista, o estudo de Tinahones *et al* (2005, 2007), é de grande importância, pois é o único em grande escala em que os níveis de acLDLox são medidos em pessoas jovens (até 5 anos de idade).

Num pequeno estudo realizado por Karabinos e Koulouris (2007), onde foram utilizados 243 voluntários saudáveis, foram medidos os níveis de acLDLox e o perfil

lipídico. Esse estudo foi conduzido em 2 grupos: Grupo 1: 96 jovens adultos saudáveis (17-25 anos); Grupo 2: 147 adultos de meia idade saudáveis (45-65 anos). Os resultados desse estudo demonstrou que o grupo 1 possuíam níveis séricos de acLDLox elevados comparados ao grupo 2 ($p < 0.05$), e nenhuma diferença foi demonstrada entre homens e mulheres, apesar de os níveis de acLDLox terem se apresentado elevados em homens, mas se resultados significativos, assim como no grupo 2. Ainda no grupo 1 foi demonstrada uma correlação positiva entre níveis de acLDLox e LDL e uma correlação negativa com apoAI. Já no grupo 2, nenhuma correlação foi identificada entre níveis de acLDLox e o perfil lipídico. Análises de regressão multivariada revelaram que tanto níveis séricos de apoAI como LDL são preditores independentes para níveis séricos de acLDLox no grupo 1 ($p < 0.05$).

Em estudos realizados por Hulthe (2004), foram encontradas relações inversas entre títulos de IgG e IgM e também uma resposta inversa para IAM e aterosclerose subclínica. Além disso, dados de Karvonen *et al* (2003) onde somente IgM mostrou associação inversa e independente para aterosclerose subclínica nas artérias carótidas. Esses achados sustentam o papel benéfico dos anticorpos IgM nos desenvolvimento da aterosclerose.

Num outro trabalho procurou-se relação entre os títulos de acLDLox IgG e IgM e EIM das carótidas e femoral, em homens clinicamente saudáveis. Encontrou-se uma associação positiva entre os acLDLox IgG e EIM da carótida comum e uma correlação negativa entre acLDLox IgM e EIM da femoral (Virella *et al*, 1993).

Compararam-se os títulos de acLDLox em indivíduos com hipercolesterolemia familiar (HF) e num grupo controle e foi avaliado uma possível correlação entre acLDLox e a extensão (avaliada por ultrassonografia) das lesões ateroscleróticas. Não houve diferenças significativas nos títulos de acLDLox entre o grupo dos indivíduos com HF e controles. Também não houve associação significativa entre EIM das artérias carótidas e femoral e títulos de acLDLox. Os autores explicaram estes resultados com a hipótese de que, perante valores extremamente elevados de colesterol sérico, como era o caso da população estudada, a importância da resposta imune às LDLox, no processo aterogênico, será ultrapassada pela excessiva concentração das lipoproteínas aterogênicas (Hulthe, 1998).

O mecanismo pelo qual acLDLox participa do processo aterosclerótico não está totalmente definido. Primeiramente, esses acLDLox podem estar ligados com seus antígenos, as LDLox, os quais trafegam livremente na corrente sanguínea, portanto, inibindo sua entrada dentro da parede arterial. Secundariamente, os acLDLox podem facilitar a remoção das LDLox da parede arterial e o seu retorno à circulação. Horkko

et al (1999) demonstraram que a captação das LDLox pelos macrófagos pode ser inibida pelos acLDLox, os quais nessa via impediria a transformação de macrófagos em células espumosas. Além do mais, Ling (1997), mostrou que quando as LDLox não são captadas pelos macrófagos, as LDLox seguem uma via metabólica alternativa.

Durante os últimos anos, muitos progressos vêm sendo realizados para identificar epítomos específicos de LDL que induzem a produção de anticorpos específicos, responsáveis pelos efeitos pró-aterogênicos de imunização pela LDLox. Não está completamente elucidado se as respostas imunes para LDLox são pró-aterogênicas ou anti-aterogênicas *in vivo* (humanos) (Rose e Afanasyeva, 2003).

A maioria dos estudos clínicos mostraram aumento de títulos de IgG com diferentes manifestações de doença. Entretanto, poucos estudos têm mostrado associação negativa ou nenhuma associação. Em contradição, a maioria dos estudos investigam títulos de anticorpos para LDL oxidativamente modificadas, mostrando associação inversa às diferentes manifestações de doença aterosclerótica.

Os resultados acima descritos tanto com humanos como para animais são inconsistentes e a papel patofisiológica desses anticorpos permanecem obscuros.

A dificuldade na interpretação dos dados em estudos clínicos e em animais se deve às diferenças nos estágios da aterosclerose que são estudadas e na resposta imune para diferentes antígenos. Portanto, a formação dos anticorpos podem desempenhar papéis diferentes em diferentes estágios do desenvolvimento da aterosclerose.

Um estudo realizado por Lopes-Virella *et al* (2011) mostraram que a elevação nas concentrações de IC estão associados ao desenvolvimento da calcificação arterial coronariana em pacientes diabéticos tipo 1. Esta observação sustenta evidências anteriores do papel patogênico dos IC na progressão da aterosclerose (Orchard *et al*, 1999; Burut *et al*, 2010; Lopes-Virella *et al*, 2011). Lopes-Virella *et al* (1999), mostraram correlação negativa significativa entre acLDLox livres e IC em indivíduos com DM. Além disso, dados prospectivos em 98 indivíduos diabéticos, acompanhados por 8 anos mostraram que os IC de LDL se correlacionam com o desenvolvimento de doença arterial coronariana (Lopes-Virella *et al*, 1999; Orchard *et al*, 1999).

Portanto, estudos com animais sugerem que a imunização deve ter um efeito benéfico sobre a aterosclerose. Entretanto, a papel dos anticorpos anti-LDLox em humanos, onde a aterosclerose já esta presente é ainda incerto. Afim de esclarecer a relação entre acLDLox e desenvolvimento da aterosclerose, mais estudos são necessários, focando em antígenos envolvidos e na importância dos vários tipos de

anticorpos. A formação dos anticorpos podem ter efeitos positivos e negativos em humanos, e isso é importante para entender as patologias antes da intervenção.

A tabela 1 resume mais alguns estudos clínicos envolvendo a LDL oxidada, anticorpos anti-LDL oxidada, imunocomplexos e aterosclerose.

Tabela 1. Estudos clínicos dos últimos 5 anos envolvendo LDL oxidada, títulos de anticorpos contra LDL oxidada, imunocomplexos e aterosclerose

Objetivos dos Estudos	n amostral	Resultados	Autor/Ano de publicação
Medir acLDLox e proteína C reativa (PCR) em pacientes com SCA	33 ACS, 62 CAD 50 controles	Correlação positiva entre acLDLox e PCR	Soltesz <i>et al</i> (2007)
Avaliar a relação acLDLox e LDLox circulantes	86 indivíduos	acLDLox e LDLox não possuem nenhuma relação	Wang <i>et al</i> (2007)
Investigar correlação entre LDLox, anticorpos contra LDLox e espessura de carótidas	200 pacientes saudáveis	Tanto a LDLox como os anticorpos contra LDLox contribuem, por diferentes vias, do metabolismo da LDL e desenvolvimento da aterosclerose	Chen <i>et al</i> (2008)
Avaliar a relação da IgG anti-LDLox com marcadores de risco de DCV	94 estáveis 116 com SM	Condições inflamatórias agudas diminuem títulos de anticorpos IgG contra LDLox	Santos <i>et al</i> (2009)
Avaliar a associação entre anticorpos contra LDLox e síndrome coronariana	90 casos 90 controles	acLDLox apresentaram-se mais elevados nos pacientes	Medeiros <i>et al</i> (2010)
Estudar os anticorpos anti-LDLox em pacientes com doença dos pequenos vasos	158 pacientes 158 hipertensivos 43 controles	Casos apresentaram maiores níveis de IgG-HOCl-oxLDL e níveis reduzidos de IgM-MDA-oxLDL comparado aos controles	Rouhl <i>et al</i> (2010)
Medir LDLox, AGE-LDL e MDA-LDL nos imunocomplexos e determinar sua relação com	479 pacientes DM1	LDLox e AGE dos IC são significativamente associados com a progressão e aumento da EIM na DM tipo 1	Lopes-Virella <i>et al</i> (2011)

espessura íntima média das artérias carótidas

Medir LDLox dos imunocomplexos de pacientes
DM1 e verificar a relação entre os IC e calcificação
arterial

479 pacientes DM1

Concentrações elevadas de IC são associados com
desenvolvimento da calcificação arterial na DM1

Lopes-Virella *et al* (2011)

1.4. Outras Modificações Químicas da LDL

Além da oxidação, diferentes modificações na partícula de LDL podem ocorrer (Faulin *et al*, 2009), e dentre essas modificações podemos destacar os processos de glicação (LDLgli) (Sobal *et al*, 2000; Younis *et al*, 2008), metilação (LDLmet) (Oörni *et al*, 1997), acetilação (LDLac) (Castilho *et al*, 2001; Froystad *et al*, 2002) e agregação (LDLag) (Grosheva *et al*, 2009), seguido de mudanças adicionais devido à degradação enzimática (Ferreti *et al*, 2002; Fraser e Tenner, 2010).

Esses eventos levam à completa desintegração da partícula com resíduos identificados no plasma (Esterbauer *et al*, 1992). Embora os mecanismos para esses processos ainda não sejam claramente conhecidos, as enzimas envolvidas na modificação da LDL incluem a mieloperoxidase, xantina oxidase, NADPH-oxidase e fosfolipases (Hansson e Hermansson, 2011).

As formas modificadas da LDL estão associados com vários estados patológicos e desempenham um papel importante na progressão da aterosclerose, induzindo esse processo através de complexos mecanismos inflamatórios e imunológicos (Faulin *et al*, 2009).

Todos esses processos de modificação, alteram drasticamente a lipoproteína, fazendo com que esta não se comporte mais da mesma maneira que a LDL nativa, surgindo assim, uma nova característica que atua como uma entidade única de sinalização (Faulin *et al*, 2009).

Além dessas modificações, outras alterações que podem reforçar a captação da LDL pelos macrófagos *in vitro* incluem a glicação, formação de imunocomplexos e a formação de complexos com proteoglicanos (Tabas, 1999).

Dentre as modificações da LDL, a oxidação é a mais estudada. No entanto, a glicação e a oxidação, provavelmente, ocorrem simultaneamente *in vivo* (Younis *et al*, 2008) levando à modificação da LDL (Sobal *et al*, 2000). Provavelmente, os processos de oxidação e glicação das LDL são parcialmente interdependentes, mas ambos impedem a captação das LDL por seus receptores, promovendo sua internalização através dos receptores scavenger presentes nos macrófagos, resultando na formação das células espumosas, característica das lesões ateroscleróticas iniciais (Matsuura *et al*, 2006). Tanto a LDL glicada como a oxidada foram encontradas em células espumosas derivadas de macrófagos nas lesões ateroscleróticas (Imanaga *et al*, 2000).

O processo de glicação da LDL ocorre principalmente devido à reação não enzimática entre a glicose e seus metabolitos com os grupos amino de lisina livre. A

glicação prossegue linearmente com o tempo e a concentração de glicose (Schleicher *et al*, 1981).

Reações de glicação são constituídas de duas fases. Na primeira etapa, a glicose e o grupo amino de resíduos de lisina reagem entre si para formar frutose-lisina (FL). Os processos subsequentes são a desidratação, rearranjos e ciclização. Depois disso, mais reações resultam na formação AGE (Sobal *et al*, 2000).

A glicação pode ocorrer tanto na parte proteica da lipoproteína como nos fosfolípidios, levando à uma alteração funcional da LDL ou aumento da susceptibilidade às modificações oxidativas (Faulin *et al*, 2009).

A LDL glicada está presente em concentrações superiores no plasma de indivíduos diabéticos quando comparados aos indivíduos sem a doença, mas mesmo nesses, a concentração de LDL glicada circulante é maior que as LDL oxidadas (Younis *et al*, 2008). Glicação aumentada no diabetes tem sido observada em todas as classes de apolipoproteínas, mas especialmente em apoB100 (Sobal *et al*, 2000).

As LDL glicada não é removida pelo receptor de LDL, mas pelos receptores *scavenger* e por receptores específicos para AGE dos macrófagos e das células endoteliais, levando ao acúmulo celular de colesterol e à formação de células espumosas (Younis *et al*, 2008). A LDL glicada têm sido identificada imunohistoquimicamente nas placas de ateroma utilizando anticorpos contra diferentes epítomos nas LDL nativas, oxidadas, glicadas e glicoxidadas (Younis *et al*, 2008).

A geração das LDLox podem ocorrer durante a glicação, mas a LDLox não é necessariamente glicada como foi indicado em estudos *in vitro* sobre a reatividade cruzada de LDL glicada e glicoxidada, utilizando anticorpos contra a LDLox e LDL-AGE, onde foi demonstrado que LDLox não apresenta reação cruzada com anticorpos para LDL-AGE (Younis *et al*, 2008).

O reconhecimento que a glicação da LDL é tão importante quanto o processo de oxidação na aterogênese pode levar ao desenvolvimento da compreensão deste complexo mecanismo e de como evitá-lo.

1.5. Proteínas reguladoras do metabolismo lipídico, sua relação com LDLox e sua resposta imunológica

São escassos na literatura estudos envolvendo as proteínas reguladoras do metabolismo plasmático e lipoproteínas modificadas quimicamente, sendo necessárias mais investigações para definir sua contribuição no metabolismo lipídico.

A proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP) atua na transferência de ésteres de colesterol das HDL para as VLDL, IDL e lipoproteínas remanescentes e faz o caminho inverso para os triacilgliceróis. Esta proteína, junto à LCAT, atua no metabolismo da HDL (Mahley *et al*, 2003).

Algumas evidências sugerem que a CETP está associada à heterogeneidade da LDL (Vakkilainen *et al*, 2002; Hogue *et al*, 2004). CETP pode não só alterar a composição do éster de colesterol e de triglicérides da LDL, como também alterar a susceptibilidade da LDL à oxidação (Sugano *et al*, 2000), o que pode resultar no incremento das concentrações da LDL *in vivo*. Também foi indicado que a completa deficiência de CETP aumenta as concentrações plasmáticas de LDLox (Chiba *et al*, 1997). No entanto, nenhum estudo sobre as associações entre o aumento da concentração e composição do éster de colesterol e triglicérides na LDL, e concentrações de LDLox *in vivo* foi relatada (Wang *et al*, 2007).

Um estudo realizado por Castilho *et al* (2001), onde investigaram os efeitos no fluxo bidirecional de éster de colesterol (*in vitro*) mediada pela CETP entre HDL e partículas de LDL acetiladas e oxidadas demonstrou que modificações químicas da LDL alteram significativamente a redistribuição de éster de colesterol mediada pela CETP entre HDL e LDL, indicando que a CETP transfere éster de colesterol com mais eficiência da LDLox para HDL em relação a LDL nativa, em um mecanismo potencialmente anti-aterogênico, sugerindo que esse processo provavelmente ocorra no compartimento plasmático assim como na íntima arterial. Outros estudos também investigaram o efeito da modificação da LDL na rede de transferências da CETP (Nishida *et al*, 1993; Christison *et al*, 1995; Passarelli *et al*, 1997; Harada *et al*, 1998; Wang *et al*, 2007).

Em recente publicação, Oliveira e de Faria (2011) propuseram que a CETP, em conjunto com a HDL, poderiam funcionar como um mecanismo para reduzir as concentrações de LDLox no plasma, facilitando a remoção de lipídios oxidados através da lipoproteína.

A proteína de transferência de fosfolipídios (PLTP) é uma proteína sintetizada em vários tipos celulares e é capaz de transferir os fosfolipídios entre as lipoproteínas além de modular o tamanho e a composição das partículas de HDL (Samyn *et al*, 2009).

Um estudo realizado por Yang *et al* (2003) mostraram que a super-expressão de PLTP diminui o teor de vitamina E presente na LDL, elevando sua oxidação. Portanto a PLTP pode modular a deposição de colesterol nos macrófagos através de seu papel no status oxidativo dentro das células (Yazdanyar *et al*, 2011).

Para investigar o papel da PLTP na aterogenicidade, outros aspectos importantes, que não o transporte reverso de colesterol, precisam ser explorados, como a oxidação da lipoproteína, inflamação, conjunto de partículas que contém apoB100, funções intracelulares, e assim por diante (Yazdanyar *et al*, 2011).

A PLTP surgiu mais recentemente como um fator pró-aterogênico pela sua capacidade de aumentar a produção de lipoproteínas que contém apoB100, diminuindo sua proteção antioxidante e desencadeando a inflamação (Tzotzas *et al*, 2009). Dados recentes têm mostrado que as propriedades da PLTP expressa localmente em macrófagos e tecidos pode ser diferente da sua função na circulação. Há sugestões de que a PLTP tenha função pró-aterogênica na circulação (Yazdanyar *et al*, 2011).

Atuam também no metabolismo de lipídios e lipoproteínas as enzimas Lipoproteína Lipase (LPL) e a Lipase Hepática (LH). A LPL é responsável pela hidrólise de lipoproteínas ricas em TG, facilitando a transferência de FL e apolipoproteínas para HDL. A LH é primariamente uma fosfolipase, mas também possui atividade hidrolase para triacilgliceróis, atua de diversas maneiras no metabolismo de lipoproteína, sendo capaz de facilitar a interação entre lipoproteínas remanescentes com o receptor LRP “Low-Density Lipoprotein Receptor- Related Protein” nos hepatócitos. Participa, ainda, da conversão da HDL₂ para HDL₃ removendo triacilgliceróis e fosfolípidos da HDL. A elevada atividade da LH reduz as concentrações de HDL total (Mahley, 2003).

Estas lipases foram associadas tanto a efeitos pró-aterogênicos quanto anti-aterogênicos, em razão do papel central que exercem na atividade lipolítica endotelial (Hasham e Pillarisetti, 2006).

Existem, de maneira geral, pelo menos três maneiras pelas quais as lipases podem influenciar a aterosclerose: através do impacto nos níveis de lipoproteínas, através de reações inflamatórias nas células vasculares por produtos da lipólise e pelos efeitos diretos das lipases nas placas (Olivecrona e Olivecrona, 2010). As lipases podem causar pontes não enzimáticas de lipoproteínas aterogênicas para a de matriz extracelular e, promovendo retenção e possivelmente modificação das lipoproteínas, tornando-as mais aterogênicas (Tabas *et al*, 2007). Evidências diretas da importância da LPL nessa retenção foi obtida em estudos com camundongos transgênicos que expressam o LDL humana normal comparada com LDL com mutações no sítio de ligação de proteoglicanos de apoB100. A mutação reduziu a retenção de LDL e retardou o aparecimento da aterosclerose (Gustafsson *et al*, 2007).

Um estudo envolvendo o malondialdeído (MDA-LDL) e LH em pacientes portadores de hiperlipidemia familiar (HLF) demonstrou que as concentrações de MDA-LDL foram elevadas nos casos quando comparados aos controles e seus níveis se mostraram negativamente correlacionada com a atividade da LH. Estes achados indicam que as MDA-LDL podem contribuir para o processo aterogênico na HLF, principalmente quando associado a polimorfismos comuns da LH (Yamazaki *et al*, 2004).

Diversas linhas de evidência indicam que a LPL, e talvez também lipase endotelial (Wu *et al*, 2010), sejam pró-aterogênicas quando presentes na parede da artéria.

HDL e apoAI podem tornar-se disfuncionais ou mesmo pró-inflamatórias assim, promovendo a aterosclerose (Smith, 2010). apoAI é o componente predominante da HDL, e é conhecida por seu papel no transporte reverso do colesterol, além de serem relacionadas à ativação da LCAT (Martin *et al*, 2006; Shao *et al*, 2010) e inibição da LH (Ramsamy *et al*, 2000).

1.6. Espessura do complexo íntimo-medial das artérias carótidas (EIM)

Apesar dos progressos feitos no esclarecimento da fisiopatologia da aterosclerose, a causa e os mecanismos subjacentes ao seu desenvolvimento ainda necessitam maior compreensão (Perdomo e Dong, 2009). Desta forma, há uma emergente necessidade de que se estabeleçam métodos não invasivos e de baixo custo para avaliação da aterosclerose nos estágios em que ainda permaneça assintomática na população (Stern, 2008, Crouse *et al*, 2007).).

Recentemente, a mensuração ultra-sonográfica da espessura das camadas íntima e média das artérias carótidas (EIM) tem surgido como uma ferramenta na monitorização da aterosclerose e é utilizada como medida de desfecho substituto de eventos cardiovasculares, ante a associação com fatores de risco para doença arterial coronariana (DAC) e com eventos cardiovasculares incidentes (Torres *et al*, 2007).

Diante das evidências da relação da EIM com eventos cardiovasculares, em 2000 a V Prevention Conference concluiu que a medida da EIM pode ser considerada para estratificação de risco de doença coronariana (Greenland *et al*, 2000).

A medida do espessamento da camada íntima-média (EIM) das artérias carótidas apresenta boa correlação com a mortalidade cardiovascular e é utilizada para avaliar a extensão e a severidade da aterosclerose e monitorar intervenções terapêuticas, em estudos populacionais (Takahashi *et al*, 2004). Muitos estudos, que

investigaram o risco de IAM, utilizaram este parâmetro em suas análises (Chambless *et al*, 1997; O'Leary *et al*, 1999).

Os valores de EIM são utilizados pela American Heart Association (AHA) e pela diretriz Brasileira de prevenção de aterosclerose para avaliação do risco cardiovascular (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007). A medida da EIM das carótidas pode ser utilizada na pesquisa de doença cardiovascular subclínica, mesmo na ausência de outros fatores de risco (Bots *et al*, 1997). De fato, já foi demonstrado que para cada 0,1 mm de aumento da EIM há um incremento de 11% no risco de IAM e que um incremento na EIM de 0,03 mm ao ano está relacionado a um risco relativo de 3,1 para a ocorrência de morte por DAC, infarto IAM não-fatal e revascularização miocárdica (Hodis *et al*, 1998; Almeida *et al*, 2007).

É um método seguro, não-invasivo, sem exposição à radiação e de baixo custo, sendo útil tanto no diagnóstico como no acompanhamento da aterosclerose (Hovingh *et al*, 2005) em todas as suas fases, inclusive nas mais precoces (Dullaart *et al*, 2010). O uso da ultra-sonografia para quantificação da EIM carotídea possui boa reprodutibilidade, conforme já evidenciado por Bots *et al* (1993) e por Kanter *et al* (1997).

Vários estudos epidemiológicos prospectivos utilizaram a EIM como valor preditivo para DCV subclínica e clínica (Salonen *et al*, 1992; O'Leary *et al*, 1999; Fukumoto *et al*, 2000; Nambi *et al*, 2010).

Diversos estudos têm demonstrado a associação independente entre EIM e incidência de doenças cerebrovascular e coronariana, tornando a medida uma ferramenta valiosa na avaliação da aterosclerose e também do risco cardiovascular (Torres *et al*, 2007). A quantificação da velocidade de fluxo permite estratificar o risco de acidente vascular cerebral (AVC).

O estudo ARIC (The Atherosclerosis Risk in Communities) acompanhou 12841 pacientes sem eventos cardiovasculares prévios acompanhados por 5,2 anos. Foi realizada avaliação clínica e laboratorial dos pacientes, além da aferição da EIM. Os autores demonstraram uma taxa de eventos comparando EIM abaixo e acima de 1 mm igual a 5,07 para mulheres e de 1,85 para homens (Chambless *et al*, 1997). Os mesmos autores fizeram uma segunda publicação em 2000 com dados da população desse mesmo estudo para avaliação do risco de AVC. Encontraram aumento do risco de AVC em pacientes com maior EIM (Chambless *et al*, 2000).

Alguns estudos enfatizam a necessidade de padronização da metodologia para coleta das medidas da EIM (O'Leary *et al*, 2002; Lorenz *et al*, 2007). Entretanto, os protocolos que utilizam esse valor como preditivo para DCV ainda são heterogêneos

quanto à seleção do segmento carotídeo utilizado, valores médios ou máximos da EIM, medida de um ou dois lados, embora a reprodutibilidade tenha melhorado consideravelmente nas últimas décadas.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Estudar a associação e a ação aterogênica da lipoproteína de baixa densidade oxidada e dos anticorpos anti-LDL oxidada, em indivíduos adultos sem doença aterosclerótica estabelecida.

2.2. Específicos

- Medir as concentrações plasmáticas da LDL oxidada (LDLox), os títulos de anticorpos contra a LDLox (acLDLox) e o número de partículas de LDL oxidadas (LDLox/apoB100 e LDLox/LDL-C) na amostra populacional total e por tercís de LDLox e acLDLox.

- Determinar as atividades das proteínas de transferência de ésteres de colesterol (CETP), de transferência de fosfolípidos (PLTP) e da lipase hepática (LH) e lipoproteína lipase (LPL) na amostra populacional total e por tercís de LDLox e acLDLox.

- Avaliar as associações entre acLDLox, LDLox, LDLox/apoB100 e LDLox/LDL-C e dados antropométricos (índice de massa corpórea, circunferência da cintura, pressão arterial sistólica e diastólica) e com dados bioquímicos como, glicose, colesterol, triglicérides, lipoproteína de baixa densidade, lipoproteína de muito baixa densidade, lipoproteína de alta densidade, fosfolípidos, apolipoproteína AI, apolipoproteína B100, índice de Castelli I (C/HDL-C), estimativa de tamanho de LDL (TG/HDL-C) e as atividades da CETP, PLTP, LH e LPL.

- Determinar na amostra total e no maior tercil de LDLox e de acLDLox quais fatores, antropométricos e/ou bioquímicos entre os avaliados neste estudo são determinantes (análise multivariada) de acLDLox, e/ou oxLDL e dos índices do grau de oxidação/partícula de LDL.

- Determinar na amostra total e por tercil de LDLox e de acLDLox a espessura íntimo-medial das artérias carótidas (EIM) ou o valor máximo para determinar sua associação com acLDLox, LDLox e os índices do grau de oxidação/partícula de LDL.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. População do estudo

O presente estudo provém da análise estatística de um banco de dados do Laboratório de Lípidos/FCM/UNICAMP cujos procedimentos de seleção, coleta e análise laboratorial dos materiais foram realizados anteriormente de acordo com o protocolo experimental a seguir:

Para esse estudo foram selecionados 107 voluntários adultos, com valores laboratoriais dentro dos limites de referência e sem doença aterosclerótica estabelecida, de ambos os sexos, com idade entre 19 e 78 anos, procedentes da Universidade Estadual de Campinas.

Esses voluntários foram escolhidos após uma seleção preliminar onde foram realizados avaliação laboratorial (testes bioquímicos) e exame clínico (determinação de peso, altura, IMC, circunferência da cintura, entre outros). Todos os voluntários foram detalhadamente informados dos termos da pesquisa e, se de acordo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram excluídos do estudo os voluntários que apresentaram presença ou histórico de angina pectoris, IAM, hepatopatias, nefropatias, pneumopatias, endocrinopatias, diabetes mellitus, tabagistas, aqueles que possuíam consumo de álcool $\geq 75\text{g/dia}$ e que faziam uso de quaisquer medicamentos, incluindo anticoncepcionais.

Após a seleção, estes indivíduos responderam à um questionário que incluía história de procedimentos de revascularização coronária, angioplastia coronariana e revascularização coronariana e quando negados em relação à estes quesitos, foram orientados a comparecer ao laboratório para a coleta de sangue para as análises.

A punção venosa para obtenção de soro e/ou plasma ocorreu com o paciente em jejum de 12 horas. Uma parte do material foi submetida imediatamente às análises laboratoriais na Seção de Bioquímica Clínica do Hospital das Clínicas/UNICAMP e a outra parte foi armazenada por congelamento (-80°C) para realização posterior de outras análises, como determinação dos anticorpos anti-LDL oxidada, LDL oxidada e determinação das atividades da CETP, PLTP, LPL e LH, que ocorreram no Laboratório de Lípidos do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE)/UNICAMP.

Todos os exames clínicos e as coletas de sangue foram realizados nas dependências do Hospital das Clínicas da UNICAMP, no Setor de Coleta da Divisão de Patologia Clínica e em salas de procedimentos metabólicos do HC.

3.2. Análises Laboratoriais

O colesterol (C) e os triglicérides (TG) foram quantificados por métodos enzimático-colorimétricos, em sistema de automação Boehringer Mannheim Hitachi 917-Roche utilizando reagentes comerciais da Roche.

LDL-C foi determinado pela equação de Friedewald (Rifai *et al*, 1999); já o HDL-C por métodos diretos homogêneos (Nauck *et al*, 1997).

As apolipoproteínas apoA1 e apoB100 e a lipoproteína (a) foram analisadas por nefelometria em aparelho BNII/Marburg, utilizando reagentes Dade-Behring®.

Foi utilizada a razão TG/HDL-C para a determinação da estimativa de tamanho de LDL (Boizel *et al*, 2000). Além disso, utilizamos como estimativa para risco cardiovascular a razão COL/HDL-C (valor de referência ≤ 3) – Índice de Castelli I (Arcanjo *et al*, 2005).

As razões LDLox/LDL-C e LDLox/apoB100 estimaram o número de partículas de LDL oxidadas (Van der Zwan *et al*, 2009).

3.3. Determinação do Marcador de Oxidação: LDL oxidada

A concentração de LDL oxidada no plasma foi determinada através do kit Oxidized LDL ELISA, da Mercodia, um kit de ELISA de captura (também conhecido como ELISA sanduíche). As placas são sensibilizadas e revestidas com anticorpos murinos monoclonais mAb-4E6, anti-LDL oxidada. Pipetou-se 25uL de plasma e 100uL do tampão de ensaio em cada *well*, as placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente (18-25°C). Depois, as placas foram lavadas seis vezes com 350uL de tampão de lavagem por *well*. Adicionou-se, então, 100uL do conjugado, que consiste de anticorpo monoclonal anti-apoB100 conjugado a uma peroxidase. As placas foram incubadas novamente por 1 hora, à temperatura ambiente (18-25°C). Após incubação, foram lavadas, e adicionou-se 200uL de substrato contendo TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) e peróxido de hidrogênio. Na presença da peroxidase, o peróxido de hidrogênio libera oxigênio o qual oxida o TMB. Incubou-se, no escuro, por 15 minutos, para essa reação ocorrer, e depois foi adicionado 50uL de solução de parada, que torna a coloração amarelada. A leitura da placa foi realizada à 450nm.

O padrão é diluído em 5 concentrações conhecidas. Montou-se a curva-padrão em um gráfico, calculou-se a equação da reta, e a partir das absorbâncias das amostras, calculou-se as concentrações de LDL oxidada no plasma, em U/L (Holvoet *et al*, 2001).

3.4. Determinação do Marcador Imunológico: Anticorpos anti-LDLox

Os anticorpos anti-LDL oxidada foram determinados pelo método ELISA, utilizando LDL altamente oxidada como antígeno de acordo com Gidlund *et al*, 1996.

Placas de 96 poços (Costar®, cód. 3690) foram sensibilizadas com 50 µl/poço de antígeno (1mg/ml) diluídas em tampão pH 9,4. As placas foram armazenadas à 4°C *overnight*. Após este período, as placas foram lavadas quatro vezes com 100 ml de tampão PBS e bloqueadas com 5% de solução de leite desnatado (Molico/Nestlé, SP, Brazil), e foram incubadas por 2h à temperatura ambiente. Após uma segunda lavagem, amostras de soro diluídas (1:200) (50 µl) foram adicionadas aos poços e as placas mantidas por 2h à temperatura ambiente. Em seguida foram realizadas quatro lavagens com 100 ml em PBS/Tween 20, e foi adicionado o anticorpo anti-IgG de camundongo desenvolvido em coelho e conjugado com peroxidase (50 µl, diluído à 1:1500). Após 1h de incubação à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas. O substrato para a enzima (75 µl/poço) mais 250 mg de tetrametilbenzidina diluído em 50 µl de DMSO, 10 ml de H₂O₂ e 12ml de tampão citrato (pH 5,5) foram adicionados e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente; e a reação foi suspensa com 25mL de 2,0 M de ácido sulfúrico. A leitura da densidade óptica foi realizada em 450 nm.

Para avaliar a amplitude da variabilidade da reação do grupo controle para o anti-LDLox utilizamos o valor da média com seu desvio padrão que oscilou de 0,17 a 0,65.

Numa possível comparação entre as diferentes baterias de ensaios para a determinação de anticorpos foi utilizado um controle interno (IgG total com concentração 100mg/ml – Santa Cruz Biotechnology) e um controle branco (usando PBS no lugar da amostra) em cada placa. Desta maneira os resultados foram expressos através da Absorbância relativa calculada pela seguinte fórmula: Abs relativa = {(Abs anticorpo)-(Abs branco)}. (Abs controle interno). (Chen *et al*, 1988; Boschcov *et al*, 2000; Damasceno *et al*, 2000; Ketelhuth *et al* 2001).

3.5. Determinação das atividades de LH, LPL, CETP e PLTP

As atividades da LH e da LPL foram obtidas por um método radiométrico através da medida da liberação de ácidos graxos livres resultantes da hidrólise de um substrato artificial de trioleína triciada (Ehnholm e Kuusi, 1986), em plasma pós-heparina (100 Unidades de heparina endovenosa/Kg peso corporal). O substrato foi

preparado pela adição de trioleína fria [(1, 2, 3-Tris [cis-9-octadecenoleo]glicerol)] e trioleína radioativa [[9,103H] (N)-trioleína], atividade específica de 26,8 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, EUA) estabilizadas por uma solução de goma arábica a 5% (Sigma, St Louis, MO, EUA). A mistura foi submetida à sonicações alternadas, 8 vezes de 30 segundos em sonicador Branson Cell Disruptor (Branson Sonifier modelo 450, Danbury, EUA), com ponta de titânio de 1 cm de diâmetro. A albumina bovina sérica livre de ácidos graxos à 10% é acrescentada após a sonicação para quelar os ácidos graxos livres, e a LPL é inibida pela adição de 2M NaCl. A reação foi incubada por 60 minutos à 37° C e interrompida com a adição de uma solução de metanol: clorofórmio: heptano (1,41: 1,25: 1; V/V/V), seguida de uma mistura de bicarbonato de potássio/ácido bórico (pH=10,5). A radioatividade foi determinada num contador de cintilação líquida modelo LS-5000/ 75B (Beckman, Beckman Instruments, Palo Alto, EUA). A atividade de LPL foi calculada pela diferença entre as atividades de lipase total e LH e expressas como nmoles de ácidos graxos liberados/mL de plasma/ por hora.

A atividade da CETP foi determinada por ensaio exógeno que quantifica a transferência de colesteril éster (CE) radioativo e usa o plasma como fonte de CETP, segundo método radiométrico exógeno (Lagrost *et al*, 1998). As partículas aceptoras de CE (LDL e VLDL, $d \leq 1,063$ g/mL) foram obtidas a partir de um *pool* de soros normolipidêmicos por ultracentrifugação seqüencial, em ultracentrifugas modelo L80/75B da Beckman (Bekman Instruments), utilizando um rotor 50Ti. As HDL foram radioisotopicamente marcadas com [4-¹²C]-colesteril oleate (New England Nuclear) e purificadas por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade. Os ensaios de transferência de ésteres de colesterol consistiram na adição do doador marcado, do aceptor, do tampão Tris pH 7,4 e de soro como fonte de CETP, sendo esta mistura homogeneizada, incubada por 4 horas à 37°C, resfriada e precipitada com uma solução de 1M de sulfato de dextrana e cloreto de magnésio (1:1). Após a centrifugação por 15 minutos a 3000 rpm (4°C), o sobrenadante foi coletado para a contagem da radioatividade num contador de cintilação líquida Beckman modelo LS-5000 (Beckman Instrumments) e a atividade da CETP como porcentagem da transferência de colesteril ester calculada pela equação: % de transferência de CE= $[1 - (\text{dpm amostra}/\text{dpm branco}) \times 100]$.

A atividade da PLTP foi mensurada através da medida de transferência de [14C]fosfatidilcolina, entre lipossomas e HDL (Damen *et al*, 1982). Para preparar 1mL de lipossomas radioativamente marcados, secou-se, num frasco limpo, contendo 125µmol de fosfatidilcolina, 14C fosfatidilcolina e hidroxitolueno butilado. A mistura

lipídica foi sonicada com tampão contendo NaCl (150mM), tris-HCl (10mM) e EDTA (1mM), pH7,4; repetindo por 3 vezes durante 5 minutos em gelo. As amostras de plasma como fonte de PLTP (10µL) foram incubadas por 1 hora a 37°C com o lipossoma marcado radioativamente (125 nmol de FL), HDL (250µg de proteína) e tampão Tris, pH 7,4 (NaCl 150mM, Tris-HCl 10mM e EDTA 1mM), para um volume final de 400µL. Os lipossomas foram precipitados com solução precipitante (500mM de NaCl, 125mM de MgCl₂ e 140U de heparina/tubo), e o sobrenadante coletado para determinar a medida da radiatividade. A porcentagem de transferência de FL foi calculada através da equação: % de transferência de FL radioativo = (dpm amostra-dpm branco/dpm total-dpm branco) x 100.

3.6. Determinação da espessura íntimo-medial de artérias carótidas

Para a determinação da espessura da camada íntimo-medial das carótidas, os pacientes foram examinados em decúbito dorsal com a cabeça elevada em cerca de 20° e com rotação de 45°. Foi realizada a ultrasonografia Doppler, utilizando equipamentos ATL HDI 1500 (ATL) e Logic 400 (General Electric Healthcare, Milwaukee, EUA), com transdutores lineares de 4-12 MHz. O protocolo, em todos os casos, foi realizado pelo mesmo médico ultra-sonografista Dr. Rui T. Nakamura. Foram realizadas escaneamento da parede posterior, à 1 cm distal das artérias comuns, tanto no lado direito quanto no lado esquerdo do pescoço, de acordo com o preconizado na literatura (Simons *et al*, 1999). Os resultados foram expressos como média aritmética das espessuras (em milímetros) das carótidas direita e esquerda, que foram aferidas por cinco vezes cada uma.

3.7. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os softwares SAS 9.1.3 (SAS Institute Inc.), SPSS 16.0 com o apoio do Setor de Estatística da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Foram realizadas as seguintes análises:

- Para comparação de variáveis numéricas entre os grupos, sem correção para covariáveis, utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn;
- Para comparação de variáveis numéricas entre os grupos, com correção para covariáveis, idade, sexo, índice de massa corpórea e pressão arterial sistólica por ANCOVA: utilizou-se o ANCOVA seguido do teste de comparação múltipla Tukey Kramer;

- Para comparação de variáveis categóricas entre os grupos utilizou-se o Qui-quadrado.

- Para correlação dentre as variáveis e os grupos, foi utilizado o teste de Spearman parcial com correção para covariáveis, idade, sexo, índice de massa corpórea e pressão arterial sistólica por ANCOVA.

A análise de regressão linear múltipla foi realizada utilizando o critério *stepwise* de seleção das variáveis para acessar a influência das variáveis de interesse, independentemente, sobre a os acLDLox, LDLox, LDLox/apoB100 e LDLox/LDL-C. Os resultados foram expressos como coeficientes de determinação R^2 que representa a percentagem de variação na variável dependente explicada pelas variáveis independentes.

Os resultados analisados foram expressos como médias $\pm$ desvio padrão e utilizou-se o nível de significância de 5,0% para as diferenças significativas e para limítrofes de 5 a 9%: $p > 0,05$ e $\leq 0,09$.

4. RESULTADOS

A tabela 2 resume as características clínicas da população total estudada e por tercís de acLDLox e LDLox, que foram classificados conforme abaixo:

acLDLox: *tercil baixo (B)* (≤ 0.23 OD, n=34); *intermediário (I)* (0.24 - 0.35 OD, n= 34) e *alto (A)* (≥ 0.36 OD, n= 34).

LDLox: *tercil baixo (B)* (≤ 46.2 U/L, n= 35); *intermediário (I)* (46.3 - 69.9 U/L, n= 36) e *alto (A)* (≥ 70.0 U/L, n= 36).

Há uma sobreposição de indivíduos pertencentes aos mesmos tercís para os 2 grupos: no baixo (22%); no intermediário (11%) e no alto (16%).

Tabela 2. Características clínicas da população total estudada e por tercís de acLDLox e LDLox

Variáveis	Todos (n=107)	acLDLox				LDLox			
		B (≤ 0.23 DO) (n=30-34)	I (0.24-0.35 DO) (n=34)	A (≥ 0.36 DO) (n=33-34)	p	B (≤ 46.2 U/L) (n=33-35)	I (46.3-70 U/L) (n=34-36)	A (≥ 70.1 U/L) (n=34-36)	p
Idade (anos)	42 $\pm$ 16	34 $\pm$ 13 ^a	39 $\pm$ 14 ^a	52 $\pm$ 15 ^b	≤ 0.001	29 $\pm$ 9 ^a	46 $\pm$ 16 ^b	50 $\pm$ 13 ^{a,b}	≤ 0.001
Sexo (F/M)	71/36	19/15 ^a	21/13 ^{a,b}	28/06 ^b	0.052	20/15 ^{a,b}	21/15 ^a	30/6 ^b	0.030
IMC (Kg/m ²)	25 $\pm$ 5	23 $\pm$ 2 ^a	25 $\pm$ 4 ^{a,b}	26 $\pm$ 5 ^b	0.014	22 $\pm$ 3 ^a	25 $\pm$ 4 ^b	26 $\pm$ 4 ^b	≤ 0.001
CC (cm)	80 $\pm$ 10	77 $\pm$ 9 ^a	79 $\pm$ 12 ^{a,b}	83 $\pm$ 11 ^b	0.068	74 $\pm$ 8 ^a	82 $\pm$ 13 ^b	83 $\pm$ 10 ^{a,b}	0.001
PAS (mmHg)	123 $\pm$ 15	118 $\pm$ 9	125 $\pm$ 17	127 $\pm$ 16	NS	115 $\pm$ 11 ^a	130 $\pm$ 18 ^b	124 $\pm$ 13 ^{a,b}	≤ 0.001
PAD (mmHg)	80 $\pm$ 10	77 $\pm$ 7	81 $\pm$ 12	81 $\pm$ 8	NS	75 $\pm$ 9 ^a	83 $\pm$ 10 ^b	81 $\pm$ 9 ^{a,b}	0.005

Valores expressos em média $\pm$ DP. acLDLox: auto-anticorpos anti-LDL oxidada. LDLox: lipoproteína de baixa densidade oxidada. B: Tercil baixo. I: Tercil intermediário. A: Tercil alto. IMC: Índice de massa corpórea. CC: Circunferência da cintura. PAS: Pressão arterial sistólica. PAD: Pressão arterial diastólica. Testes Mann-Whitney, Qui-quadrado e Kruskal-Wallis foram usados. ^{a, b, c} Grupos com a mesma letra não são significativamente diferentes. $p \leq 0.05$: diferença significativa e $0.05 < p < 0.10$, borderline.

Com o aumento do tercil de acLDLox, houve aumento da idade e IMC assim como a incidência do sexo feminino e CC ($p=0.068$). Em contrapartida, com o aumento dos tercís de LDLox todos os parâmetros clínicos foram maiores: idade, sexo (feminino), IMC, CC e pressão arterial. A partir da observação desses resultados, os parâmetros antropométricos idade, sexo, IMC e PAS foram corrigidos por ANCOVA nas demais análises.

A tabela 3 apresenta os parâmetros bioquímicos estudados.

Tabela 3. Lípides, Lipoproteínas, Apolipoproteínas, Lipases e Atividades de proteínas de transferência dos anticorpos anti-LDL oxidada e LDL oxidada na população total e por tercís de acLDLox e LDLox

Variáveis	Todos (n=107)	acLDLox				LDLox			
		B (≤ 0.23 DO) (n=31-34)	I (0.24-0.35 DO) (n=31-34)	A (≥ 0.36 DO) (n=30-34)	p	B (≤ 46.2 U/L) (n=33-35)	I 46.3-70 U/L) (n=34-36)	A (≥ 70.1 U/L) (n=29-36)	p
C (mg/dL)	198 ± 56	180 ± 56	199 ± 63	217 ± 43	NS	155 ± 47 ^a	204 ± 41 ^{a,b}	233 ± 49 ^b	≤ 0.001
TG (mg/dL)	87 ± 43	85 ± 45	95 ± 53	82 ± 27	NS	71 ± 38	89 ± 42	100 ± 43	NS
LDL-C (mg/dL)	116 ± 38	106 ± 33	115 ± 45	127 ± 34	NS	85 ± 21 ^a	118 ± 29 ^b	142 ± 38 ^c	≤ 0.001
VLDL-C (mg/dL)	17 ± 8.6	17 ± 9	19 ± 10	16 ± 5	NS	14 ± 7	17 ± 8	20 ± 8	NS
HDL-C (mg/dL)	66 ± 24	58 ± 30	65 ± 19	74 ± 16	NS	57 ± 30	69 ± 19	70 ± 17	NS
FL (mg/dL)	216 ± 50	219 ± 51	209 ± 46	219 ± 55	NS	195 ± 49	217 ± 36	239 ± 55	NS
apoAI (mg/dL)	164 ± 37	147 ± 27	165 ± 36	183 ± 39	NS	141 ± 33	172 ± 31	177 ± 37	NS
apoB100 (mg/dL)	93 ± 31	85 ± 26	94 ± 36	100 ± 28	NS	68 ± 17 ^a	97 ± 25 ^b	113 ± 28 ^c	≤ 0.001
C/HDL-C	3.1 ± 0.7	3.0 ± 0.8	3.0 ± 0.7	2.7 ± 0.7	NS	2.7 ± 0.7 ^a	3.0 ± 0.6 ^{a,b}	3.3 ± 0.8 ^b	0.013
TG/HDL-C	1.4 ± 0.8	1.4 ± 1.0	1.2 ± 0.8	1.1 ± 0.6	0.086	1.0 ± 0.7	1.2 ± 0.8	1.2 ± 0.8	NS
LH (nmol FFA/mL/h)	2137 ± 1383	2801 ± 1357 ^a	1805 ± 1252 ^{a,b}	1672 ± 1044 ^b	0.039	2552 ± 1372	2061 ± 1270	1792 ± 1442	NS
LPL (nmol FFA/mL/h)	2530 ± 1257	2203 ± 954	2695 ± 1238	2751 ± 1500	NS	2442 ± 876	2660 ± 1280	2479 ± 1557	NS
CETP (% de transferência)	14 ± 7.8	16 ± 7	13 ± 7	13 ± 8	NS	17.3 ± 7.0 ^a	11.6 ± 6.6 ^a	13.0 ± 8.5 ^{a,b}	0.029
PLTP (% de transferência)	15 ± 10	12.8 ± 10	13.4 ± 9	19.2 ± 11	NS	11 ± 7	14.7 ± 11	20 ± 10	NS
Glicose (mg/dL)	83 ± 8	84 ± 9	85 ± 9	81 ± 6	NS	83 ± 8	85 ± 9	83 ± 8	NS

Valores expressos em média ± DP. acLDLox: auto-anticorpos anti-LDL oxidada. LDLox: lipoproteína de baixa densidade oxidada. B: Tercil baixo. I: Tercil intermediário. A: Tercil alto. C: Colesterol. TG: Triglicerídios. LDL-C: Lipoproteína de baixa densidade. VLDL-C: Lipoproteína de muito baixa densidade. HDL-C: Lipoproteína de alta densidade. FL: Fosfolípidess. apoAI: Apolipoproteína AI. apoB100: Apolipoproteína B100. C/HDL-C: Índice de Castelli I. TG/HDL-C: Estimativa de tamanho da LDL. LH: Lipase hepática. LPL: Lipoproteína Lipase. CETP: Proteína de transferência de ésteres de colesterol. PLTP: Proteína de transferência de fosfolípides. Testes Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e Tukey Kramer foram usados, valor de p ajustado para idade, sexo, IMC e PAS por ANCOVA. p≤0.05: ^{a, b, c}. Grupos com a mesma letra não são significativamente diferentes. p≤0.05: diferença significativa e 0.05 < p > 0.10, borderline.

No grupo dos acLDLox, o único parâmetro bioquímico que tendeu à diminuição nos tercís foi TG/HDL-C, o tamanho estimado da LDL. Já no grupo LDLox, os parâmetros C, LDL-C, apoB100, e C/HDL-C apresentaram-se aumentados. Não houve variação na LPL com os tercís para ambos os marcadores. A atividade de LH diminuiu significativamente no grupo dos acLDLox entre os tercís. No tercil alto do grupo LDLox houve uma diminuição significativa na atividade da CETP, já a atividade da PLTP não se alterou em nenhum dos grupos, assim como a glicose.

A Tabela 4 apresenta as variações entre os tercís dos grupos de anticorpos anti-LDL oxidada, LDL oxidada e marcadores de oxidação da LDL.

TABELA 4. Anticorpos anti-LDLox, LDL oxidada, razões LDLox/apoB100 e LDLox/LDL-C na população total e por tercís de acLDLox e LDLox

Variáveis	Todos (n=107)	<i>acLDLox</i>				<i>LDLox</i>			
		B (≤ 0.23 DO) (n=34)	I (0.24-0.35 DO) (n=34)	A (≥ 0.36 O DO) (n=34)	p	B (≤ 46.2 U/L) (n=34-35)	I (46.3-70 U/L) (n=35-36)	A (≥ 70.1 U/L) (n=33-36)	p
acLDLox (DO)	0.32 ± 0.16	0.16 ± 0.04	0.28 ± 0.03	0.51 ± 0.12	-	0.25 ± 0.13	0.34 ± 0.15	0.37 ± 0.18	NS
LDLox (U/L)	62.9 ± 28.1	49 ± 20	64 ± 30	69 ± 21	NS	35 ± 8.21	58 ± 6.72	95 ± 20.50	-
LDLox/apoB100 (U/g)	6.83 ± 2.66	5.83 ± 1.53	6.80 ± 1.85	6.95 ± 2.40	0.076	5.30 ± 1.34	6.27 ± 1.41	8.85 ± 3.28	≤ 0.001
LDLox/LDL-C (U/mmol)	21.14 ± 7.80	18.19 ± 4.76	21.46 ± 6.36	21.94 ± 6.92	NS	16.32 ± 4.47	19.74 ± 4.01	27.23 ± 9.23	≤ 0.001

Valores expressos em média ± DP. acLDLox: auto-anticorpos anti-LDL oxidada. LDLox: lipoproteína de baixa densidade oxidada. B: Tercil baixo. I: Tercil intermediário. A: Tercil alto. LDLox/apoB100 e LDLox/LDL-C: Graus de oxidação da LDL. Testes Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e Tukey Kramer tests foram usados. Valor de p ajustado para idade, sexo, IMC e PAS por ANCOVA. p≤0.05: diferença significativa e 0.05 < p > 0.10, borderline.

Com o aumento dos títulos de acLDLox, houve uma tendência de aumento na razão LDLox/apoB100 e não foram observadas alterações no parâmetro LDLox. Já com aumento das concentrações de LDLox, houve aumento significativo nas 2 razões LDLox/apoB100 e LDLox/LDL-C (p≤0.001), mas não ocorreu mudanças no parâmetro acLDLox neste grupo.

As correlações entre acLDLox, LDLox, razões LDLox/apoB100 e LDLox/LDL-C com parâmetros bioquímicos, lipases e proteínas de transferência são mostradas na tabela 5.

Tabela 5. Coeficientes Parciais de Correlação de Spearman para acLDLox, LDLox, razões LDLox/apoB100 e LDLox/LDL-C com variáveis bioquímicas, lipases e proteínas de transferência na população total

Parâmetros	Variáveis	r	P
LDLox (n=105-107)	C (mg/dL)	0.409	≤ 0.001
	LDL-C (mg/dL)	0.546	≤ 0.001
	apoB100 (mg/dL)	0.519	≤ 0.001
	C/HDL-C	0.429	≤ 0.001
	CETP(% de transferência)	-0.210	0.039
LDLox/apoB100 (n=107)	LDLox (U/L)	0.703	≤ 0.001
LDLox/LDL-C (n=98-107)	LDLox (U/L)	0.706	≤ 0.001
	PLTP (% de transferência)	0.219	0.036

C: Colesterol. LDL-C: Lipoproteína de baixa densidade. apoB100: apolipoproteína B100. C/HDL-C: índice de Castelli I. CETP: Proteína de transferência de ésteres de colesterol. LDLox: Lipoproteína de baixa densidade oxidada. PLTP: Proteína de transferência de fosfolípidos. Valor de p ajustado por idade, sexo, IMC e PAS por ANCOVA. p ≤ 0.05: diferenças significativas.

Também realizamos o teste de correlação de spearman entre EIM média e acLDLox, ajustando para LDLox além das outras variáveis usadas acima e EIM com LDLox ajustando para acLDLox e observamos correlações significativas e limítrofes, $p=0.041$ e $p=0.059$, respectivamente.

A fim de avaliar se algumas das relações observadas na análise univariada são independentes umas das outras, efeitos metabólicos e antropométricos de várias variáveis foram estudadas e vários modelos de análise de regressão linear multivariada foram propostas: variáveis dependentes acLDLox, LDLox, LDLox/apoB100 e LDLox/LDL-C; variáveis independentes idade, sexo, IMC, CC, PAD, C, TG, LDL-C, HDL-C, apoAI, apoB100, LH, LPL, CETP, PLTP. A tabela 6 apresenta os resultados da análise multivariada na população total.

Tabela 6. Análise de regressão multivariada para acLDLox, LDLox, razões LDLox/apoB100 e LDLox/LDL-C na população total

Variáveis dependentes	Variáveis selecionadas	B (EP)	P	R ² parcial
acLDLox (n=90)	apoAI	0.002 (0.001)	0.047	0.0398
LDLox (n=92)	apoB100*	0.781 (0.114)	≤ 0.001	0.2349
	CETP*	-0.129 (0.051)	0.014	0.0199
	PLTP*	0.095 (0.046)	0.043	0.0178
LDLox/apoB100 (n=92)	-	-	-	-
LDLox/LDL-C (n=92)	-	-	-	-
LDL-C (n=92)	apoB100	0.861 (0.049)	<0.001	0.4563

*Variáveis transformadas em logaritmo devido à ausência de distribuição normal. B: valor da estimativa ou coeficiente angular. (EP): erro padrão. R²: Coeficiente de determinação. Análise multivariada: controlada por idade, sexo, IMC, PAS e HDL-C. Ajuste de regressão linear utilizando o método *stepwise* de seleção de variáveis: sexo, idade, IMC, CC, PAS, PAD, C, TG, LDL-C, HDL-C, apoAI, apoB100, LH, LPL, CETP, PLTP.

acLDLox foi associada negativamente com PLTP ($R^2=12.44$, $p\leq 0.044$) nas análises univariadas. As análises multivariadas indicam que na população total, acLDLox foi determinada somente pela apoAI, já LDLox foi determinada principalmente pela apoB100, CETP (inversamente) e PLTP.

No modelo de regressão linear controlados por idade, sexo, IMC, PAS e HDL-C nenhuma das razões LDLox/LDL-C e LDLox/apoB100 foram associadas com as variáveis selecionadas.

LPL e LH não explicaram nenhuma das variáveis dependentes estudadas. LDL-C na população total mostrou uma forte regulação pela apoB100 ($R^2=0.8659$ and $p<0.001$). Sequencialmente, as mesmas variáveis dependentes da análise de regressão multivariada acima foram testadas somente no tercil mais alto do acLDLox e LDLox. Observamos que a LDLox foi fortemente determinada pelo IMC (R^2 parcial=0.6311, $p\leq 0.006$), e nenhuma variável apareceu explicando o acLDLox nesse tercil.

Nós medimos as consequências dos aumentos dos títulos de acLDLox e LDLox sobre a EIM das carótidas e em seu valor máximo, como mostrado na tabela 7.

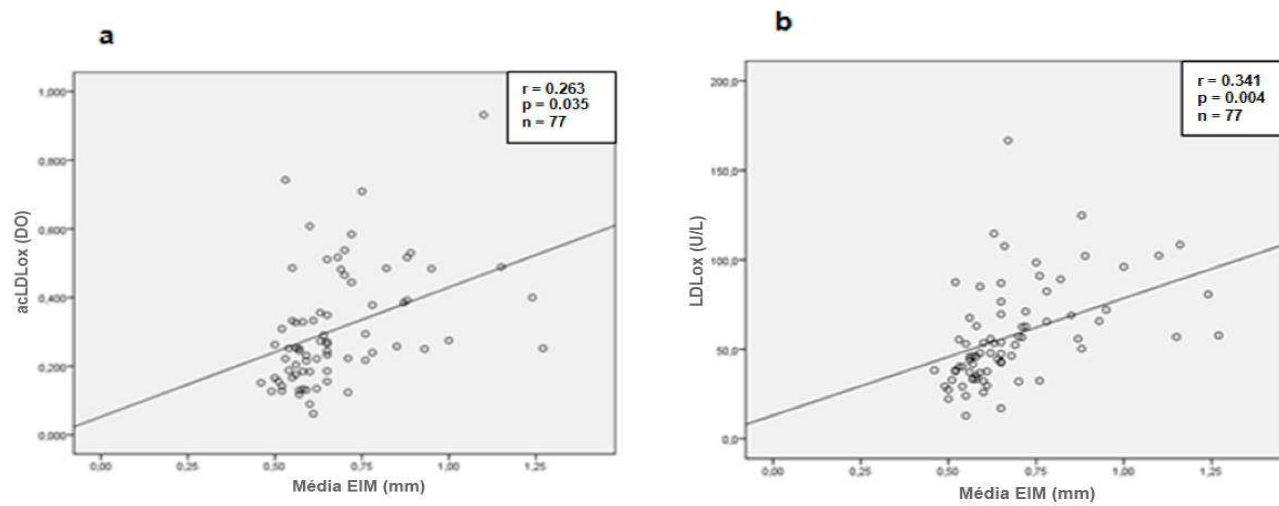
TABELA 7. Espessura da artéria carótida comum na população total e por tercils de acLDLox e LDLox

Variáveis	Todos (n=77)	acLDLox				LDLox			
		B (≤ 0.23 DO) (n=29)	I (0.24-0.35 DO) (n=23)	A (≥ 0.36 DO) (n=21)	p	B (≤ 46.2 U/L) (n=33)	I (46.3-70 U/L) (n=25)	A (≥ 70.1 U/L) (n=19)	p
EIM média (mm)	0.69 $\pm$ 0.21	0.58 $\pm$ 0.06	0.72 $\pm$ 0.28	0.80 $\pm$ 0.18	0.068	0.57 $\pm$ 0.05 ^a	0.72 $\pm$ 0.18 ^b	0.86 $\pm$ 0.29 ^b	0.003
EIM máx (mm)	1.27	0.76	1.27	1.24	-	0.76	1.27	1.24	-

Valores expressos em média $\pm$ DP. acLDLox: auto-anticorpos anti-LDL oxidada. LDLox: lipoproteína de baixa densidade oxidada. B: Tercil baixo. I: Tercil intermediário. A: Tercil alto. EIM média: média da espessura íntimo-medial das artérias carótidas. EIM máx: valor máximo da espessura íntimo-medial das artérias carótidas. Testes Kruskal Wallis e Tukey Kramer foram usados. Valor de p ajustado para idade, sexo, IMC e PAS por ANCOVA. $p\leq 0.05$: diferença significativa e $0.05 < p > 0.10$, borderline.

Observamos aumento limítrofe na EIM média com aumento dos títulos de acLDLox, já para LDLox, o aumento da EIM média foi significativo. O valor da EIM máx é semelhante em ambos os grupos.

Os *scatter plots* mostram a relação da EIM média com acLDLox, LDLox e com as razões LDLox/apoB100 e LDLox/LDL-C.



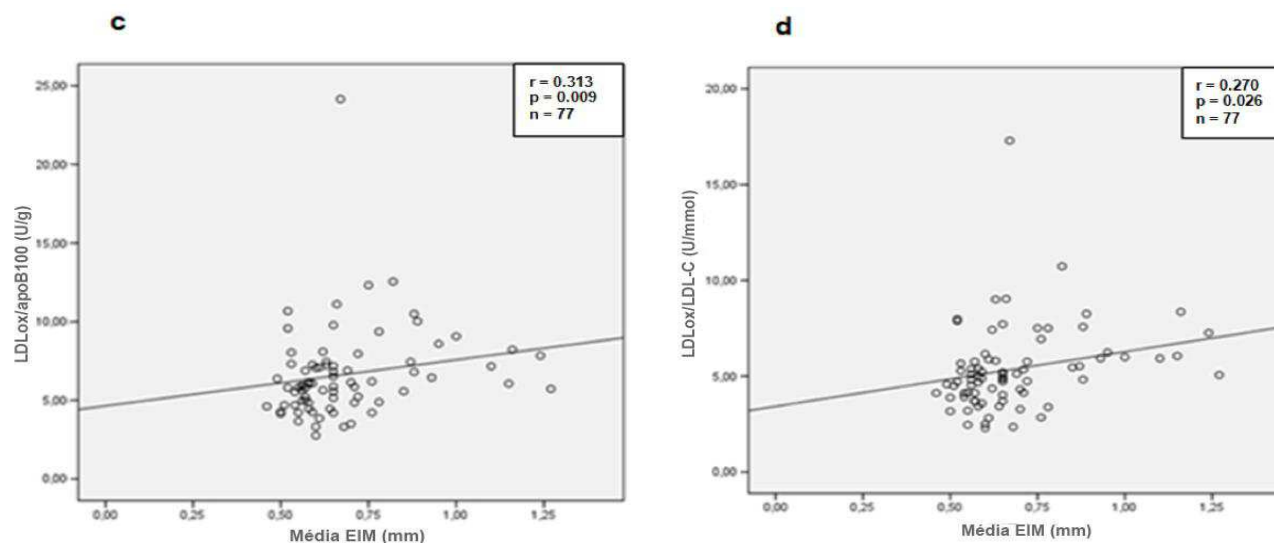


Figura 2 a-d: Correlações parciais similares positivas da EIM média com acLDLox, LDLox, razões LDLox/apoB100 e LDLox/LDL-C na população total. Correlações avaliadas pelo teste de Spearman. Valor de p ajustado por idade, sexo, IMC e PAS por ANCOVA. $p \leq 0.05$: diferenças significativas.

A figura 2 mostra associações positivas e significativas entre os marcadores e EIM média, após correção por parâmetros antropométricos. Houve grande semelhança nessas associações, sugerindo a presença de imunocomplexos na parede carotídea

5. DISCUSSÃO GERAL

A aterosclerose é um processo fisiopatológico de grande complexidade (Hansson e Hermansson, 2011). Embora existam diversas hipóteses para explicar a origem da disfunção endotelial aterosclerótica, vários pesquisadores apontam a oxidação da LDL como sendo um dos principais eventos para o desenvolvimento da aterosclerose (Libby, 2009; Sigala *et al*, 2010; Hansson e Hermansson, 2011).

A aterosclerose é modulada por resposta imunológica. A modificação oxidativa da LDL induz a formação de epítomos imunogênicos na molécula de LDL, o qual leva a formação de anticorpos contra a LDLox, que pode ser detectada no soro (Palinski e Witztum, 2000) assim como em lesões ateroscleróticas humanas (Ishigaki *et al*, 2009) e de animais de laboratório (Witztum e Steinberg, 2001). Estudos têm demonstrado que os acLDLox podem bloquear a captação de LDLox pelos macrófagos em lesões ateroscleróticas, sugerindo um possível papel protetor para a formação de células espumosas (Shaw *et al*, 2001). A literatura é controversa quanto à função destes anticorpos, ora mostrando seus efeitos anti-aterogênicos, ora efeitos pró-aterogênicos (Scherer *et al*, 2002).

Nesse estudo, avaliamos 107 voluntários adultos, sem doença aterosclerótica estabelecida, e de ambos os sexos, procedentes da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. Os objetivos foram estudar parâmetros metabólicos e efeitos aterogênicos de concentrações plasmáticas crescentes da LDLox, de seu número de partículas, e dos títulos de anticorpos anti-LDL oxidada.

Observamos que a LDLox correlacionou-se fortemente com concentração de LDL-C e apoB100 no plasma. Resultados semelhantes foram encontrados por Shoji *et al* (2000) em plasma de 130 indivíduos saudáveis. Eles descreveram uma correlação positiva provavelmente em função de substrato para a oxidação da LDL. Em contrapartida, outro estudo (Wang e Steinberg, 2007) que estudou 86 pacientes submetidos à ultrassonografia das carótidas, não mostrou nenhuma correlação entre estes parâmetros e sugeriu que a oxidação da LDL não ocorre no plasma, mas sim na parede arterial.

Demonstramos que não há nenhuma correlação entre anticorpos anti-LDLox plasmático e LDLox. Resultados semelhantes foram observados por Wang *et al* (2007), que estudou 86 pacientes submetidos à ultrassonografia das carótidas. Essa falta de correlação entre acLDLox e LDLox pode ser explicada primeiramente pela geração de anticorpos circulantes em resposta à LDLox no tecido aterosclerótico. De fato, em camundongos e em humanos com aterosclerose, os níveis de acLDLox no sangue correlacionam-se bem com o teor de LDLox no tecido arterial (Smook *et al*, 2008). Entretanto, muitos dos estudos utilizam a concentração de acLDLox para refletir

a extensão de oxidação da LDL *in vivo* (Chen *et al*, 2008; Medeiros *et al*, 2010; Rouhl *et al* 2010). Já, de acordo com Shoji *et al* (2000), encontraram uma correlação negativa entre acLDLox e LDLox.

A LDL totalmente oxidada não é tipicamente encontrada na circulação, pois é rapidamente removida pelo sistema reticuloendotelial, processo acelerado pela ligação com os anticorpos.

A produção de anticorpos pode ser gerada em resposta à outras proteínas oxidadas ou à proteínas conjugadas à lipídes oxidados. O'Brien *et al* (1996) demonstraram que os anticorpos anti-LDLox podem reconhecer outros epítomos oxidados de uma variedade de proteínas da placa, além de LDLox. Além disso, a LDL oxidada é uma mistura de muito produtos heterogêneos de modificação de lipoproteínas (Itabe *et al*, 1998).

Como as concentrações plasmáticas de LDLox correlacionaram-se positivamente e fortemente com LDL-C, examinamos se essa associação era independente e quais as variáveis que poderiam predizer LDLox, número de partículas de LDLox, acLDLox e LDL-C através de uma análise de regressão linear multivariada, onde selecionou-se parâmetros de explicação da relação entre as variáveis.

Diferentemente da LDL-C, que mostrou-se fisiologicamente explicada principalmente pela apoB100, as variáveis determinantes para a LDLox foram a apoB100, proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP) (inversamente) e proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP).

A proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP) atua na transferência de ésteres de colesterol das HDL para as VLDL, IDL e lipoproteínas remanescentes e faz o caminho inverso para os triacilgliceróis, desempenhando papel muito importante no transporte reverso de colesterol (TRC).

Demonstramos que a atividade da CETP foi menor no maior tercil LDLox (24%) e apresentou uma relação inversa com a oxidação da LDL, como descrito anteriormente em outros estudos (Castilho *et al*, 2001; Wang *et al*, 2007) já que a CETP transfere lípidos oxidados das lipoproteínas que contém apoB100 para as HDL, agindo como uma proteína anti-aterogênica.

A LDLox foi positivamente regulada pela PLTP, um importante modulador do metabolismo de lipoproteínas, capaz de transferir os fosfolípidios entre as lipoproteínas além de modular o tamanho e a composição das partículas de HDL e o efluxo dos tecidos periféricos e na produção de VLDL hepática (Samyn *et al*, 2009). PLTP também desempenha um papel importante na inflamação e no estresse oxidativo (Quintão e Cazita, 2010; Yazdanyar *et al*, 2011). Estudos em humanos são

confirmados por dados experimentais que indicam que a PLTP facilita a inflamação e a aterosclerose (Van Haperen *et al*, 2008; Vesey *et al*, 2000).

Um estudo realizado por Yang *et al* (2003) mostrou que a superexpressão de PLTP em animais de experimentação diminui o teor de vitamina E presente na LDL, elevando sua oxidação. Ainda em relação ao maior tercil de LDLox, LDLox foi explicada fortemente pelo índice de massa corpórea (IMC), conforme descrito anteriormente (Chen *et al*, 2008).

Diferentemente da modulação de oxLDL, mostramos uma associação negativa de acLDLox com a PLTP, sugerindo um papel anti-aterogênico a estes. Deste dado foi corroborado pelos achados da análise multivariada, e explicada positivamente pela apoAI (Hedrick *et al*, 2001).

apoAI é o componente predominante da HDL, e é conhecida por seu papel no transporte reverso do colesterol, além de ser ativadora da LCAT (Martin *et al*, 2006; Shao *et al*, 2010) e inibição HL (Ramsamy *et al*, 2000).

No presente estudo, observamos redução significativa da atividade da LH no maior tercil de acLDLox (40%). A elevada atividade da LH reduz as concentrações de HDL total (Mahley, 2003) e em sua deficiência, as HDL ficam relativamente enriquecidas em TG se tornando substratos ruins para a CETP, levando à uma menor atividade antioxidante e aumentando a geração de LDLox.

A LPL foi o único parâmetro do TRC não modificado e que não entrou em nenhum dos modelos regulatórios avaliados com os dois marcadores.

Determinamos a variação média da cEIM entre o tercil menor e o maior de acLDLox ou de LDLox e observamos valores de diferença iguais a 0,22 e 0,29 mm, respectivamente. Estas variações são responsáveis por aumentos no risco de infarto do miocárdio, como descrito anteriormente, de 0,77% a cada 0,07 milímetro de mudança carótida (Hodis *et al*, 1998).

Embora o risco seja maior com o aumento da LDLox, o valor da espessura máxima da íntima-média foi igual nos dois tercis avaliados.

As correlações muito similares observadas com os marcadores de cEIM ($r = 0.263$ com acLDLox; $r = 0.341$ com LDLox; $r = 0.313$ com LDLox/apoB100 e $r = 0.270$ com LDLox/LDL-C), podem indicar a formação de imunocomplexos (IC) na parede arterial (Burut *et al*, 2010; Al Gadban *et al*, 2010). As correlações entre EIM de carótidas e acLDLox foram independentes dos níveis de ambos.

A formação dos imunocomplexos é uma consequência direta da síntese de anticorpos, que consiste da interação dos acLDLox com a LDLox (Gaban *et al*, 2010; Lopes-Virella *et al*, 2011). Tanto a LDLox como os IC são encontrados em placas

ateroscleróticas humanas. Estudos têm considerado que os IC são mais eficientes na formação das células espumosas quando comparados às próprias LDLox (Gaban *et al*, 2010).

As razões LDLox/LDL-C e oxLDL/apoB100 apresentam comportamentos similares com relação ao cEIM para acLDLox e LDLox. Têm-se utilizado as razões LDLox/apoB100 e LDLox/LDL-C para medir o grau de oxidação das partículas de LDL, na premissa de que essas razões sejam mais informativas quando comparadas à cada variável separadamente (Van der Zwan *et al*, 2009).

Em resumo, o presente estudo revelou um papel levemente anti-aterogênico para os acLDLox que pode ser demonstrado através da fraca resposta do cEIM em seu maior tercil de acLDLox ($p \leq 0,068$) em comparação com LDLox ($p \leq 0,003$), apesar do valor da espessura máxima do complexo íntimo-medial ser semelhante entre os dois grupos de marcadores. Mas a correlação encontrada entre acLDLox e cEIM na população estudada foi similar as dos outros marcadores, sugerindo dessa forma, a formação imunocomplexos na parede arterial e um papel não protetor sobre a aterosclerose carotídea. Esses achados indicam função dupla protetora para os acLDLox.

Encontramos maior concentração de apoAI, o que sugere uma regulação positiva para os acLDLox, já que apoA1 é conhecida por seu papel no TRC, que é a principal função da HDL, mas em contrapartida, apoAI também é conhecida por reduzir a atividade da LH, como observado no presente estudo, além de aumentar LCAT, levando à uma menor proteção das HDL contra oxidação da LDL e induzindo a produção de acLDLox.

Já em relação a LDLox, a relação com os marcadores são claramente pró-aterogênicos, exceto para a ação da CETP que transfere lípidos oxidados da LDL para a HDL, mostrando seu papel ateroprotetor.

Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que explorou as principais proteínas e enzimas do transporte reverso de colesterol como determinantes da LDLox e acLDLox. Indicou que em adultos sem doença aterosclerótica estabelecida, parâmetros metabólicos e a aterosclerose carotídea possuem características duplas para acLDLox, com um papel levemente anti-aterogênico mas também contribuindo para o desenvolvimento da aterosclerose carotídea, apesar de menor quando comparado à LDLox. Sendo assim, mais estudos são necessários para avaliar esses mecanismos e a real contribuição dos acLDLox para a aterogênese.

6. CONCLUSÃO

Em indivíduos sem doença aterosclerótica estabelecida parte da aterogenicidade observada pode ser explicada pela regulação metabólica menos protetora por componentes do transporte reverso de colesterol, à saber CETP e PLTP, e maior frequência de parâmetros pró-aterogênicos, como idade, índice de massa corpórea e circunferência da cintura.

Quanto à dualidade dos efeitos bioquímicos e cardiovasculares demonstrados com os anticorpos anti-LDLox, especulamos que possam refletir, por um lado, a geração de imunocomplexos circulantes, mas por outro, a formação destes na parede arterial que desencadeariam processos imuno-inflamatórios pró-aterogênicos.

Este trabalho estimula novas investigações para a elucidação dos mecanismos envolvidos na aterogenicidade em indivíduos saudáveis e em estados patológicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al Gadban MM, Smith KJ, Soodavar F, Piansay C, Chassereau C, Twal WO *et al.* Differential trafficking of oxidized LDL and oxidized LDL immune complexes in macrophages: impact on oxidative stress. *PLoS One*. 2010; 2;5(9). pii: e12534.
- Almeida CA, Teixeira PFS, Soares DV, Cabral MD, da Costa SM, Salles EF *et al.* Espessura-intima média carotídea como marcador de risco cardiovascular em pacientes com hipotireoidismo subclínico. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 51(3): 472-477, 2007
- Ameli S, Hultgardh-Nilsson A, Regnstrom J, Calar F. Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1996; 16:1074-1079.
- Amorin FG, Rezende LCD, Coitinho LB, Freitas JV, Scher JA, Dettogni RS. Bioquímica clínica da aterosclerose provocada por hiperhomocisteinemia. *Revista Eletrônica de Farmácia*. 2011; 8(1): 36 – 59.
- Apolinário E, Ferderbar S, Pereira EC, Bertolami MC, Faludi A, Monte O *et al.* Minimally modified (electronegative) LDL(-) and anti-LDL(-) autoantibodies in diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Int J Atheroscler* 2006; 1: 42-47
- Arcanjo CL, Piccirilo LJ, Machado IV, Andrade Jr CRM, Clemente EL, Gomes MB. Avaliação de dislipidemia e índices antropométricos em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2005; 49(6): 951-958.
- Bahia L, Aguiar LGK, Vilella NR, Bottino D, Bouskela E. O endotélio na síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006;50(2):291-303.
- Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circulation Research*. 2004; 95:764-772.
- Bassi N, Ghirardello A, Iaccarino L, Zampieri S, Rampudda ME, Atzeni F, Sarzi-Puttini P, Shoenfeld Y, Doria A. oxLDL/beta2GPI-anti-oxLDL/beta2GPI complex and atherosclerosis in SLE patients. *Autoimmun Rev*. 2007; Nov 7(1):52-8.
- Benítez S, Ordóñez-Llanos J, Franco M, Marín C, Paz E, López-Miranda J *et al.* Effect of simvastatin in familial hypercholesterolemia on the affinity of electronegative low-density lipoprotein subfractions to the low-density lipoprotein receptor. *Am J Cardiol* 2004; 93: 414-420.
- Bergmark C, Wu R, de Faire U, Lefvert AK, Swedenborg, J. Patients with early-onset peripheral vascular disease have increased levels of autoantibodies against oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995 Apr;15(4):441-5.
- Bielicki JK, Oda MN. Apolipoprotein A-I_{Milano} and Apolipoprotein A-I_{Paris} Exhibit an Antioxidant Activity Distinct from That of Wild-Type Apolipoprotein A-I. *Biochemistry*. 2002; 41:2089-2096.
- Binder CJ, Hörkkö S, Dewan A, Chang MK, Kieu EP, Goodyear CS *et al.* Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):736-43.

- Boizel R, Benhamou PY, Lardy B, Laporte F, Foulon T, Halimi S. Ratio of triglycerides to HDL cholesterol is an indicator of LDL particle size in patients with type 2 diabetes and normal HDL cholesterol levels. *Diabetes Care*. 2000; 23: 1679-1685.
- Boschcov P et. al. Development of a peptide-based ELISA for the detection of antibodies against oxidized low density lipoprotein (oxLDL). *Atherosclerosis*. 2000; 151:224-77.
- Bots ML, Mulder PGH, Hofman A, van Es, GA, Grobbee DE. Reproducibility of carotid vessel wall thickness measurements. The Rotterdam Study. *J Clin Epidemiol* 1993;47(8):921-30.
- Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid-intima media thickness and risk of stroke and myocardial infarction. The Rotterdam Study. *Circulation*. 1997; 96: 1432-7.
- Brown RJ, Rader DJ. Lipases as modulators of atherosclerosis in murine models. *Curr Drug Targets*. 2007;8(12):1307-19.
- Burut DF, Karim Y, Ferns GA. The role of immune complexes in atherogenesis. *Angiology*. 2010; 61(7):679-89.
- Castilho LN, Oliveira HC, Cazita PM, de Oliveira AC, Sesso A *et al*. Oxidation of LDL enhances the cholesteryl ester transfer protein (CETP)-mediated cholesteryl ester transfer rate to HDL, bringing on a diminished net transfer of cholesteryl ester from HDL to oxidized LDL. *Clin Chim Acta*. 2001; 304(1-2): 99-106.
- Chambless LE, Heiss G, Folsom AR, Rosamond W, Szklo M, Sharrett AR, Clegg LX. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987-1993. *Am J Epidemiol*. 1997;146(6):483-94.
- Chambless LE, Folsom AR, Clegg LX, Sharrett AR, Shahar E, Nieto FJ, *et al* Carotid wall thickness is predictive of incident clinical stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Am J Epidemiol*. 2000; Mar 1 151(5):478-87.
- Chen HW, Kuo CL, Huang CS, Kuo SJ, Liu CS. Oxidizes low-density lipoproteins, autoantibodies against oxidized low-density lipoproteins and carotid intima media thickness in a clinically healthy population. *Cardiology*. 2008; 110(4):252-9.
- Chen PF, Marcel YL, Yang CY, Gotto AM Jr, Milne RW, Sparrow JT, Chan L. Primary sequence mapping of human apolipoprotein B-100 epitopes. Comparisons of trypsin accessibility and immunoreactivity and implication for apoB conformation. *Eur J Biochem*. 1988; 175(1):111-11876.
- Chiba H, Akita H, Kotani K, Kanno T, Manabe M. Complete cholesteryl ester transfer protein deficiency increases oxidized-LDL in plasma. *Rinsho Byori*. 1997; 45(1):55-7.
- Chou MY, Hartvigsen K, Hansen LF, Fogelstrand L, Shaw PX, Boullier A *et al*. Oxidation-specific epitopes are important targets of innate immunity. *J Intern Med*. 2008; 263(5):479-88.
- Choy PC, Siow YL *et al*. Lipids and atherosclerosis. *Biochem Cell Biol*. 2004; 82(1):212-24.

Christison JK, Rye KA, Stocker R. Exchange of oxidized cholesteryl linoleate between LDL and HDL mediated by cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res.* 1995; 36(9): 2017-26.

Chyu KY, Zhao X, Reyes OS, Babbidge SM, Dimayuga PC, Yano J, *et al.* Immunization using an Apo B-100 related epitope reduces atherosclerosis and plaque inflammation in hypercholesterolemic apo E (-/-) mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;30;338(4):1982-9.

Crouse JR, Raichlen JS, Riley WA. Effect of Rosuvastatin on Progression of Carotid Intima-Media Thickness in Low-Risk Individuals With Subclinical Atherosclerosis: The meteor Trial. *Jama.* 2007; 297(12):1344-53.

Dahlof B. Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment. *Am J Cardiol.* 2010; 105: 3A-9A.

Dansky HM, Charlton SA, Harper MM, Smith JD. T and B lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; Apr 29;94(9):4642-6.

Damasceno NR, Goto H, Rodrigues FM, Dias CT, Okawabata FS, Abdalla DS, Gidlund M. Soy protein isolate reduces the oxidizability of LDL and the generation of oxidized LDL autoantibodies in rabbits with diet-induced atherosclerosis. *J Nutr.* 2000; 130: 2641-2647.

Damen J, Regts J, Scherphorp G. Transfer of [14C] phosphatidylcholine between liposomes and human plasma high density lipoprotein. Partial purification of transfer stimulation plasma factor using a rapid transfer assay. *Biochim Biophys Acta.* 1982; 712: 444-452.

Dayan A, Rotstein A, Pinchuk I, Vodovicz A, Lencovski Z, Lichtenberg D *et al.* Effect of a short-term graded exhaustive exercise on the susceptibility of serum lipids to oxidation. *Int J Sports Med.* 2005; 26(9):732-8.

de Graaf J, Hak-Lemmers HL, Hectors MP, Demacker PN, Hendriks JC, Stalenhoef AF. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arterioscler Thromb.* 1991; 11(2):298-306.

Dotevall A, Hulthe J, Rosengren A, Wiklund O, Wilhelmsen L. Autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein and C-reactive protein are associated with diabetes and myocardial infarction in women. *Clin Sci (Lond).* 2001; 101(5):523-31.

Duarte M, Moresco RN, Fabro de Bem A. Metodologias para a determinação da LDL oxidada e sua aplicação como marcador de risco cardiovascular. *RBAC.* 2008; 40(2): 101-106.

Dullaart RP, Kappelle PJ, Dallinga-Thie GM. Carotid intima media thickness is associated with plasma adiponectin but not with the leptin:adiponectin ratio independently of metabolic syndrome. *Atherosclerosis.* 2010; in press.

Ehnhholm C, Kuusi T. Preparation, characterization and measurement of hepatic lipase. *Methods Enzymol.* 1986; 129:7716-738.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*. 1992; 13(4):341-90.

Faulin TES, Garcia MCC, Abdalla DSP. Recent Advances on Detection of Modified Forms of Low-Density Lipoproteins *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* 2009; 3, 28-34.

Ferretti G, Rabini RA, Bacchetti T, Vignini A, Alvolini E, Ravaglia F, *et al*. Glycated low density lipoproteins modify platelet properties: a compositional and functional study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; May 87(5):2180-4.

Fitzgerald ML, Mujawar Z, Tamehiro N. ABC transporters, atherosclerosis and inflammation *Atherosclerosis*. 2010;211(2):361-70.

Fong LGS, Parthasarathy JL, Steinberg D. Nonenzymatic oxidative cleavage of peptide bonds in apoprotein B-100. *J. Lipid Res*. 1987; 28: 1466–1477.

Fraser DA, Tenner AJ. Innate immune proteins C1q and mannan-binding lectin enhance clearance of atherogenic lipoproteins by human monocytes and macrophages. *J Immunol*. 2010; 185(7):3932-9.

Fredrikson GN, Söderberg I, Lindholm M, Dimayuga P, Chyu KY, Shah PK *et al*. Inhibition of atherosclerosis in apoE-null mice by immunization with apoB-100 peptide sequences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23(5):879-84.

Freigang S, Hörkkö S, Miller E, Witztum JL, Palinski W. Immunization of LDL receptor-deficient mice with homologous malondialdehyde-modified and native LDL reduces progression of atherosclerosis by mechanisms other than induction of high titers of antibodies to oxidative neoepitopes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18(12):1972-82.

Frøystad MK, Volden V, Berg T, Gjøn T. Metabolism of oxidized and chemically modified low density lipoproteins in rainbow trout--clearance via scavenger receptors. *Dev Comp Immunol*. 2002; Oct 26(8):723-33.

Fukumoto M, Shoji T, Emoto M, Kawagishi T, Okuno Y, Nishizawa Y. Antibodies against oxidized LDL and carotid artery intima-media thickness in a healthy population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; Mar 20(3):703-7.

George J, Afek A, Gilburd B, Levy Y, Blank M, Kopolovic J, Harats D, Shoenfeld Y. Atherosclerosis in LDL-receptor knockout mice is accelerated by immunization with anticardiolipin antibodies. *Lupus*. 1997;6(9):723-9.

George J, Afek A, Gilburd B, Levkovitz H, Shaish A, Goldberg I, *et al*. Hyperimmunization of apo-E-deficient mice with homologous malondialdehyde low-density lipoprotein suppresses early atherogenesis. *Atherosclerosis*. 1998;138(1):147-52.

Gidlund M, Damasceno NR, Lindoso JA, Abdalla DS, Goto H. Monoclonal antibodies against low density lipoprotein with various degrees of oxidative modifications. *Braz J Med Res*. 1996; 29:1625-28.

Giroldo ML, Alves AS, Baptista F. Doença aterosclerótica: uma patologia multi-fatorial. *Sábios-Rev. Saúde e Biol.* 2007; 2(1): 32-41.

Gleissner CA, Leitinger N, Ley K. Effects of native and modified low-density lipoproteins on monocyte recruitment in atherosclerosis. *Hypertension.* 2007; 50(2): 276-83.

Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; Apr 29(4):431-8.

Gounopoulos P, Merki E, Hansen LF, Choi SH, Tsimikas, S. Antibodies to oxidized low density lipoprotein: epidemiological studies and potential clinical applications in cardiovascular disease. *Minerva Cardioangiol.* 2007; 55(6):821-37.

Gräbner R, Lötzer K, Döpping S, Hildner M, Radke D, Beer M, *et al.* Lymphotoxin beta receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis in the aorta adventitia of aged ApoE^{-/-} mice. *J Exp Med.* 2009; Jan 16 206(1):233-48.

Greenland P, Abrams J, Aurigemma GP, Bond MG, Clark LT, Criqui MH *et al.* Prevention Conference V: Beyond secondary prevention: identifying the high-risk patient for primary prevention: noninvasive tests of atherosclerotic burden: Writing Group III. *Circulation.* 2000; 101(1):E16-22.

Grosheva I, Haka AS, Qin C, Pierini LM, Maxfield FR. Aggregated LDL in Contact With Macrophages Induces Local Increases in Free Cholesterol Levels That Regulate Local Actin Polymerization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29:1615-1621.

Gustafsson M, Levin M, Skålén K, Perman J, Fridén V, Jirholt P *et al.* Retention of low-density lipoprotein in atherosclerotic lesions of the mouse: evidence for a role of lipoprotein lipase. *Circ Res.* 2007; 101(8):777-83.

Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol.* 2011; 12(3):204-12.

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Eng J Med.* 2005; 352(16); 1685-95.

Hansson GK, Robertson AK, Söderberg-Nauclér C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol.* 2006; 1:297-329.

Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, *et al.* Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002;91(4):281-91.

Harada LM, Carvalho MD, Passarelli M, Quintão EC. Lipoprotein desialylation simultaneously enhances the cell cholesterol uptake and impairs the reverse cholesterol transport system: in vitro evidences utilizing neuraminidase-treated lipoproteins and mouse peritoneal macrophages. *Atherosclerosis.* 1998 Jul;139(1):65-75.

Haslbeck KM, Bierhaus A, Erwin S, Kirchner A, Nawroth P, Schlötzer U *et al.* Receptor for advanced glycation endproduct (RAGE)-mediated nuclear factor- κ B activation in casculitic neuropathy. *Muscle Nerve.* 2004; Jun 29(6):853-60.

- Hasham SN, Pillarisetti S. Vascular lipases, inflammation and atherosclerosis. Clin Chim Acta. 2006; 372(1-2):179-83.
- Hedrick CC, Castellani LW, Wong H, Lusis AJ. In vivo interactions of apoA-II, apoA-I, and hepatic lipase contributing to HDL structure and antiatherogenic functions. J Lipid Res. 2001; Apr 42(4):563-70.
- Heitzer T, Ylä-Herttuala S, Luoma J, Kurz S, Münzel T, Just H *et al*. Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL. Circulation. 1996; Apr 1;93(7):1346-53.
- Henriksen TE, Mahoney M, Steinberg D. Macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. Journal of Lipid Research .1983;39:1998.
- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. Circ J. 2009; 73: 411 – 418.
- Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Selzer RH, Liu CR, Liu CH *et al*. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. Ann Intern Med. 1998; 128: 262-9.
- Hogue JC, Lamarche B, Gaudet D, Larivière M, Tremblay AJ, Bergeron J *et al*. Relationship between cholesteryl ester transfer protein and LDL heterogeneity in familial hypercholesterolemia. J Lipid Res. 2004;45(6):1077-83.
- Holvoet P, Collen D, Van De Werf F. Malondialdehyde-modified LDL as a marker of acute coronary syndromes. JAMA 1999; 281: 1718-1721.
- Hörkkö S, Bird DA, Miller E, Itabe H, Leitinger N, Subbanagounder G, *et al*. Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of oxidized low-density lipoproteins. J Clin Invest. 1999; Jan 103(1):117-28.
- Hovingh GK, de Groot E, van der Steeg W, Boekholdt SM, Hutten BA, Kuivenhoven, JA *et al*. Inherited disorders of HDL metabolism and atherosclerosis. Curr Opin Lipidol. 2005; 16 (2):139-45.
- Hulthe J, Wikstrand J, Lidell A, Wendelhag I, Hansson GK, Wiklund O. Antibody titers against oxidized LDL are not elevated in patients with familial hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998; Aug 18(8):1203-11.
- Hulthe J. Antibodies to oxidized LDL in atherosclerosis development--clinical and animal studies. Clin Chim Acta. 2004; 348(1-2):1-8.
- Hulthe J, Bokemark L, Fagerberg B. Antibodies to oxidized LDL in relation to intima-media thickness in carotid and femoral arteries in 58-year-old subjectively clinically healthy men. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001; 21(1):101-7.
- Hulthe J, Wiklund O, Hurt-Camejo E, Bondjers G. Antibodies to oxidized LDL in relation to carotid atherosclerosis, cell adhesion molecules, and phospholipase A(2). Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001; 21(2):269-74.
- Ian S *et al*. Lipid metabolism. Current Opinion in Lipidology. 2010; 21:95–96.

Imanaga Y, Sakata N, Takebayashi S, *et al.* In vivo and in vitro evidence for the glycooxidation of low density lipoprotein in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 2000; 150:343–355.

Inoue T, Yaguchi I, Uchida T, Kamishirado H, Nakahara S, Hayashi T, Morooka S. Clinical significance of the antibody against oxidized low-density lipoprotein in acute myocardial infarction. *Cardiology*. 2002; 98(1-2):13-7.

Iribarren C, Folsom AR, Jacobs DR, Gross MD, Belcher JD, Eckfeldt JH. Association of serum vitamin levels, LDL susceptibility to oxidation, and autoantibodies against MDA-LDL with carotid atherosclerosis. A case-control study. The ARIC Study Investigators. *Atherosclerosis Risk in Communities. Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 7(6):1171-7.

Ishigaki Y, Oka Y, Katagiri H. Circulating oxidized LDL: a biomarker and a pathogenic factor. *Curr Opin Lipidol*. 2009; 20(5):363-9.

Itabe H. Oxidized phospholipids as a new landmark in atherosclerosis. *Prog Lipid Res* 1998; 37:181–207.

Iughetti L, Volta C, Maggi E, Palladini G, Perugini C, Bellomo G *et al.* Circulating antibodies recognizing oxidatively modified low-density lipoprotein in children. *Pediatr Res*. 1999; Jan 45(1):94-9.

Jawien J. Review: New insights into immunological aspects of atherosclerosis. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*. 2008; 118 (3): 127-130.

Jessup W, Wilson P, Gaus K, Kritharides L. Oxidized lipoproteins and macrophages. *Vascul Pharmacol*. 2002; 38 (4): 239-48.

Kanters SDJM, Algra A, van Leeuwen MS, Banga JD. Reproducibility of in vivo carotid intima-media thickness measurements. A review. **Stroke** 1997;28:665-71.

Karabinos I, Koulouris S. Increased serum titers of autoantibodies against oxidized LDL cholesterol in young healthy adults. *Atherosclerosis*. 2007; 92(2):448-50.

Karvonen J, Päivänsalo M, Kesäniemi YA, Hörkkö S. Immunoglobulin M type of autoantibodies to oxidized low-density lipoprotein has an inverse relation to carotid artery atherosclerosis. *Circulation*. 2003; 28;108(17):2107-12.

Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2004; 24: 998-1005.

Kearney, J. Immune recognition of OxLDL in atherosclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2000; Jun 105(12):1683-5.

Ketelhuth DF *et al.* Separation of low-density lipoprotein (LDL) and oxidized LDL (oxLDL) subspecies and reactivity against autoantibodies. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2001; 34:72-8.

Kontush A, de Faria EC, Chantepie S, Chapman MJ. Antioxidative Activity of HDL Particle Subspecies Is Impaired in Hyperalphalipoproteinemia: Relevance of Enzymatic and Physicochemical Properties. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2004; 24:526-533.

Kovanen PT. Mast cells: multipotent local effector cells in atherothrombosis. *Immunol Rev.* 2007 Jun;217:105-22.

Kuchibhotla S, Vanegas D, Kennedy DJ, Guy E, Nimako G, Morton RE *et al.* Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. *Cardiovasc Res.* 2008; Apr 1;78(1):185-96.

Lagrost L, Desrumaux C, Masson D, Deckert V, Gamberth P. Structure and function of the plasma phospholipid transfer protein. *Curr Opin Lipidol.* 1998; 9(3): 203-9.

Libby P, Ridker PM, Hansson NGK. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardio.* 2009; 54(23): 2129-2138.

Lin KY, Pan JP, Yang DL, Huang KT, Chang MS, Ding PY, Chiang AN. Evidence for inhibition of low density lipoprotein oxidation and cholesterol accumulation by apolipoprotein H (beta2-glycoprotein I). *Life Sci.* 2001; 29;69(6):707-19.

Ling WM, Suzuki H, Buchan A, Kodama T, Steinbrecher UP. Oxidized or acetylated low density lipoproteins are rapidly cleared by the liver in mice with disruption of the scavenger receptor class A type I/II gene. *J Clin Invest.* 1997; 100(2):244-52.

Lobo J, Santos F, Grosso D, Lima R, Barreira AL, Leite M Jr *et al.* Electronegative LDL and lipid abnormalities in patients undergoing hemodialysis and peritoneal dialysis. *Nephron Clin Pract* 2008; 108: 298-304.

Lopes-Virella MF, Baker NL, Hunt KJ, Lachin J, Nathan D, Virella G; DCCT/EDIC Research Group. Oxidized LDL immune complexes and coronary artery calcification in type 1 diabetes. *Atherosclerosis.* 2011 Feb;214(2):462-7.

Lopez LR, Kobayashi K, Matsunami Y, Matsuura E. Immunogenic oxidized low-density lipoprotein/beta2-glycoprotein I complexes in the diagnostic management of atherosclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2009 Aug;37(1):12-9.

Lopez LR, Simpson DF, Hurley BL, Matsuura E. OxLDL/ B2GP1 Complexes and autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, and antiphospholipid syndrome. Pathogenic implications for vascular involvement. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005; 1051:313-322

Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 2007; 115(4):459-467.

Maa ZL, Mai XL, Sun JH, Ju SH, Yang X, Ni Y, Teng GJ. Inhibited atherosclerotic plaque formation by local administration of magnetically labeled endothelial progenitor cells (EPCs) in a rabbit model. *Atherosclerosis.* 2009; 205(1):80-6.

Maggi E, Finardi G, Poli M, Bollati P, Filipponi M, Stefano PL *et al.* Specificity of autoantibodies against oxidized LDL as an additional marker for atherosclerotic risk. *Coron Artery Dis.* 1993; 4(12):1119-22.

Mahley RW, Weisgraber KH, Farese Jr. RV. Disorders of Lipid Metabolism In: Williams RH. *Williams Textbook of Endocrinology.* Philadelphia: Saunders 2003; 10 edition.1642-1691.

Marchesi E, Martignoni A, Salvini M, Catalano O, Maggi E, Negro C *et al.* Carotid intima-media thickening and in vivo LDL oxidation in patients with essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 1996 Sep;10(9):577-82.

Martin DD, Budamagunta MS, Ryan RO, Voss JC, Oda MN. Apolipoprotein A-I assumes a "looped belt" conformation on reconstituted high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 20418–20426.

Masoura C, Pitsavos C, Aznaouridis K, Skoumas I, Vlachopoulos C, Stefanadis C. Arterial endothelial function and wall thickness in familial hypercholesterolemia and familial combined hyperlipidemia and the effect of statins. A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis.* 2011; 214(1):0129-138.

Matsuura E, Kobayashi K, Hurley BL, Lopez LR. Atherogenic oxidized low-density lipoprotein/beta2-glycoprotein I (Ox-LDL/beta2GPI) complexes in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2006; 15: 478-483.

Matsuura E, Hughes GR, Khamashta MA. Oxidation of LDL and its clinical implication. *Autoimmun Rev.* 2008 Jul;7(7):558-66.

Medeiros AMB, von Muhlenl A, Gidlund M, Bodanesel R, Gottlieb MG, Bodanesel LC. Anticorpos contra LDL-ox e síndrome coronariana aguda Arq. Bras. Cardiol. 2010; 95 (1).

Meisinger C, Baumert J, Khuseyinova N, Loewel H, Koenig W. Plasma oxidized low density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middleaged men from the general population. *Circulation.* 2005; 112: 651–657.

Mendivil CO, Zheng C, Furtado J, Lel J, Sacks FM. Metabolism of very-low-density lipoprotein and low density lipoprotein containing apolipoprotein C-III and not other small apolipoproteins *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30:239-245.

Meraviglia MV, Maggi E, Bellomo G, Cursi M, Fanelli G, Minicucci F. Autoantibodies against oxidatively modified lipoproteins and progression of carotid restenosis after carotid endarterectomy. *Stroke.* 2002; Apr 33(4):1139-41.

Miller YI, Choi SH, Fang L, Tsimikas S. Lipoprotein modification and macrophage uptake: role of pathologic cholesterol transport in atherogenesis. *Subcell Biochem.* 2010;51:229-51.

Mizuno Y, Jacob RF, Mason RP. Inflammation and the Development of Atherosclerosis: Effects of Lipid-Lowering Therapy. *J Atheroscler Thromb.* 2011; In press.

Monteiro RC. Role of IgA and IgA Fc receptors in inflammation. *J Clin Immunol.* 2010; Jan 30(1):1-9.

Moore KJ, Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26(8):1702-11.

Mozaffarian D, Wilson PW, Kannel WB. Beyond established and novel risk factors: lifestyle risk factors for cardiovascular disease. *Circulation*. 2008;117(23): 3031-8.

Nambi V, Chambless L, Folsom AR, He M, Hu Y, Mosley T, Volcik K, Boerwinkle E, Ballantyne CM. Carotid intima-media thickness and presence or absence of plaque improves prediction of coronary heart disease risk: the ARIC (Atherosclerosis Risk In Communities) study. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Apr 13;55(15):1600-7.

Nauck M, März W, Jarausch J, Cobbaert C.; Sägers A, Bernard D *et al*. Multicenter evaluation of a homogeneous assay for HDL-C without sample pretreatment. *Clin Chem*. 1997; 43 (9): 1622-9.

Negre-Salvayre A, Dousset N, Ferretti G, Bacchetti T, Curatola G, Salvayre R. Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. *Free Radic Biol Med*. 2006; 41(7):1031-40.

Nilsson J, Hansson GK, Shah PK. Immunomodulation of atherosclerosis: implications for vaccine development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25(1):18-28.

Nishida HI, Arai H, Nishida T. Cholesterol ester transfer mediated by lipid transfer protein as influenced by changes in the charge characteristics of plasma lipoproteins. *J Biol Chem*. 1993; 268(22):16352-60.

O'Brien KD, Alpers CE, Hokanson JE, Wang S, Chait A. Oxidation-specific epitopes in human coronary atherosclerosis are not limited to oxidized low-density lipoprotein. *Circulation*. 1996; Sep 15 94(6):1216-25.

Odeberg J, Larsson CA, Rastam L, Lindblad U. The Asp298 allele of endothelial nitric oxide synthase is a risk factor for myocardial infarction among patients with type 2 diabetes mellitus. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2008; 8:36.

O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med*. 1999 Jan 7;340(1):14-22.

O'Leary DH, Polak JF. Intima-media thickness: a tool for atherosclerosis imaging and event prediction. *Am J Cardiol*. 2002; 90(suppl): 18L-21L.

Ohashi R, Mu H, Yao Q, Chen C. Atherosclerosis: immunopathogenesis and immunotherapy. *Med Sci Monit*. 2004; 10(11): RA225-260.

Olivecrona G, Olivecrona T. Triglyceride lipases and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2010; 21(5):409-15.

Oliveira HC, de Faria EC. Cholesteryl ester transfer protein: The controversial relation to atherosclerosis and emerging new biological roles. *IUBMB Life*. 2011; 63(4):248-57.

Oliveira JA, Sevanian A, Rodrigues RJ, Apolinario E, Abdalla DSP. Minimally modified electronegative LDL and its autoantibodies in acute and chronic coronary syndromes. *Clin Biochem* 2006; 39: 708-714.

Oörni K, Pentikäinen MO, Annala A, Kovanen PT. Oxidation of low density lipoprotein particles decreases their ability to bind to human aortic proteoglycans. Dependence on oxidative modification of the lysine residues *J Biol Chem*. 1997; 272(34):21303-11.

Orchard TJ, Virella G, Forrest KY, Evans RW, Becker DJ, Lopes-Virella MF. Antibodies to oxidized LDL predict coronary artery disease in type 1 diabetes: a nested case-control study from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetes*. 1999; 48(7):1454-8.

Organização Mundial da Saúde. Cardiovascular Diseases (CVDs). Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>>. Acesso em: 15 de junho de 2010.

Palinski W, Rosenfeld E, Yla-Herttuala S, Gurtner C. LDL undergoes oxidative modification in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989; 86:1372-1376.

Palinski W, Miller E, Witztum JL. Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(3):821-5.

Palinski W, Witztum JL. Immune responses to oxidative neoepitopes on LDL and phospholipids modulate the development of atherosclerosis. *J Intern Med*. 2000; 247(3):371-80.

Park YM, Febbraio M, Silverstein RL. CD 36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest*. 2009; 119(1):136-45.

Passarelli M, Catanozi S, Nakandakare ER, Rocha JC, Morton RE, Shimabukuro AF, Quintão EC. Plasma lipoproteins from patients with poorly controlled diabetes mellitus and "in vitro" glycation of lipoproteins enhance the transfer rate of cholesteryl ester from HDL to apo-B-containing lipoproteins. *Diabetologia*. 1997; 40(9):1085-93.

Pentikäinen MO, Lehtonen EM, Oörni K, Lusa S, Somerharju P, Jauhiainen M, *et al*. Human arterial proteoglycans increase the rate of proteolytic fusion of low density lipoprotein particles. *J Biol Chem*. 1997; Oct 3 272(40):25283-8.

Perdomo G, Dong HH. Apolipoprotein D in lipid metabolism and its functional implication in atherosclerosis and aging. *Aging*. 2009; 1(1): 17–27.

Perk J. Risk factor management: a practice guide. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2009;16 (2):S24-8.

Piha M, Lindstedt L, Kovanen PT. Fusion of proteolyzed low-density lipoprotein in the fluid phase: a novel mechanism generating atherogenic lipoprotein particles. *Biochemistry*. 1995; 34(32):10120-9.

Pinho RA, Araújo MC, Guisi GLM, Benetti M. Doença Arterial Coronariana, Exercício Físico e Estresse Oxidativo. *Arq Bras Cardiol* 2010;94(4): 549-555.

Puurunen M, Mänttari M, Manninen V, Tenkanen L, Alfthan G, Ehnholm C *et al*. Antibody against oxidized low-density lipoprotein predicting myocardial infarction. *Arch Intern Med*. 1994; Nov 28; 154(22):2605-9.

Quintão EC, Cazita PM. Lipid transfer proteins: past, present and perspectives. *Atherosclerosis*. 2010; 209(1): 1-9.

- Ramsamy TA, Neville TA, Chauhan BM, Aggarwal D, Sparks DL. Apolipoprotein A-I regulates lipid hydrolysis by hepatic lipase. *J Biol Chem*. 2000; 275(43):33480-6.
- Reardon CA, Blachowicz L, White T, Cabana V, Wang Y, Lukens J *et al*. Effect of immune deficiency on lipoproteins and atherosclerosis in male apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21(6):1011-6.
- Rifai N, Bacharik PP, Albers JJ. Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In: Burtis, C. A.; Ashwood, E. R. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company. 1999; 809-861.
- Rose N, Afanasyeva M. Autoimmunity: busting the atherosclerotic plaque. *Nat Med*. 2003; 9(6):641-2.
- Rossi GP, Cesari M, De Toni R, Zanchetta M, Maiolino G, Pedon L *et al*. Antibodies to oxidized low-density lipoproteins and angiographically assessed coronary artery disease in white patients. *Circulation*. 2003;18;108(20):2467-72.
- Rouhl RP, van Oostenbrugge RJ, Theunissen RO, Knottnerus IL, Staals J, Henskens LH *et al*. Autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein in cerebral small vessel disease. *Stroke*. 2010; Nov 41(11):2687-9.
- Salonen JT, Ylä-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R *et al*. Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet*. 1992; 339(8798):883-7.
- Samyn H, Moerland M, van Gent T, van Haperen R, Grosveld F, van Tol A *et al*. Elevation of systemic PLTP, but not macrophage- PLTP, impairs macrophage reverse cholesterol transport in transgenic mice. *Atherosclerosis*. 2009; Oct (204) 429- 434.
- Santos AO, Fonseca FA, Fischer SM, Monteiro CM, Brandão SA, Póvoa RM *et al*. High circulating autoantibodies against human oxidized low-density lipoprotein are related to stable and lower titers to unstable clinical situation. *Clin Chim Acta*. 2009; Aug 406(1-2):113-8.
- Satoh N, Wada H, Ono K, Yamakage H, Yamada K, Nakano T *et al*. Small dense LDL-cholesterol relative to LDL-cholesterol is a strong independent determinant of hyperadiponectinemia in metabolic syndrome. *Circ J*. 2008; Jun 72(6):932-9.
- Schiopu A, Bengtsson J, Söderberg I, Janciauskiene S, Lindgren S, Ares MP *et al*. Recombinant human antibodies against aldehyde-modified apolipoprotein B-100 peptide sequences inhibit atherosclerosis. *Circulation*. 2004;110(14):2047-52.
- Schleicher E, Deufel T, Wieland OH. Non-enzymatic glycosylation of human serum lipoproteins. Elevated epsilon-lysine glycosylated low-density lipoprotein in diabetic patients. *FEBS Lett*. 1981; 129: 1–7.
- Schumacher M, Eber B, Tatzber F, Kaufmann P. Transient reduction of autoantibodies against oxidized LDL in patients with acute myocardial infarction. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995; 18:1087-1091.
- Shao B, Oda MN, Oram JF, Heinecke JW (2010) Myeloperoxidase: an oxidative pathway for generating dysfunctional high-density lipoprotein. *Chem Res Toxicol*. 2010; 15;23(3):447-54.

Shaw PX, Hörkkö S, Tsimikas S, Chang MK, Palinski W, Silverman GJ, *et al.* Human-derived anti-oxidized LDL autoantibody blocks uptake of oxidized LDL by macrophages and localizes to atherosclerotic lesions in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(8):1333-9.

Shaw PX, Palinski W, Witztum JL, Silverman GJ. Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *Nat Med.* 2003; 9(6):736-43.

Sherer Y, Shoenfeld Y. Immunomodulation for treatment and prevention of atherosclerosis. *Autoimmun Rev.* 2002; 1(1-2):21-7.

Shoenfeld Y, Wu R, Dearing LD, Matsuura E. Are anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies pathogenic or protective? *Circulation.* 2004; Oct 26 110(17):2552-8.

Shoji T, Nishizawa Y, Fukumoto M, Shimamura K, Kimura J, Kanda H *et al.* Inverse relationship between circulating oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and anti-oxLDL antibody levels in healthy subjects. *Atherosclerosis.* 2000; 148(1):171-7.

Shoji T, Kimoto E, Shinohara K, Emoto M, Ishimura E, Miki T *et al.* The association of antibodies against oxidized low-density lipoprotein with atherosclerosis in hemodialysis patients. *Kidney Int Suppl.* 2003; May (84):S128-30.

Sigala F, Kotsinas A, Savari P, Filis K, Markantonis S, Iliodromitis EK *et al.* Oxidized LDL in human carotid plaques is related to symptomatic carotid disease and lesion instability. *J Vasc Surg.* 2010; Sep;52(3):704-13.

Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal.* 2009; May 26; 2(72):re3.

Singh U, Dasu MR, Yancey PG, Afify A, Devaraj S, Jialal I. Human C-reactive protein promotes oxidized low density lipoprotein uptake and matrix metalloproteinase-9 release in Wistar rats. *J Lipid Res.* 2008; 49(5):1015-23.

Simons PC, Algra A, Bots ML, Grobbee DE, Van Der Graaf Y. Common carotid intima-media thickness and arterial stiffness: indicators of cardiovascular risk in high-risk patients. The SMART study (second Manifestations of ARterial disease). *Circulation.* 1999; 100(9):951-7.

Siqueira AFA *et al.* LDL: da síndrome metabólica à instabilização da placa aterosclerótica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006; 50 (2): 334-43.

Sjögren P, Fredrikson GN, Samnegard A, Ericsson CG, Ohrvik J, Fisher RM *et al.* High plasma concentrations of autoantibodies against native peptide 210 of apoB-100 are related to less coronary atherosclerosis and lower risk of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2008; Sep 29(18):2218-26.

Smelt AH, de Beer F. Apolipoprotein E and familial dysbetalipoproteinemia: clinical, biochemical, and genetic aspects. *Semin Vasc Med.* 2004 Aug;4(3):249-57.

Smith JD. Dysfunctional HDL as a diagnostic and therapeutic target. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; Feb 30(2):151-5. Review.

Smook ML, van Leeuwen M, Heeringa P, Damoiseaux JG, Theunissen R, Daemen MJ, Lutgens E, Tervaert JW. Anti-oxLDL antibody isotype levels, as potential markers for progressive atherosclerosis in APOE and APOECD40L mice. *Clin Exp Immunol*. 2008; 154(2):264-9.

Sobal G, Menzel J, Sinziger H. Why is glycated LDL more sensitive to oxidation than native LDL? A comparative study. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential FattyAcids*. 2000; 63(4),177-186.

Soltész P, Veres K, Laczik R, Der H, Csipo I, Timar O *et al*. Evaluation of antibodies to oxidized low-density lipoprotein and assessment of C-reactive protein in acute coronary syndrome and stable coronary artery disease. *Thromb Haemost*. 2007; Aug;98(2):413-9.

Sparrow CPT, Doebber W, Olszewski J, Wu MS, Ventre J Stevens KA *et al*. Low density lipoprotein is protected from oxidation and the progression of atherosclerosis is slowed in cholesterol-fed rabbits by the antioxidant N,N9-diphenylphenylenediamine. *J. Clin. Invest*. 1992; 89: 1885–1891.

Stern S. Are we getting nearer to screening for atherosclerosis? *Circulation*. 2008; 117: 122-126.

Steinberg DS, Parthasarathy TE, Carew JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Eng. J. Med*. 1989; 320: 915–924.

Steinbrecher UPM, Loughheed WC, Kwan, Dirks M. Recognition of oxidized low density lipoprotein by the scavenger receptor of macrophages results from derivatization of apolipoprotein B by products of fatty acid peroxidation. *J. Biol. Chem*. 1989; 264: 15216–15223.

Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004; 84(4):1381-478.

Stocker, R. Lipoprotein oxidation: Mechanistic aspects, methodological approaches and clinical relevance. *Curr Opin Lipidol*. 1994; 5 (6): 422-33.

Sugano M, Sawada S, Tsuchida K, Makino N, Kamada M. Low density lipoproteins develop resistance to oxidative modification due to inhibition of cholesteryl ester transfer protein by a monoclonal antibody. *J Lipid Res*. 2000 Jan;41(1):126-33.

Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K *et al*. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*. 1997 Mar 20;386(6622):292-6.

Sviridov, V. *et al*. Antiatherogenic functionality of hight-density lipoprotein? How much versus how good. *J Atheros Throm*. 2088; 15: 52-62.

Tabas I, Williams KJ, Boren J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation* 2007; 116:1832–1844.

Tabas I. Nonoxidative modifications of lipoproteins in atherogenesis. *Annu Rev Nutr* 1999;19:123-39.

- Takahashi, K *et al.* Long-term hormone replacement therapy delays the age related progression of carotid intima-media thickness in healthy postmenopausal women. *Maturitas*. 2004; 49(2):170-7.
- Tanaga K, Bujo H, Inoue M, *et al.* Increased circulating malondialdehyde-modified LDL levels in patients with coronary artery diseases and their association with peak sizes of LDL particles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(4): 662-666.
- Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*. 2006 Apr;86(2):515-81.
- Tinahones FJ, Gómez-Zumaquero JM, Garrido-Sánchez L, García-Fuentes E, Rojo-Martínez G, Esteva I *et al.* Influence of age and sex on levels of anti-oxidized LDL antibodies and anti-LDL immune complexes in the general population. *J Lipid Res*. 2005; Mar;46(3):452-7.
- Torres FS, Moreira CM, Vianna FF, Gus M. Medida da espessura das camadas íntima e média das artérias carótidas para avaliação do risco cardiovascular. *Rev Bras Hipertens*. 2007; 14(3): 167-171.
- Torzewski M, Klouche M, Hock J, Messner M, Dorweiler B, Torzewski J, Gabbert HE, Bhakdi S. Immunohistochemical demonstration of enzymatically modified human LDL and its colocalization with the terminal complement complex in the early atherosclerotic lesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998 Mar;18(3):369-78.
- Tsimikas S, Brilakis ES, Lennon RJ, Miller ER, Witztum JL, McConnell JP *et al.* Relationship of IgG and IgM autoantibodies to oxidized low density lipoprotein with coronary artery disease and cardiovascular events. *J Lipid Res*. 2007 Feb;48(2):425-33.
- Tsompanidi, EM, Brinkmeier MS, Fotiadou EH, Giakoumi SM, Kypreos KE. HDL biogenesis and functions: Role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2010; 208: 3-9.
- Tsuzura S, Ikeda Y, Suehiro T, Ota K, Osaki F, Arai K *et al.* Correlation of plasma oxidized low-density lipoprotein levels to vascular complications and human serum paraoxonase in patients with type 2 diabetes. *Metabolism*. 2004; 53: 297–302.
- Tzotzas T, Desrumaux C, Lagrost L Plasma phospholipid transfer protein (PLTP): review of an emerging cardiometabolic risk factor. *Obes Rev*. 2009 Jul;10(4):403-11. Epub 2009 Apr 21.
- Vakkilainen J, Jauhiainen M, Ylitalo K, Nuotio IO, Viikari JS, Ehnholm C, Taskinen MR. LDL particle size in familial combined hyperlipidemia: effects of serum lipids, lipoprotein-modifying enzymes, and lipid transfer proteins. *J Lipid Res*. 2002 Apr;43(4):598-603.
- Van der Zwan LP, Teerlink T, Dekker JM, Henry RMA, Stehouwer CDA, Jakobs C *et al.* Circulating oxidized LDL: determinants and association with brachial flow-mediated dilation. *J. Lipid Res*. 2009 Feb; 50(2):342-9.
- Van Haperen R, Samyn H, Moerland M, *et al.* Elevated expression of phospholipid transfer protein in bone marrow derived cells causes atherosclerosis. *PLoS ONE* 2008;3(5):e2255.

Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction – the first step toward coronary atherosclerosis. Japanese Circulation Society. 2008; In Press.

Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. *Diabetes Care*. 2009; 32(2): 314-321.

Vesey CJ, Kitchens RL, Wolfbauer G, Albers JJ, Munford RS. Lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from gram-negative bacterial membranes. *Infect Immun* 2000;68(5):2410–7.

Victor VM, Rocha M, Solá E, Bañuls C, Garcia-Malpartida K, Hernández-Mijares A. Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Curr Pharm Des*. 2009;15(26):2988-3002.

Virella G, Virella I, Leman RB, Pryor MB, Lopes-Virella MF. Anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies in patients with coronary heart disease and normal healthy volunteers. *Int J Clin Lab Res*. 1993;23(2):95-101.

Wang Y, Fang X, Wang S, Feng Y, Yin J. Relation between plasma oxLDL antibodies and oxLDL in the circulation. *Inflammation*. 2007; Apr 30(1-2):7-13.

Watson D, Subbanagounder G, Welsbie S, Faull F. Structural identification of a novel pro-inflammatory epoxyisoprostane phospholipid in mildly oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem*. 1999; 274:24787-24798.

Wick G, Perschinka H, Millonig G. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. *Trends Immunol*. 2001;22(12):665-9.

Wilson PW, Ben-Yehuda O, McNamara J, Massaro J, Witztum J, Reaven PD. Autoantibodies to oxidized LDL and cardiovascular risk: the Framingham Offspring Study Atherosclerosis. 2006 Dec;189(2):364-8.

Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med*. 2001; 11(3-4):93-102.

Wu X, Huang H, Tang F, *et al*. Regulated expression of endothelial lipase in atherosclerosis. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 315:233–238.

Yamazaki K, Bujo H, Taira K, Itou N, Shibasaki M, Takahashi K, Saito Y. Increased circulating malondialdehyde-modified LDL in the patients with familial combined hyperlipidemia and its relation with the hepatic lipase activity. *Atherosclerosis*. 2004;172(1):181-7.

Yang XP, Yan D, Qiao C, Liu RJ, Chen JG, Li J, Schneider M, Lagrost L, Xiao X, Jiang XC. Increased atherosclerotic lesions in apoE mice with plasma phospholipid transfer protein overexpression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23(9):1601-7.

Yazdanyar A, Yeang C, Jiang XC. Role of phospholipid transfer protein in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *Curr Atheroscler Rep*. 2011 Jun;13(3):242-8.

Yeh M, Leitinger N, de Martin R, Onai N, Matsushima K, Vora DK *et al.* Increased transcription of IL-8 in endothelial cells is differentially regulated by TNF-alpha and oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; Oct 21(10):1585-91.

Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld E, Parthasarathy S. Evidence for the presence of oxidatively modified low-density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J. Clin. Invest.* 1989; 84:1086-1095.

Yoshida H, Kisugi R (2010) Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta.* 2010;411(23-24): 1875-82.

Younis N, Sharma R, Soran H, Charlton-Menys V, Elseweidy M, Durrington PN. Glycation as an atherogenic modification of LDL. *Curr Opin Lipidol.* 2008; Aug;19(4):378-84.

Zarev S, Bonnefont-Rousselot D, Jedidi I, Cosson C, Couturier M, Legrand A *et al.* Extent of copper LDL oxidation depends on oxidation time and copper/LDL ratio: chemical characterization. *Arch Biochem Biophys.* 2003; Dec 1; 420(1):68-78.

Zhou X, Caligiuri G, Hamsten A, Lefvert AK, Hansson GK. LDL immunization induces T-cell-dependent antibody formation and protection against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; Jan 21(1):108-14.

8. *ANEXOS*

Anexo 1: Aprovação Comitê de Ética



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

CEP, 25/05/10.
(PARECER CEP: Nº 790/2006)

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE OXIDABILIDADE E INFLAMATÓRIOS EM PORTADORES DE HIPERALFALIPOPROTEINEMIA E SUA RELAÇÃO COM A ATROSCLEROSE PRECOCE".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Carla Evelyn Coimbra Nuñez

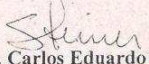
II - PARÊCER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o adendo que inclui o projeto "LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE OXIDADA (LDLox) E TÍTULOS DE ANTICORPOS CONTRA A LDLox EM INDIVÍDUOS NORMOLIPIDÊMICOS SEM DOENÇA ATROSCLERÓTICA ESTABELECIDADA", com a finalidade de dissertação de mestrado da aluna Paolla Fernanda Cezar Ferreira, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

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

III - DATA DA REUNIÃO.

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de maio de 2010.


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

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

FOXE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187

Página 1 de 1

Anexo 2: Manuscrito 1

OXIDATIVE MODIFICATION OF PLASMA LOW DENSITY LIPOPROTEINS AND THEIR ANTIBODIES: ASSOCIATION WITH THE REVERSE CHOLESTEROL TRANSPORT AND CAROTID ATHEROSCLEROSIS IN ADULTS WITHOUT ESTABLISHED ATHEROSCLEROTIC DISEASE

Ferreira, Paolla F. C.¹; D'Alexandri Fabio¹, Gidlund, Magnus A.²; Nakamura, Rui T.³; Schreiber, Roberto¹; Zago, Vanessa H. S.¹; de Faria, Eliana C.¹

¹Faculty of Medical Sciences, Department of Clinical Pathology and Center for Medicine and Experimental Surgery (NMCE), University of Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brazil

²Institute for Biological Sciences, Laboratory of Immunophysiopathology, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

³Diagnostic Image Laboratory, Campinas, São Paulo, Brazil

Keywords: oxidized LDL, antibodies against oxLDL, cIMT, CETP, PLTP, HL, LPL

Abstract

Aim: To study the unclear and controversial metabolic predictors and atherogenicity of oxidized LDL and the autoantibodies against it.

Methods: To investigate the metabolic regulation of these biomarkers we determined their metabolic predictors, the correlations between each other and with discriminators of oxLDL particle number (oxLDL/apoB100 and oxLDL/LDL-C ratios), in 107 mainly adult (18 to 79 years) without atherosclerosis manifestations. Also we investigated their relations with mean carotid intima media-thickness (cIMT).

Results: Analyzing the higher aoxLDL tertile, (≥ 0.35 OD, $n=34$), as compared to the other two tertiles, a reduced HL activity (40%, $p \leq 0.039$) was observed, and a borderline increased cIMT (27%, $p \leq 0.068$). In the highest oxLDL tertile (≥ 70.0 U/L, $n=36$) higher cholesterol (33%,

$p \leq 0.001$), LDL-C (40%, $p \leq 0.001$), apoB100 (40%, $p \leq 0.001$) but reduced CETP activity (-29%, $p \leq 0.029$) were observed, with higher cIMT (33%, $p \leq 0.003$).

Strong correlations between oxLDL and LDL-C ($r = 0.55$), apoB100 ($r = 0.52$) and both particle size markers ($r = 0.70$) were present, but not with aboxLDL. We observed significant correlation between aboxLDL and cIMT ($p = 0.041$) independent of oxLDL and borderline correlation between oxLDL and cIMT ($p = 0.059$) independent of aboxLDL. Bivariate positive correlations were similar between cIMT and aboxLDL ($r = 0.26$), oxLDL ($r = 0.34$), oxLDL/apoB100 ($r = 0.31$) and oxLDL/LDL-C ($r = 0.27$). In univariate linear regression analysis, aboxLDL was inversely regulated by PLTP ($R^2 = 12.44$) but in the multivariate only apoA1 was the significant predictor of aboxLDL ($R^2 = 3.98$), in contrast to a larger regulation of oxLDL by apoB100 ($R^2 = 23.49$), CETP, ($R^2 = 1.99$, inverse), and PLTP ($R^2 = 1.78$) and to oxLDL particle number, not influenced. LDL-C, was regulated only by apoB100 ($R^2 = 45.63$). In the highest oxLDL tertile a positive regulation with BMI was observed in the highest oxLDL tertile ($R^2 = 63.11$).

Conclusions: In adults without atherosclerotic disease, the metabolic regulation and carotid atherosclerosis of aboxLDL and oxLDL groups, characterized a dual trait in aboxLDL, as a contributor to carotid atherosclerosis, much less so than oxidized LDL, and with a modest atheroprotective role.

Introduction

Epidemiological studies have established that an elevated plasma level of low density lipoprotein (LDL) represents one of the most important risk factors for the development of cardiovascular disease (CVD) (1, 2). LDL is a hydrophilic complex of lipids and apolipoprotein B100 (apoB100), and constitutes one of the major lipid carriers in plasma (3, 4). A portion of plasma circulating LDL can traverse to the subendothelial space of the vessels, being removed from the general circulation (5). In the subendothelial space, LDL suffers chemical modifications, such as oxidations (6, 7, 4). Many lines of evidence suggest that LDL oxidation plays an important role in the pathogenesis of atherosclerosis, as indicated by the presence of oxidized LDL (oxLDL) particles in the early phase of atherosclerotic plaque formation (8).

oxLDL represents oxidative modifications of both lipid and apoB100 components and the structural changes may enhance LDL uptake by macrophage through scavenger receptors. oxLDL acts like a positive chemotactic factor for monocytes, which are transformed into macrophages and the avid uptake of oxLDL by macrophage scavenger receptors leads to lipid-laden foam cells and fatty streak development in the arterial wall, which is one of the earliest steps in the progression of the atherosclerotic plaque (5). oxLDL exert cytotoxic effects on endothelial cells, increasing the activation of platelets, stimulating the migration and proliferation of smooth muscle cells, thus initiating the atherosclerotic process (9, 7).

Oxidatively modified LDL is more immunogenic than the native form, thus this oxidative modification induces the formation of immunogenic epitopes in the LDL molecule, which leads to the formation of specific antibodies against oxLDL (aboxLDL) (10, 3). aboxLDL have been known for a long time, but their clinical role is unclear and published results are divergent (11,12). Whereas some studies have shown that in humans antibodies against oxidized LDL have been associated with atherosclerotic lesion development and cardiovascular disease (CVD) (13) other conversely reported that they can contribute to the protection of atheroma formation (14, 15), showing that the aboxLDL molecule can block the uptake of oxLDL by macrophages in atherosclerotic lesions, avoiding the formation of foam cells (16, 14).

A direct consequence of autoantibody synthesis against modified LDL is the formation of immune complexes (IC) (17, 18, 19). oxLDL have the potencial to form IC with their corresponding antibodies via Fc receptor. These complexes may then be subsequently involved in the progression of atherosclerosis because of their pro inflammatory properties (12). These IC are detectable both in serum (20) and in the atheromatous plaque (18), where both oxLDL and aboxLDL have been found. These IC are considerably more efficient than oxLDL in induction of lipid accumulation (16, 18), and in promotion of cell survival (12, 18).

One aspect in this field that should be investigated is the metabolic regulation of these biomarkers, in order to better understand the role of aboxLDL in the atherosclerotic process as compared to oxLDL. Some studies looked into the metabolic regulation of oxLDL (21) but very few of aboxLDL (16).

In the same scenario many other studies have investigated the relationship of oxLDL (22, 23, 17) and aboxLDL to the carotid intima-media thickness (cIMT) (24, 22). However these results were not conclusive.

The measurement of cIMT by ultrasonography is a non-invasive method to study coronary artery disease (CAD) and the values obtained correlate with other risk factors such as systolic blood pressure, serum lipids and smoking. It has also being positively linked to the extension of coronary artery disease in both women and men. cIMT is widely used in practice as an inexpensive, reliable, and reproducible method. It seems to be an independent risk factor once its regression does not reflect reduction in cardiovascular events (25).

In this study our purpose was to investigate the metabolic predictors of aBoxLDL and of oxLDL to understand their plasma variations and also their associations with carotid atherosclerosis through cIMT measurements.

Materials and Methods

Experimental protocol

The present cross-sectional study was conducted with 107 consecutive individuals, from 19 to 78 years of age, 59% were females (F) and 41% males (M). All patients were recruited from the University of Campinas Teaching Hospital, at the city of Campinas, São Paulo, Brazil and previously volunteered as controls in another research protocol at the University Medical Center.

The individuals were chosen after a preliminary laboratory selection and were invited by a letter to take part in the study. In a first visit their blood samples were taken after a 12h fast and a medical physical examination performed. Anthropometric data were taken. They answered a detailed questionnaire aimed at determining the presence of cardiovascular diseases (presence of angina pectoris, myocardial infarction, coronary insufficiency, the history of coronary revascularization procedures, coronary angioplasty and coronary grafting bypass), presence of diabetes, cigarette smoking, positive family history of CHD, frequency of alcohol consumption, physical exercise, use of hormone replacement therapy (HRT) or contraceptive pills and other related drugs, diabetes mellitus, BMI>30 (Kg/m²), liver and kidney diseases. The volunteers were excluded if they fulfilled one of the characteristics above. A few moderate dyslipidemic individuals were allowed to participate in the study and they accounted for less than 8% of all participants. Food consumption was measured with the use of a standardized questionnaire administered by a nutritionist.

The selected participants were invited to a second visit to have their intima-media thickness determined by Doppler ultrasound and always by the same radiologist.

This work was approved by the University of Campinas Medical School Ethics Committee (protocol number 790/2006) and all the participants signed an informed consent after their selection for participation in the study.

Biochemical measurements

Plasma glucose, urea, uric acid, alanine aminotransferase and gamma-glutamyltransferase were assayed in an automated system (Roche Modular System) using enzymatic methods from Roche (Roche diagnostics, Mannheim, Germany). Thyroid stimulating hormone (TSH) was measured by electrochemiluminescence, using a commercial kit in the Elecsys (Roche).

Lipids, apolipoproteins and lipoprotein analysis

Venous blood was obtained in the morning after the subjects had fasted for ≥ 12 h and was kept frozen at -80°C until assayed. Total cholesterol and triglycerides were determined using enzymatic methods and reagents provided by Roche (Roche diagnostics, Mannheim, Germany) in an automated system. Phospholipids (PL) were measured by enzymatic colorimetric assays (Wako Chemicals, VA, USA). High-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) was measured using a direct method (3rd generation) (26) in an automated system (Roche diagnostics, Mannheim, Germany). LDL-C was estimated by the Friedewald's formula (27). Apolipoproteins A-I, B100 and Lp(a) were measured by nephelometric assays in the system Dade Boehringer system (Boehringer, Germany).

Detection of antibodies to oxidized LDL

Antibodies against holo-oxidized LDL (oxLDL) were measured in mouse plasma by ELISA (28). Polystyrene microtiter plates (Costar, Cambridge, MA) were coated with 1 $\mu\text{g/mL}$ of human oxLDL (20 mM Cu^{2+} , 24h) in carbonate/bicarbonate buffer (20 $\mu\text{L/well}$), pH 9.4 and kept overnight at 4°C . The plates were blocked with a 5% solution of fat-free milk (Molico/Nestlé, SP, Brazil), and then incubated for 2h at room

temperature followed by washing four times with PBS (100 μ L). Plasma samples (20 μ L) were added and the plates were incubated overnight at 4°C followed by washing with 1% Tween 20 in PBS. A peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibody (20 μ L; 1:1.500) was added, and after 1 h at room temperature, the plates were washed. Finally, 75 μ L of substrate solution (250 mg of tetramethylbenzidine diluted in 50 mL of DMSO, 10 μ L of 30% H₂O₂, 12 mL of citrate buffer, pH 5.5) were added and, after incubation at room temperature for 15 min, the reaction was stopped by adding 25 μ L of 2.0 M sulfuric acid. The optical density (OD) was then measured in a microplate reader (Titertek Multiskan MCC/340P, model 2.20, Labsystems, Finland) at 450 nm. Results were expressed in relation to total plasma IgG concentration. For detection of total IgG levels, the plates were not treated with oxLDL but instead they were incubated with the individual plasma samples diluted 20,000 x in carbonate buffer. The procedure then followed exactly as described above. The aboxLDL were evaluated in all participants by ELISA incubation of samples with copper-oxidized LDL, as described by Gidlund *et al* (29). The results were presented as percentage of the optical density readings relative (arbitrary units) to the ranking values in the groups. The inter assay CV was 5-13%.

Detection of Oxidized LDL

The concentration of oxLDL in plasma was measured with a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay procedure by using the murine monoclonal antibody mAb-4E6 as capture antibody (bound to microtitration wells) and a peroxidase-conjugated antiapolipoprotein B100 antibody recognizing oxLDL bound to the solid phase with at least 60 lysines substituted by aldehydes and highly specific for oxLDL (22) (Mercodia AB, Uppsala, Sweden). Intra and inter-assay CV were 5-6% respectively (accord to the manufactory). To estimate the extent of LDL oxidation and the oxLDL particle number, the ratio of oxLDL to LDL-C and of oxLDL to apoB100 were calculated. These estimates were expressed as U oxLDL/mmol LDL-C and U oxLDL/g apoB100 respectively (21).

Determination of lipases and transfer proteins

Cholesteryl ester transfer protein (CETP), phospholipid transfer protein (PLTP), lipoprotein lipase (LPL), hepatic lipase (HL) activities were determined by radiometric methods as shown below.

Heparin (Liquemine[®], Roche) was injected intravenously (100 UI/kg of body weight) as described for measurements of lipoprotein lipase and hepatic lipase (30), and the samples were collected 15 min later. The plasma was isolated by centrifugation at 4°C, 1000 x g for 10 minutes.

LPL and HL activities were measured in post-heparin plasma samples, on the basis of fatty acid release, using a radiolabeled triolein emulsion as the substrate and NaCl (1 M) as the LPL inhibitor. The results were expressed as nmol FFA/mL/hour (30).

CETP was measured by an exogenous assay (31) that measures the transfer of radiolabeled cholesteryl ester (CE) between a normal donor pool of ¹⁴CE-HDL and an unlabeled acceptor mixture of VLDL plus LDL having the plasma as CETP source. The results were expressed as percent of cholesteryl ester transferred from HDL to VLDL plus LDL in 4h.

The activity of PLTP was measured by an exogenous radiometric method using phospholipid liposomes as the substrate (32) and an HDL pool, obtained from healthy plasma donors, as the acceptor. The activity was expressed as the rate of phospholipid transferred to HDL per hour.

The assays for CETP, PLTP and lipases were carried out in triplicates. The inter-assay coefficients of variation were 12%, 2%, 9% and 8%, respectively, for CETP, PLTP, LPL and HL.

Carotid ultrasound

High resolution B-mode carotid ultrasonography was performed by a single trained sonographer, who was blinded to the subject's identity, using a 6-9 MHz linear array ultrasound imaging system (ATL HDI 1500 and 3500 Ultrasound System, Advanced Technology Laboratories Ultrasound, Bothell, EUA). The far wall of the distal 1 cm of the left and right common carotid arteries was scanned according to a standardized method (33). The mean carotid intima-media thickness (cIMT) was calculated as the average of five measurements on each side (right and left) and expressed in mm. Maximum IMT (max cIMT) was defined as the maximum thickness of the intima-media complex, including plaques.

Other measurements

Body mass index (BMI) was determined as the weight (kg) divided by the height squared (m^2) (34). Waist circumference (WC) was measured at the level midway between the lowest rib margin and the iliac crest. Measurements were taken with a tape measure in centimeters and rounded to 0.5 cm while the subject was standing (35).

Statistical Analysis

The data were analyzed by SPSS and SAS statistical softwares. Logarithmic transformation was performed on individual values of skewed variables, if not otherwise stated. Differences in continuous and categorical variables were determined using Mann Whitney, Kruskal Wallis, Dunn, Tukey as well as ANCOVA and a X^2 test respectively. The Spearman test was used to correlate the variables in the groups and adjustments were made when needed.

Univariate regression analyses were also performed. A hierarchical multiple stepwise linear regression analysis was performed in all studied population to assess the influence of metabolic independent parameters on the dependent variables aboxLDL, oxLDL, oxLDL/apoB100 and oxLDL/LDL-C. The results were expressed as coefficients of determination R^2 that represent the percent of variation in the dependent variables explained by the independent variables. Sequentially the same dependent variables were tested for the influences of the same independent variables in two sub-population samples: in the higher tertiles of aboxLDL and of oxLDL. Differences and correlations at p-values ≤ 0.05 were considered statistically significant and between 0.5 and 0.10 were considered marginally significant.

Results

Clinical characteristics of the studied population

Table 1 summarizes the clinical characteristics of all the participants and by tertiles of aboxLDL and oxLDL.

The population was classified by tertiles defined by aboxLDL or oxLDL: lower (L) aboxLDL (≤ 0.23 OD, n=34), intermediate (I) tertile (0.24 - 0.35 OD, n = 34) and highest tertile (H) (≥ 0.36 OD, n = 34) and lower oxLDL tertile (≤ 46.2 U/L, n = 35), intermediate oxLDL tertile (46.3 -

69.9 U/L, n= 36) and highest tertile (≥ 70.0 U/L, n= 36). There was an overlap of individuals who belonged to the same tertile groups: in lower (22%); in intermediate (11%) and in higher (16%) groups.

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS OF THE STUDIED POPULATION SEPARATED IN ALL THE POPULATION AND BY TERILES

Variables	All (n=107)	<i>aboxLDL</i>				<i>oxLDL</i>			
		L (≤ 0.23 OD) (n=30-34)	I (0.24-0.35OD) (n=34)	H (≥ 0.36 OD) (n=33-34)	p-values	L (≤ 46.2 U/L) (n=33-35)	I (46.3-70 U/L) (n=34-36)	H (≥ 70.1 U/L) (n=34-36)	p-values
Age (years)	42 $\pm$ 16	34 $\pm$ 13 ^a	39 $\pm$ 14 ^a	52 $\pm$ 15 ^b	≤ 0.001	29 $\pm$ 9 ^a	46 $\pm$ 16 ^b	50 $\pm$ 13 ^{a,b}	≤ 0.001
Gender	71/36	19/15 ^a	21/13 ^{a,b}	28/06 ^b	0.052	20/15 ^{a,b}	21/15 ^a	30/6 ^b	0.030
BMI (Kg/m ²)	25 $\pm$ 5	23 $\pm$ 2 ^a	25 $\pm$ 4 ^{a,b}	26 $\pm$ 5 ^b	0.014	22 $\pm$ 3 ^a	25 $\pm$ 4 ^b	26 $\pm$ 4 ^b	≤ 0.001
WC (cm)	80 $\pm$ 10	77 $\pm$ 9 ^a	79 $\pm$ 12 ^{a,b}	83 $\pm$ 11 ^b	0.068	74 $\pm$ 8 ^a	82 $\pm$ 13 ^b	83 $\pm$ 10 ^{a,b}	0.001
SBP	123 $\pm$ 15	118 $\pm$ 9	125 $\pm$ 17	127 $\pm$ 16	NS	115 $\pm$ 11 ^a	130 $\pm$ 18 ^b	124 $\pm$ 13 ^{a,b}	≤ 0.001
DBP	80 $\pm$ 10	77 $\pm$ 7	81 $\pm$ 12	81 $\pm$ 8	NS	75 $\pm$ 9 ^a	83 $\pm$ 10 ^b	81 $\pm$ 9 ^{a,b}	0.005

Values expressed by means $\pm$ sd. aboxLDL: auto-antibodies against oxidized low density lipoprotein. oxLDL: oxidized low density lipoprotein. L: Lower tertile. I: Intermediate tertile. H: Higher tertile. BMI: Body mass index. WC: Waist circumference. SBP: Systolic Blood Pressure. DBP: Diastolic Blood Pressure. Mann-Whitney, X²-square and Kruskal-Wallis tests were used. ^{a, b, c} Groups with the same letter are not significantly different. p $\leq$ 0.05: significant differences and 0.05 < p < 0.10, borderline differences.

With increasing aboxLDL tertiles, age and BMI increased, as well as gender (women) and WC marginally. In contrast with increasing oxLDL tertiles all the clinical parameters (Table 1) were higher, WC: age, gender (women), BMI and blood pressure. The anthropometric differences of age, gender, BMI and SBP among the groups were corrected by ANCOVA.

Table 2 displays the biochemical parameters studied.

TABLE 2. LIPIDS, LIPOPROTEINS, APOLIPOPROTEINS, LIPASES AND TRANSFER PROTEINS ACTIVITIES OF ANTIBODIES AGAINST OXIDIZED LDL AND OXIDIZED LDL IN ALL THE POPULATION AND BY TERTILES

Variables	All (n=107)	<i>aboxLDL</i>				<i>oxLDL</i>			
		L (≤ 0.23 OD) (n=31-34)	I (0.24-0.35 OD) (n=31-34)	H (≥ 0.36 OD) (n=30-34)	p-values	L (≤ 46.2 U/L) (n=33-35)	I 46.3-70 U/L (n=34-36)	H (≥ 70.1 U/L) (n=29-36)	p-values
C (mg/dL)	198 ± 56	180 ± 56	199 ± 63	217 ± 43	NS	155 ± 47^a	204 ± 41^{a, b}	233 ± 49^b	≤ 0.001
TG (mg/dL)	87 ± 43	85 ± 45	95 ± 53	82 ± 27	NS	71 ± 38	89 ± 42	100 ± 43	NS
LDL-C (mg/dL)	116 ± 38	106 ± 33	115 ± 45	127 ± 34	NS	85 ± 21^a	118 ± 29^b	142 ± 38^c	≤ 0.001
VLDL-C (mg/dL)	17 ± 8.6	17 ± 9	19 ± 10	16 ± 5	NS	14 ± 7	17 ± 8	20 ± 8	NS
HDL-C (mg/dL)	66 ± 24	58 ± 30	65 ± 19	74 ± 16	NS	57 ± 30	69 ± 19	70 ± 17	NS
PL (mg/dL)	216 ± 50	219 ± 51	209 ± 46	219 ± 55	NS	195 ± 49	217 ± 36	239 ± 55	NS
apoAI (mg/dL)	164 ± 37	147 ± 27	165 ± 36	183 ± 39	NS	141 ± 33	172 ± 31	177 ± 37	NS
apoB100 (mg/dL)	93 ± 31	85 ± 26	94 ± 36	100 ± 28	NS	68 ± 17^a	97 ± 25^b	113 ± 28^c	≤ 0.001
C/HDL-C	3.1 ± 0.7	3.0 ± 0.8	3.0 ± 0.7	2.7 ± 0.7	NS	2.7 ± 0.7^a	3.0 ± 0.6^{a, b}	3.3 ± 0.8^b	0.013
TG/HDL-C	1.4 ± 0.8	1.4 ± 1.0	1.2 ± 0.8	1.1 ± 0.6	0.086	1.0 ± 0.7	1.2 ± 0.8	1.2 ± 0.8	NS
HL (nmol FFA/mL/h)	2137 ± 1383	2801 ± 1357^a	1805 ± 1252^{a, b}	1672 ± 1044^b	0.039	2552 ± 1372	2061 ± 1270	1792 ± 1442	NS
LPL (nmol FFA/mL/h)	2530 ± 1257	2203 ± 954	2695 ± 1238	2751 ± 1500	NS	2442 ± 876	2660 ± 1280	2479 ± 1557	NS
CETP (% of transfer)	14 ± 7.8	16 ± 7	13 ± 7	13 ± 8	NS	17.3 ± 7.0^a	11.6 ± 6.6^a	13.0 ± 8.5^{a, b}	0.029
PLTP (% of transfer)	15 ± 10	12.8 ± 10	13.4 ± 9	19.2 ± 11	NS	11 ± 7	14.7 ± 11	20 ± 10	NS
Glucose (mg/dL)	83 ± 8	84 ± 9	85 ± 9	81 ± 6	NS	83 ± 8	85 ± 9	83 ± 8	NS

Values expressed by means ± sd. aboxLDL: auto-antibodies against oxidized low density lipoprotein. oxLDL: oxidized low density lipoprotein. L: Lower tertile. I: Intermediate tertile. H: Higher tertile, aboxLDL in left panel, in right panel oxLDL. C: Cholesterol. TG: Triglycerides. LDL-C: Low density Lipoprotein. VLDL-C: Very-Low Density Lipoprotein. HDL-C: High-Density Lipoprotein. PL: Phospholipids. apoAI: Apolipoprotein AI. apoB100: Apolipoprotein B. C/HDL-C: Castelli I index. TG/HDL-C: LDL size estimation. HL: Hepatic lipase. LPL: Lipoprotein Lipase. CETP: Cholesteryl ester transfer protein. PLTP: Phospholipid Transfer Protein. Mann-Whitney, and Kruskal-Wallis, Tukey Kramer tests were used, p-values adjusted for age, gender (women), BMI and SBP by ANCOVA. p≤0.05: ^{a, b, c}. Groups with the same letter are not significantly different; significant differences and 0.05 < p > 0.10: borderline differences.

The only biochemical parameter that tended to decrease by aboxLDL tertiles was TG/HDL-C, an estimative of LDL particle size (36) but in oxLDL-C, LDL-C, apoB100, and the C/HDL-C (Castelli I index) (37) were increased by tertiles (Table 2). Fasting post-heparin plasma LPL did

not vary with tertiles for both markers (Table 2). HL activity decreased significantly by aboxLDL tertile. In oxLDL higher CETP activity decreased significantly, but PLTP activity did not change in either group. Glucose did not change with tertile distribution.

Antibodies against oxLDL titers, oxLDL and LDL oxidative markers and its correlations

In Table 3 the variations of antibodies and LDL oxidative markers in increasing titers of antibody and of oxLDL are shown.

TABLE 3. ANTIBODIES AGAINST OXIDIZED LDL, OXIDIZED LDL, oxLDL/apoB100 AND oxLDL/LDL-C RATIOS OF ALL THE POPULATION AND BY TERTILES

Variables	All (n=107)	<i>aboxLDL</i>			p-values	<i>oxLDL</i>			p-values
		L (≤ 0.23 OD) (n=34)	I (0.24-0.35 OD) (n=34)	H (≥ 0.36 OD) (n=34)		L (≤ 46.2 U/L) (n=34-35)	I (46.3-70 U/L) (n=35-36)	H (≥ 70.1 U/L) (n=33-36)	
aboxLDL (OD)	0.32 ± 0.16	0.16 ± 0.04	0.28 ± 0.03	0.51 ± 0.12	-	0.25 ± 0.13	0.34 ± 0.15	0.37 ± 0.18	NS
oxLDL (U/L)	62.9 ± 28.1	49 ± 20	64 ± 30	69 ± 21	NS	35 ± 8.21	58 ± 6.72	95 ± 20.50	-
oxLDL/apoB100 (U/g)	6.83 ± 2.66	5.83 ± 1.53	6.80 ± 1.85	6.95 ± 2.40	0.076	5.30 ± 1.34	6.27 ± 1.41	8.85 ± 3.28	≤ 0.001
oxLDL/LDL-C (U/mmol)	21.14 ± 7.80	18.19 ± 4.76	21.46 ± 6.36	21.94 ± 6.92	NS	16.32 ± 4.47	19.74 ± 4.01	27.23 ± 9.23	≤ 0.001

Values expressed by means ± sd. aboxLDL: auto-antibodies against oxidized low density lipoprotein. oxLDL: oxidized low density lipoprotein. L: Lower tertile. I: Intermediate tertile. H: Higher tertile, aboxLDL in left panel, in right panel oxLDL. oxLDL/apoB100 and oxLDL/LDL-C: LDL oxidation degree. Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Tukey Kramer tests were used tests were used; p-values adjusted for age, gender (women), BMI and SBP by ANCOVA. p≤0.05: significant differences and 0.05 < p > 0.10: borderline differences.

With increasing titers of aboxLDL, oxLDL/apoB100 (U/g) presented a borderline increase. oxLDL did not change. With oxLDL increasing concentrations oxLDL/apoB100 (U/g) and oxLDL/LDL (U/mmol) also increased, but not aboxLDL.

Relationships between variables

The correlations between antibodies against oxidized LDL, oxidized LDL and ratios oxLDL/apoB100 and oxLDL/LDL-C with biochemical, lipases and transfer proteins are displayed in Table 4.

TABLE 4. SIGNIFICANT SPEARMAN CORRELATION COEFFICIENTS OF ANTIBODIES AGAINST OXIDIZED LDL, OXIDIZED LDL, oxLDL/apoB100 AND oxLDL/LDL-C RATIOS WITH BIOCHEMICAL VARIABLES, LIPASES AND TRANSFER PROTEINS OF THE STUDIED POPULATION

Parameters	Variables	r	p-values
oxLDL (n=105-107)	C (mg/dL)	0.409	≤ 0.001
	LDL-C (mg/dL)	0.546	≤ 0.001
	apoB100 (mg/dL)	0.519	≤ 0.001
	C/HDL-C	0.429	≤ 0.001
	CETP(% of transfer)	-0.210	0.039
oxLDL/apoB100 (n=107)	oxLDL (U/L)	0.703	≤ 0.001
oxLDL/LDL-C (n=98-107)	oxLDL (U/L)	0.706	≤ 0.001
	PLTP(% of transfer)	0.219	0.036

C: Cholesterol. LDL-C: Low density Lipoprotein. apoB100: apolipoprotein B100. C/HDL-C: Castelli I index. CETP: Cholesteryl ester transfer protein. oxLDL: oxidized low density lipoprotein. PLTP: Phospholipid Transfer Protein. p-values adjusted for age, gender, BMI and SBP by ANCOVA; p≤ 0.05: significant differences

We also made the spearman correlation test between cIMT and aboxLDL adjusting for oxLDL in addition to other variables used above and oxLDL with CIMT adjusting for aboxLDL and we observed significant and borderline correlations $p=0.041$ and $p=0.059$, respectively.

Multivariate analysis

In order to evaluate if some of the observed relationships in the univariate analyses are independent of each other, metabolic and anthropometric effects of several variables were studied and several models of multiple linear regression analysis were proposed, where aboxLDL, oxLDL, oxLDL/apoB100 and oxLDL/LDL-C were addressed as dependent variables and age, sex, BMI, WC, SBP, DBP, C, TG, LDL-C, HDL-C, apoAI, apoB100, LH, LPL, CETP, PLTP, as independent variables.

TABLE 5. MULTIPLE LINEAR REGRESSION ANALYSIS FOR ANTIBODIES AGAINST OXIDIZED LDL, OXIDIZED LDL, oxLDL/apoB100 AND oxLDL/LDL-C RATIOS OF THE STUDIED POPULATION

Dependent variables	Selected variables	B (SE)	p-values	R ² Partial
aboxLDL (n=90)	apoAI	0.002 (0.001)	0.047	0.0398
oxLDL (n=92)	apoB100*	0.781 (0.114)	≤ 0.001	0.2349
	CETP*	-0.129 (0.051)	0.014	0.0199
	PLTP*	0.095 (0.046)	0.043	0.0178
oxLDL/apoB100 (n=92)	-	-	-	-
oxLDL/LDL-C (n=92)	-	-	-	-
LDL-C (n=92)	apoB100	0.861 (0.049)	< 0.001	0.4563

*Variables transformed into logarithms due of the absence of normal distribution. β (SE): slope and standard error. R²: Coefficients of determination. Multivariate analysis: controlled for age, gender, BMI, SBP and HDL-C. Linear regression fitting using stepwise method for variable selection: sex, age, BMI, WC, SBP, DBP, C, TG, LDL-C, HDL-C, apoAI, apoB100, LH, LPL, CETP, PLTP.

aboxLDL was associated negatively with PLTP ($R^2=12.44$, $p \leq 0.044$) in the univariate analysis. The multivariate analysis indicated that in all population sample aboxLDL (Table 5) was independently determined only by apoA1; on the contrary oxLDL was determined mainly by apoB100, CETP (inverse) and PLTP. In the linear regression models controlled for sex, age, BMI, SBP and HDL-C neither oxLDL/LDL-C and oxLDL/apoB100 ratios were associated with the selected variables. LPL and HL did not explain any of the four dependent variables. LDL-C in all population showed a strong regulation by apoB100 ($R^2=0.8659$ and $p<0.001$). Sequentially, the same dependent variables in the regression analysis model shown above were tested only in the highest tertiles of aboxLDL and oxLDL. BMI most strongly determined oxLDL (R^2 partial=0.6311, $p \leq 0.006$); no variables appeared to control aboxLDL in the highest tertile.

Levels by biomarker tertiles and relationships between carotid intima-media thickness and variables

We measured the consequences of increasing levels of aboxLDL and oxLDL on carotid IMT and maximal carotid value, as shown on Table 6.

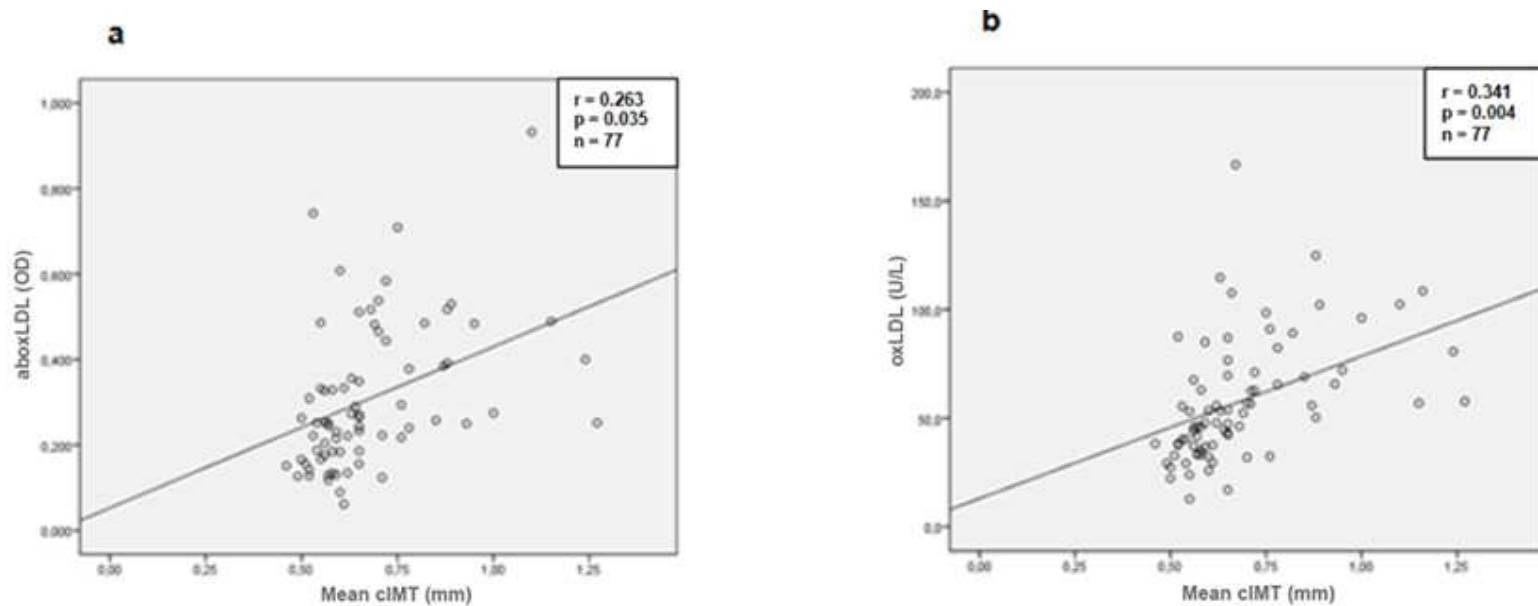
TABLE 6. COMMUN CAROTID THICKNESS OF THE STUDIED POPULATION SEPARATED BY TERTILES OF ANTIBODIES AGAINST OXIDIZED AND OXIDIZED LDL

Variables	All (n=77)	<i>aboxLDL</i>				<i>oxLDL</i>			
		L (≤ 0.23 OD) (n=29)	I (0.24-0.35 OD) (n=23)	H (≥ 0.36 OD) (n=21)	p-values	L (≤ 46.2 U/L) (n=33)	I 46.3-70 U/L) (n=25)	H (≥ 70.1 U/L) (n=19)	p-values
Mean cIMT (mm)	0.69 ± 0.21	0.58 ± 0.06	0.72 ± 0.28	0.80 ± 0.18	0.068	0.57 ± 0.05^a	0.72 ± 0.18^b	0.86 ± 0.29^b	0.003
Max cIMT (mm)	1.27	0.76	1.27	1.24	-	0.76	1.27	1.24	-

Values expressed by means $\pm$ sd. aboxLDL: auto-antibodies against oxidized low density lipoprotein. oxLDL: oxidized low density lipoprotein. L: Lower tertile. I: Intermediate tertile. H: Higher tertile, aboxLDL in left panel, in right panel oxLDL. Mean cIMT: carotid artery intima-media thickness median. Max cIMT: maximum carotid artery intima-media thickness value. Kruskal Wallis and Tukey Kramer tests were used; p-values adjusted for age, gender, BMI and SBP by ANCOVA. $p \leq 0.05$: significant differences and $0.05 < p > 0.10$: borderline differences.

Carotid IMT increases marginally with increased aboxLDL tertiles by 28% but with oxLDL tertiles a significant increase of 33% was observed between the first and third tertiles. The max cIMT was the same in both groups and no carotid plaques were observed.

The scatter plots show the relation of cIMT with aboxLDL, oxLDL and discriminators of oxidation and LDL particle number.



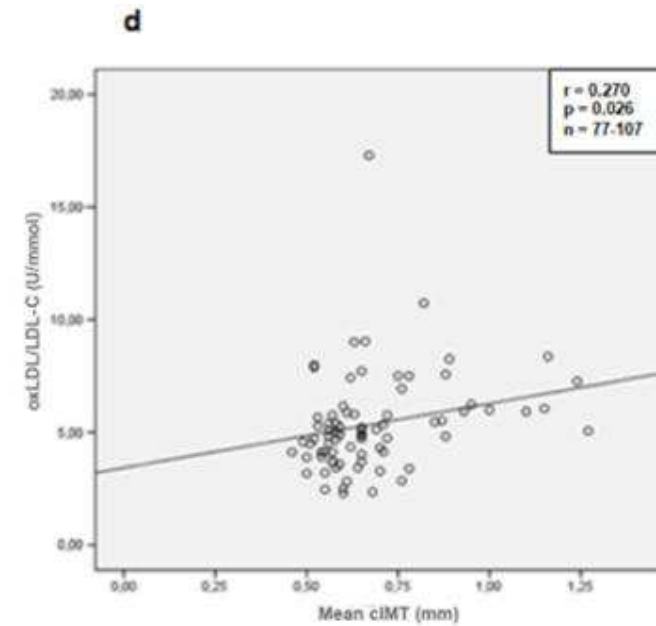
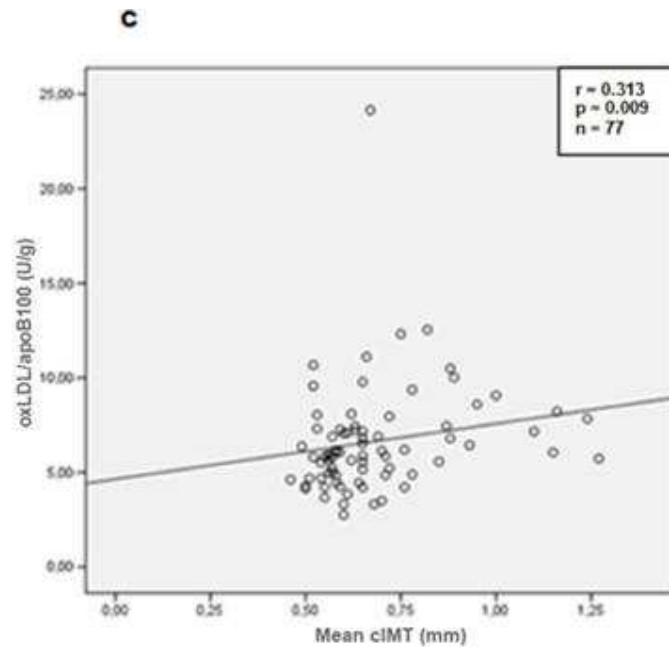


FIGURE 1 a-d: SIMILAR POSITIVE PARTIAL RELATIONSHIPS OF CAROTID INTIMA MEDIA THICKNESS WITH ANTIBODIES AGAINST OXIDIZED LDL, OXIDIZED LDL, oxLDL/apoB100 and oxLDL/LDL-C RATIOS OF THE STUDIED POPULATION. Correlations were evaluated by Sperman Test. p-values were adjusted for age, gender, BMI and SBP by ANCOVA. $p \leq 0.05$: significant differences.

In Figure 1 a-d: aboxLDL, oxLDL, oxLDL/apoB100 and oxLDL/LDL-C ratios were significantly and positively associated after adjustment for anthropometric variables. There was great similarity among these associations (Fig. 1 a-d), suggesting the presence of immune complexes on carotid wall. LDL-C was not associated with cIMT in the studied population (not shown).

Discussion

LDL oxidation has been identified as a key element in the development of the atherosclerotic injury (38, 39). It acts as a pro-inflammatory agent by inducing auto-antibodies and endothelial dysfunction (40). Antibodies against oxLDL are reported to play important roles in atherosclerosis. These antibodies have been found in human plasma, as well as in human atherosclerotic lesions (38) and in laboratory animals (41). Investigating this is central in understanding their contributions to the atherosclerotic lesion.

Atherosclerosis is a progressive disease and asymptomatic individuals can reveal the basic mechanisms involved in the formation of the lesions. In this study we investigated the relationships of carotid atherosclerosis with circulating oxidized LDL, oxidized LDL particle number and antibodies against oxidized LDL. We went forward and investigated which metabolic factors could control aboxLDL, oxLDL and oxLDL particle number in adults without established atherosclerotic disease.

The characterization of the degree of oxidation and the immunological response to it were observed by the reduced LDL size (T

G/HDL-C) (36), a higher number of oxidized LDL particles and by the marginal oxLDL/apoB100 increase along with aboxLDL tertiles suggesting the antibody response to oxidized LDL (21).

Oxidized LDL correlated strongly with LDL-C and apoB100. Similar results indicating this association were found by Shoji *et al* (16) who studied 130 healthy subjects. They described a positive correlation, maybe due to substrate availability for LDL oxidation to proceed. In contrast, another study showed (42) no correlation between these parameters and suggested that the oxidation of the LDL does not occur in the blood, but rather in the arterial wall.

Likewise oxLDL correlated to the particle number, apoB100 and Castelli I index but there was no correlations with aboxLDL. It was previously believed that aboxLDL mirrored the amount of the oxLDL antigens in vivo (22). However, some studies with healthy individuals have demonstrated an inverse relationship with circulating oxLDL. This discrepancy indicates the complexity of the system, and raises a possibility that the path physiological roles of aboxLDL may vary depending on the stages of atherosclerosis.

Searching for the average variation of cIMT in this study between the first versus third tertile of aboxLDL or oxLDL, the observed values were 0.22 and 0.29 mm respectively. These variations account for increases in risk of myocardial infarction as described earlier, 0.77% with each 0.07 mm of carotid change (43). Although the risk was higher with increasing oxLDL the maximal intima-media thickness value were equal in both groups. The very similar correlations of the markers with cIMT, which could indicate the formation of immune complexes at the artery wall (12, 18, 19).

Because plasma oxLDL correlated positively and strongly with LDL-C, we examined whether this association was independent and if which variables could predict oxLDL, oxLDL particle number, aboxLDL and LDL-C using a linear multiple regression analysis. In contrast to LDL-C explained physiologically and mainly by apoB100, oxidized LDL determinants were apoB100, CETP (inverse, as in the bivariate correlation) and PLTP.

Cholesteryl ester transfer protein (CETP) is a plasma lipid transfer protein that has the ability to transfer cholesteryl esters from HDL toward apolipoprotein B-containing lipoproteins playing an important role in reverse cholesterol transport (RCT). CETP activity was lower in the highest oxLDL tertile and presented an inverse relationship with LDL oxidation as described earlier in different studies (44, 45), because CETP transfers oxidized lipids from apoB100 containing lipoproteins to HDL acting like an anti-atherogenic protein. CETP activity was significantly reduced by ~24% in the highest oxLDL tertile group.

Moreover oxLDL was positively regulated by phospholipid transfer protein (PLTP) an important modulator of lipoprotein metabolism, including inter particle phospholipids transfer, remodeling of HDL, cholesterol and phospholipids efflux from peripheral tissues and the production of hepatic VLDL. PLTP also plays an important role in inflammation and oxidative stress (46, 47). The consequences of the positive

modulation by PLTP are described in the model of over expression of PLTP in mice where the decrease of vitamin E content in LDL is parallel to its increased oxidation (48). In the highest oxLDL tertile, oxLDL was explained strongly and by BMI, as described earlier (22).

On the other hand aboxLDL was associated negatively with PLTP, an anti-atherogenic relationship and a beneficial trait seen in the univariate analysis. In the multivariate approach its regulation was simpler and explained positively by the antiatherogenic apoprotein AI (49).

apoAI is a predominant component in HDL that has been related to LCAT activation (50, 51) and HL inhibition (52) and increases RCT, suggesting that others regulators can be indirectly involved in the lesion development. In accord with that HL activity was significantly reduced in ~40% in the highest aboxLDL tertile group. In HL deficiency, HDL particles are relatively rich in triglycerides and not as good substrates for CETP and have lower antioxidant capacity increasing the oxidative stress and generating more oxLDL particles.

These findings indicate that oxLDL, was determined by apoB100, CETP and PLTP, but aboxLDL only by apoAI. The oxLDL/LDL-C and oxLDL/apoB100 ratios have similar behavior on cIMT as aboxLDL and oxLDL, but the size was independent of the metabolic regulators in the models.

Summarizing the most part less atherogenic role of the aboxLDL can be revealed in this study by the weaker response of cIMT in the highest tertiles of aboxLDL ($p \leq 0.068$) as compared to oxLDL ($p \leq 0.003$) and the lack of correlation with oxLDL and oxLDL/apoB100. But in opposition the correlation of aboxLDL with cIMT was equal to the other of three biomarkers suggesting the formation of immune complexes at the artery wall (12, 18, 19) and a predominant non-protective effect of aboxLDL on the inflammatory carotid atherosclerosis. Corroborating with this are the equally high maximal cIMT values. Therefore these relationships characterize a dual trait for aboxLDL. With higher apoAI concentrations a positive modulation of antibodies is observed but apoAI can reduce HL activity (as described in this study) and increase LCAT leading to less protective LDL oxidation action of HDL particles and inducing aboxLDL production.

In oxLDL groups the relationship with markers are clearly pro-atherogenic, except for the action of CETP transferring oxidized lipids from LDL to HDL, with athero protective action. The LDL oxidation and particle number ratios presented significant positive significant associations with carotid thickness.

To our knowledge this is the first study in adults without established atherosclerotic disease that explored the main reverse cholesterol transport proteins as determinants of oxLDL and aboxLDL and characterized aboxLDL as a contributor to carotid atherosclerosis, much less so than oxidized LDL and with a modest atheroprotective role. This study encourages further investigations to elucidate the mechanisms involved in the atherogenicity of these biomarkers in adults without established atherosclerotic disease and in pathological states.

Ongoing studies in our laboratory should further elucidate these mechanisms.

Acknowledgements

We thank Fernanda Dutra Santiago Bassora and Helymar Machado for their excellent statistical contributions and all useful suggestions. This work was partially supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), SP, Brazil (# 60585-9) and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil, (# 471380). No additional external funding was received for this study.

References

- 1- Sharrett AR, Ballantyne CM, Coady MA, Heiss G, Sorlie PD et al. (2001) Coronary Heart Disease Prediction From Lipoprotein Cholesterol Levels, Triglycerides, Lipoprotein(a), Apolipoproteins A-I and B, and HDL Density Subfractions: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation*. 104:1108-1113.
- 2- Arsenault BJ, Boekholdt SM, Kastelein JJ (2011) Lipid parameters for measuring risk of cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 8(4):197-206.
- 3- Hansson GK, Hermansson A (2011) The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol*. 12(3): 204-12.

- 4- Miller YI, Choi SH, Fang L, Tsimikas S (2010) Lipoprotein modification and macrophage uptake: role of pathologic cholesterol transport in atherogenesis. *Subcell Biochem.* 51:229-51.
- 5- Matsuura E, Hughes GR, Khamashta MA (2008) Oxidation of LDL and its clinical implication. *Autoimmun Rev.* 7(7): 558-66.
- 6- Getz GS (2005) Thematic review series: the immune system and atherogenesis. immune function in atherogenesis. *J Lipid Res.* 46(1): 1-10.
- 7- Yoshida H, Kisugi R (2010) Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta.* 14;411(23-24):1875-82.
- 8- Gleissner CA, Leitinger N, Ley K (2007) Effects of native and modified low-density lipoproteins on monocyte recruitment in atherosclerosis. *Hypertension.* 50(2):276-83.
- 9- Mizuno Y, Jacob RF, Mason RP (2011) Inflammation and the Development of Atherosclerosis: Effects of Lipid-Lowering Therapy. *J Atheroscler Thromb.* In press.
- 10- Lopes-Virella MF, Virella G (2010) Clinical significance of the humoral immune response to modified LDL. *Clin Immunol.* 134(1):55-65.
- 11- Chou MY, Hartvigsen K, Hansen LF, Fogelstrand L, Shaw PX et al. (2008) Oxidation-specific epitopes are important targets of innate immunity. *J Intern Med.* 263(5): 479-88.
- 12- Burut DF, Karim Y, Ferns GA (2010) The role of immune complexes in atherogenesis. *Angiology.* 61(7):679-89.

- 13-** Fredrikson GN, Söderberg I, Lindholm M, Dimayuga P, Chyu KY et al. (2003) Inhibition of atherosclerosis in apoE-null mice by immunization with apoB-100 peptide sequences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(5): 879-84.
- 14-** Tinahones FJ, Gómez-Zumaquero JM, Garrido-Sánchez L, García-Fuentes E, Rojo-Martínez G et al. (2005) Influence of age and sex on levels of anti-oxidized LDL antibodies and anti-LDL immune complexes in the general population. *J Lipid Res.* 46(3): 452-7.
- 15-** Shaw PX, Hökkö S, Tsimikas S, Chang MK, Palinski W et al (2001) Human-derived anti-oxidized LDL autoantibody blocks uptake of oxidized LDL by macrophages and localizes to atherosclerotic lesions in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21(8):1333-9.
- 16-** Shoji T, Nishizawa Y, Fukumoto M, Shimamura K, Kimura J et al. (2000) Inverse relationship between circulating oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and anti-oxLDL antibody levels in healthy subjects. *Atherosclerosis.* 148(1):171-7.
- 17-** Lopes-Virella MF, Hunt KJ, Baker NL, Lachin J, Nathan DM et al. (2011) Levels of oxidized LDL and advanced glycation end products-modified LDL in circulating immune complexes are strongly associated with increased levels of carotid intima-media thickness and its progression in type 1 diabetes. *Diabetes.* 60(2): 582-9.
- 18-** Al Gadban MM, Smith KJ, Soodavar F, Piansay C, Chassereau C et al (2010) Differential trafficking of oxidized LDL and oxidized LDL immune complexes in macrophages: impact on oxidative stress. *PLoS One.* 2;5(9).
- 19-** Virella G, Atchley D, Koskinen S, Zheng D, Lopes-Virella MF et al (2002) Proatherogenic and proinflammatory properties of immune complexes prepared with purified human oxLDL antibodies and human oxLDL. *Clin Immunol.* 105(1):81-92.

- 20-** Virella G, Lopes-Virella MF (2008) Atherogenesis and the humoral immune response to modified lipoproteins. *Atherosclerosis*. 200(2):239-46.
- 21-** Van der Zwan LP, Teerlink T, Dekker JM, Henry RMA, Stehouwer CDA et al. (2009) Circulating oxidized LDL: determinants and association with brachial flow-mediated dilation. *J. Lipid Res*. 50(2): 342-9.
- 22-** Chen HW, Kuo CL, Huang CS, Kuo SJ, Liu CS (2008) Oxidized low-density lipoproteins, autoantibodies against oxidized low-density lipoproteins and carotid intima media thickness in a clinically healthy population. *Cardiology*. 110(4):252-9.
- 23-** Fukumoto M, Shoji T, Emoto M, Kawagishi T, Okuno Y, et al. (2000) Antibodies against oxidized LDL and carotid artery intima-media thickness in a healthy population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20(3):703-7.
- 24-** Hulthe J, Bokemark L, Fagerberg B (2001) Antibodies to oxidized LDL in relation to intima-media thickness in carotid and femoral arteries in 58-year-old subjectively clinically healthy men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 21(1): 101-7.
- 25-** Taylor AJ, Bots ML, Kastelein JJ (2011) Vascular disease: Meta-regression of CIMT trials-data in, garbage out. *Nat Rev Cardiol*. 3:128-30.
- 26-** Nauck M, März W, Jarausch J, Cobbaert C, Sägers A et al. (1997) Multicenter evaluation of a homogeneous assay for HDL-C without sample pretreatment. *Clin Chem*. 43 (9): 1622-9.
- 27-** Rifai N, Bacharik PP, Albers JJ (1999) Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In: Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3^o ed. Philadelphia: WB Saunders Company. 809-861.

- 28-** Damasceno NR, Goto H, Rodrigues FM, Dias CT, Okawabata FS et al. (2000) Soy protein isolate reduces the oxidizability of LDL and the generation of oxidized LDL autoantibodies in rabbits with diet-induced atherosclerosis. *J Nutr.* 130: 2641-2647.
- 29-** Gidlund M, Damasceno NR, Lindoso JA, Abdalla DS Goto H (1996) Monoclonal antibodies against low density lipoprotein with various degrees of oxidative modifications. *Braz J Med Res.* 29: 1625-28.
- 30-** Ehnholm C, Kuusi T (1986) Preparation, characterization and measurement of hepatic lipase. *Methods Enzymol.* 129: 7716-738.
- 31-** Lagrost L, Desrumaux C, Masson D, Deckert C, Gamber P (1998) Structure and function of the plasma phospholipid transfer protein. *Curr Opin Lipidol* 9(3): 203-9.
- 32-** Damen J, Regts J, Scherphorp G (1982) Transfer of [14C] phosphatidylcholine between liposomes and human plasma high density lipoprotein. Partial purification of transfer stimulation plasma factor using a rapid transfer assay. *Biochim Biophys Acta.* 712: 444-452.
- 33-** Simons PC, Algra A, Bots ML, Grobbee DE, Van Der Graaf Y (1999) Common carotid intima-media thickness and arterial stiffness: indicators of cardiovascular risk in high-risk patients. *Circulation.* 100(9): 951-957.
- 34-** Hara K, Matsushita Y, Horikoshi M, Yoshiike N, Yokoyama T et al. (2006) A proposal for the cutoff point of waist circumference for the diagnosis of metabolic syndrome in the Japanese population. *Diabetes Care.* 29: 1123-4.

- 35-** Satoh H, Kishi R, Tsutsui H (2010) Body mass index can similarly predict the presence of multiple cardiovascular risk factors in middle-aged Japanese subjects as waist circumference. *Intern Med.* 49: 977–82.
- 36-** Boizel R, Benhamou PY, Lardy B, Laporte F, Foulon T et al. (2000) Ratio of triglycerides to HDL cholesterol is an indicator of LDL particle size in patients with type 2 diabetes and normal HDL cholesterol levels. *Diabetes Care.* 23: 1679-1685.
- 37-** Arcanjo CL, Piccirilo LJ, Machado IV, de Andrade Jr CRM, Clemente EL et al. (2005) Avaliação de dislipidemia e índices antropométricos em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 49(6): 951-958.
- 38-** Ishigaki Y, Oka Y, Katagiri H (2009) Circulating oxidized LDL: a biomarker and a pathogenic factor. *Curr Opin Lipidol.* 20(5):363-9.
- 39-** Sigala F, Kotsinas A, Savari P, Filis K, Markantonis S et al. (2010) Oxidized LDL in human carotid plaques is related to symptomatic carotid disease and lesion instability. *J Vasc Surg.* 52(3):704-13.
- 40-** Rouhl RP, van Oostenbrugge RJ, Theunissen RO, Kottnerus IL, Staals J et al. (2010) Autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein in cerebral small vessel disease. *Stroke.* 41(11):2687-9.
- 41-** Witztum JL, Steinberg D (2001) The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med.* 11(3-4):93-102.
- 42-** Wang Y, Fang X, Wang S, Feng Y, Yin J (2007) Relation between plasma oxLDL antibodies and oxLDL in the circulation. *Inflammation.* 30(1-2):7-13.

- 43-**Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Selzer RH, Liu CR et al. (1998) The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Intern Med.* 128: 262-269.
- 44-**Wang J, Gu Q, Li K, Zhang C (2007) CETP and oxidized LDL levels increase in dyslipidemic subjects. *Clin Biochem.* 40(13-14): 995-9.
- 45-**Castilho LN, Oliveira HC, Cazita PM, de Oliveira AC, Sesso A et al. (2001) Oxidation of LDL enhances the cholesteryl ester transfer protein (CETP)-mediated cholesteryl ester transfer rate to HDL, bringing on a diminished net transfer of cholesteryl ester from HDL to oxidized LDL. *Clin Chim Acta.* 304(1-2): 99-106.
- 46-**Yazdanyar A, Yeang C, Jiang XC (2011) Role of Phospholipid Transfer Protein in High-Density Lipoprotein- Mediated Reverse Cholesterol Transport. *Curr Atheroscler Rep.*
- 47-**Quintão EC, Cazita PM (2010) Lipid transfer proteins: past, present and perspectives. *Atherosclerosis.* 209(1): 1-9.
- 48-**Yang XP, Yan D, Qiao C, Liu RJ, Chen JG et al. (2003) Increased atherosclerotic lesions in apoE mice with plasma phospholipid transfer protein overexpression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(9):1601-7.
- 49-**Hedrick CC, Castellani LW, Wong H, Lusis AJ (2001) In vivo interactions of apoA-II, apoA-I, and hepatic lipase contributing to HDL structure and antiatherogenic functions. *J Lipid Res.* 42(4): 563-70.
- 50-**Shao B, Oda MN, Oram JF, Heinecke JW (2010) Myeloperoxidase: an oxidative pathway for generating dysfunctional high-density lipoprotein. *Chem Res Toxicol.* 15;23(3):447-54.

- 51-** Martin DD, Budamagunta MS, Ryan RO, Voss JC, Oda MN (2006) Apolipoprotein A-I assumes a “looped belt” conformation on reconstituted high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 281: 20418–20426.
- 52-** Ramsamy TA, Neville TA, Chauhan BM, Aggarwal D, Sparks DL (2000) Apolipoprotein A-I regulates lipid hydrolysis by hepatic lipase. *J Biol Chem.* 275(43):33480-6.

Anexo 3: Banco de Dados

PACIENTE	IDADE (anos)	GÊNERO (F/M)	IMC (Kg/m2)	CC (cm)	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	C (mg/dL)	TG (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	LDL-C (mmol/L)
1	53	F	26,9	91	130	100	187	66	129,8	3,36
2	36	M	27,4	94	120	80	125	110	64	1,66
3	23	F	24,1	74	110	70	123	45	75	1,94
4	24	M	23,7	82	140	90	147	69	85	2,20
5	55	F	25,9	84	130	75	160	70	83	2,15
6	34	F	22,4	79	100	60	136	44	80	2,07
7	22	M	24,7	81	110	70	159	155	95	2,46
8	25	M	25,3	-	120	80	137	73	84	2,18
9	40	M	22,3	72	170	100	198	92	113,6	2,94
10	46	F	-	98	120	80	228	175	147	3,81
11	23	M	22,3	66	120	80	156	97	87	2,25
12	45	F	25,3	-	-	-	201	81	129	3,34
13	47	F	31,5	74	120	80	191	58	112,4	2,91
14	33	F	-	-	110	70	242	139	162,2	4,20
15	23	M	22,7	71	120	80	124	47	71	1,84
16	31	F	19,5	67	115	80	151	56	86	2,23
17	19	M	18,1	65	120	80	117	37	73	1,89
18	19	F	19,3	63	120	80	117	32	64	1,66
19	22	M	20,4	70	110	70	135	51	78	2,02
20	30	M	23,7	73	110	70	130	71	80	2,07
21	57	F	21,3	75	130	80	228	64	151,2	3,92
22	59	F	27,3	83	180	110	217	231	110,8	2,87
23	23	M	22,1	80	120	80	152	80	111	2,87
24	37	M	25,0	89	130	80	170	158	106	2,75
25	40	M	21,5	71	140	90	182	96	130	3,37
26	43	M	25,9	90	120	80	190	114	131,2	3,40

27	21	M	22,0	76	120	75	175	53	111	2,87
28	24	M	25,8	89	120	90	126	61	74	1,92
29	23	F	23,0	76	120	80	192	141	93	2,41
30	25	M	20,1	73	120	80	158	76	110	2,85
31	19	M	18,5	72	120	70	120	32	71	1,84
32	18	M	25,8	68	110	70	149	68	96,4	2,50
33	79	F	-	-	150	90	258	91	173,8	4,50
34	45	F	20,3	92	110	70	170	58	99,4	2,57
35	44	F	23,4	77	130	95	223	63	147,4	3,82
36	44	F	30,3	83	110	70	210	164	127,2	3,29
37	55	F	25,3	70	140	90	226	85	152	3,94
38	64	F	25,0	98	120	75	200	74	119,2	3,09
39	39	F	25,7	76	110	70	118	37	71	1,84
40	20	F	19,1	67	100	60	124	44	57,2	1,48
41	28	F	23,1	73	100	70	148	58	103	2,67
42	21	F	20,1	68	100	60	148	57	86	2,23
43	24	M	18,8	81	120	80	124	59	75,2	1,95
44	24	M	25,1	86	110	70	154	48	105	2,72
45	26	M	25,8	75	130	80	170	94	98	2,54
46	40	F	29,4	72	120	70	162	47	112	2,90
47	38	F	24,3	74	120	80	204	76	128	3,32
48	21	F	20,3	68	110	70	86	41	48	1,24
49	30	M	24,6	85	110	70	149	81	92	2,38
50	43	M	25,3	95	110	70	221	114	150	3,89
51	33	M	24,5	77	110	60	117	90	46	1,19
52	25	M	19,4	67	110	70	147	74	97	2,51
53	30	M	23,9	76	110	80	155	60	103	2,67
54	66	F	33,8	85	120	80	244	110	167	4,33
55	29	F	22,4	73	110	70	165	48	103	2,67
56	32	F	22,9	76	120	80	178	71	113	2,93
57	24	F	20,6	66	120	80	142	44	81	2,10

58	25	F	19,8	64	110	70	156	78	90	2,33
59	30	M	20,1	71	110	70	122	41	52	1,35
60	27	M	23,1	82	120	80	143	69	73	1,89
61	65	F	30,4	92	170	100	240	68	136	3,52
62	71	F	23,9	74	140	90	220	62	115,6	2,99
63	73	F	24,1	87	150	90	205	125	94	2,43
64	46	F	44,1	67	120	80	250	81	164,8	4,27
65	32	F	37,9	93	140	90	206	83	107,4	2,78
66	66	F	31,2	89	120	80	213	97	122,6	3,18
67	29	M	28,2	81	130	90	251	181	125,8	3,26
68	70	F	22,8	76	130	90	211	139	111,2	2,88
69	33	M	26,5	98	130	80	238	152	126	3,26
70	45	F	41,6	106	120	85	201	95	101	2,62
71	23	F	18,1	67	120	80	223	110	113	2,93
72	33	F	23,3	72	110	80	207	87	92,6	2,40
73	78	M	31,6	106	150	100	227	66	123,8	3,21
74	60	F	20,5	63	130	80	268	93	160,4	4,15
75	64	F	23,0	81	110	70	225	111	112,8	2,92
76	48	F	24,6	100	140	90	183	50	82	2,12
77	39	F	23,8	72	120	80	221	56	114,8	2,97
78	54	F	24,2	70	120	80	236	125	135	3,50
79	65	F	25,1	86	130	80	328	216	202,8	5,25
80	42	F	23,9	91	130	80	207	82	118,6	3,07
81	71	F	29,1	80	170	100	283	76	174,8	4,53
82	57	F	24,7	82	130	75	239	184	131,2	3,40
83	38	F	27,2	94	120	80	232	66	133,8	3,47
84	61	F	26,6	90	140	95	360	220	105	2,72
85	42	F	26,6	69	140	90	187	58	89,4	2,32
86	67	F	25,0	85	120	80	350	105	249	6,45
87	38	F	25,5	83	140	110	236	77	151,6	3,93
88	65	F	27,2	94	130	80	244	90	157	4,07

89	36	F	21,7	71	110	80	186	77	97,6	2,53
90	58	F	21,3	72	130	85	247	81	123,8	3,21
91	47	M	29,3	104	150	100	316	197	188,6	4,88
92	72	F	40,2	117	140	80	236	168	126,4	3,27
93	43	F	28,9	83	110	80	301	82	202,6	5,25
94	64	F	29,5	81	110	70	282	141	172,8	4,48
95	47	F	31,2	96	130	80	261	66	161,8	4,19
96	60	M	30,5	105	160	110	208	34	114,2	2,96
97	66	F	22,1	64	120	80	209	60	109	2,82
98	49	F	27,5	88	110	80	243	96	151,8	3,93
99	38	F	23,0	65	110	70	184	78	100,4	2,60
100	59	F	25,8	95	110	80	192	48	102,4	2,65
101	54	F	-	-	-	-	199	66	113,8	2,95
102	48	F	19,4	90	120	80	323	73	227	5,88
103	52	F	21,9	68	120	80	207	76	109,8	2,84
104	40	M	19,6	69	110	70	211	60	93	2,41
105	41	M	20,9	76	120	80	197	44	104,2	2,70
106	62	F	26,8	85	130	80	298	99	193,2	5,00
107	64	F	28,8	99	150	90	300	115	197	5,10

PACIENTE	VLDL-C (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	PL (mg/dL)	apoA1 (mg/dL)	apoB100 (mg/dL)	C/HDL-C	TG/HDL-C	LH (nmolFFA/mL/h)	LPL (nmolFFA/mL/h)
1	13,2	44	-	134	132	1,02	130,03	6848	1262
2	22	39		121	53	2,28	23,21	-	-
3	9	48	186,83	149	57	2,61	21,81	2448	1839
4	14	48	150	121	76	1,59	47,74	4557	2457
5	14	63	-	172	71	2,42	29,31	1298	445
6	9	53	210,17	148	65	2,28	28,55	1948	3932
7	31	33	208,5	124	92	1,35	68,26	4279	1555
8	15	48	250	156	72	2,17	33,23	4010	2065
9	18,4	66	191	145	84	1,73	48,66	1730	3458

10	35	46	305	161	138	1,17	118,29	2102	602
11	19	50	274	155	76	2,04	37,26	2352	2176
12	16	56	300	144	97	1,48	65,34	-	-
13	11,6	67	171	154	94	1,64	57,38	3062	4760
14	27,8	52	342	155	117	1,32	88,32	1615	1545
15	9	50	160,17	132	54	2,44	22,09	4885	1463
16	11	52	218,5	133	65	2,05	31,77	2680	2552
17	7	44	213,5	104	63	1,65	38,16	3074	1101
18	6	47	175,17	123	46	2,67	17,20	2089	2711
19	10	48	126	132	64	2,06	31,03	3738	3938
20	14	39	188,5	132	67	1,97	34,01	1981	3378
21	12,8	64	164	163	129	1,26	102,09	3571	3399
22	46,2	60	-	190	102	1,86	54,76	671	3592
23	16	35	191,83	117	82	1,43	57,47	5112	1329
24	32	32	228,5	113	97	1,16	83,27	4384	1926
25	19	41	203,5	118	100	1,18	84,75	2224	2176
26	22,8	36	-	111	80	1,39	57,66	2016	755
27	11	53	197	147	79	1,86	42,46	2729	1450
28	12	52	190,17	141	52	2,71	19,18	4155	3007
29	28	65	243	166	83	2,00	41,50	1991	3591
30	15	44	201,83	116	85	1,36	62,28	2224	666
31	6	43	61	107	55	1,95	28,27	3457	2436
32	13,6	39	-	96	69	1,39	49,59	-	-
33	18,2	66	231	213	163	1,31	124,74	1463	3614
34	11,6	59	175	161	83	1,94	42,79	2764	2674
35	12,6	63	196	172	97	1,77	54,70	-	-
36	32,8	50	-	149	154	0,97	159,17	404	2959
37	17	57	269	157	121	1,30	93,25	2508	4453
38	14,8	66	234	161	97	1,66	58,44	-	-
39	7	40	168,5	121	53	2,28	23,21	2069	2891
40	8,8	58	122	135	52	2,60	20,03	351	2694

41	12	46	211,83	128	79	1,62	48,76	1392	1282
42	11	57	230,17	147	66	2,23	29,63	4588	1637
43	11,8	37		147	69	2,13	32,39	4174	1672
44	10	44	180,17	130	69	1,88	36,62	2403	2184
45	19	61	186	166	79	2,10	37,60	3664	2860
46	9	49	184	133	72	1,85	38,98	2277	3824
47	15	61	206	160	91	1,76	51,76	1202	2782
48	8	30	129	74	40	1,85	21,62	1433	2810
49	16	41	221,83	142	74	1,92	38,56	2536	2012
50	23	48	-	170	136	1,25	108,80	-	-
51	18	65	181,83	166	33	5,03	6,56	2144	2525
52	15	35	234	118	78	1,51	51,56	2570	1591
53	12	37	191	107	87	1,23	70,74	4683	2528
54	22	55	144	132	102	1,29	78,82	3901	1990
55	10	52	240,17	147	86	1,71	50,31	2275	2289
56	14	51	243,5	119	72	1,65	43,56	1731	2546
57	9	52	188,5	140	67	2,09	32,06	2005	1968
58	16	59	233,5	146	64	2,28	28,05	1054	884
59	8	60	163,5	161	35	4,60	7,61	2641	2747
60	14	52	115	132	70	1,89	37,12	5606	3237
61	14	95	178	215	101	2,13	47,45	793	2059
62	12,4	92	200	191	84	2,27	36,94	1779	5312
63	25	86	271	222	94	2,36	39,80	218	350
64	16,2	69	240	138	119	1,16	102,62	965	2309
65	16,6	82	188	192	103	1,86	55,26	772	1610
66	19,4	71	226	201	113	1,78	63,53	787	2440
67	36,2	89	244	180	114	1,58	72,20	2913	2957
68	27,8	72	-	178	103	1,73	59,60	760	641
69	30	78	189	175	130	1,35	96,57	2952	2936
70	19	81	228	147	75	1,96	38,27	2784	2085
71	22	88	291	255	94	2,71	34,65	795	3772

72	17,4	97	235	197	70	2,81	24,87	2634	3478
73	13,2	90	220	239	102	2,34	43,53	2104	4291
74	18,6	89	281	194	106	1,83	57,92	280	130
75	22,2	90	271	218	89	2,45	36,33	-	-
76	10	91	203	178	59	3,02	19,56	1573	5657
77	11,2	95	190	182	78	2,33	33,43	186	5731
78	25	76	344	184	110	1,67	65,76	848	866
79	43,2	82	267	160	172	0,93	184,90	245	1641
80	16,4	72	203	189	107	1,77	60,58	2637	3592
81	15,2	93	285	259	124	2,09	59,37	1256	2823
82	36,8	71	321	251	147	1,71	86,09	640	925
83	13,2	85	183	224	116	1,93	60,07	1394	2031
84	44	211	198	221	77	2,87	26,83	237	745
85	11,6	86	225	196	79	2,48	31,84	784	4444
86	21	80	286	194	157	1,24	127,06	2179	2938
87	15,4	69	217	157	125	1,26	99,52	934	3624
88	18	69	230	180	131	1,37	95,34	722	681
89	15,4	73	299	149	79	1,89	41,89	1088	2756
90	16,2	107	273	257	144	1,78	80,68	175	3239
91	39,4	88	267	211	146	1,45	101,02	1119	1284
92	33,6	76	192	213	124	1,72	72,19	203	1464
93	16,4	82	226	207	154	1,34	114,57	2455	3961
94	28,2	81	325	167	143	1,17	122,45	723	2246
95	13,2	86	233	212	124	1,71	72,53	2252	5054
96	6,8	87	189	194	101	1,92	52,58	4589	3881
97	12	88	191	183	79	2,32	34,10	965	3201
98	19,2	72	152	196	120	1,63	73,47	2648	3253
99	15,6	68	223	189	97	1,95	49,78	1103	4652
100	9,6	80	208	175	76	2,30	33,01	1207	81
101	13,2	72	236	139	77	1,81	42,65	1734	3219
102	15	74	237	161	152	1,06	143,50	1212	1591

103	15,2	82	206	200	88	2,27	38,72	846	2349
104	12	106	185	199	81	2,46	32,97	2490	2495
105	8,8	84	169	201	74	2,72	27,24	3338	5215
106	19,8	85	291	169	134	1,26	106,25	1800	2457
107	23	80	231	183	140	1,31	107,10	547	2361

PACIENTE	CETP (% de transferência)	PLTP (%de transferência)	GLICOSE (G/dL)	acLDLox (OD)	LDLox (U/L)
1	9,6	-	95	-	37,6
2	23,6	-	98	0,333	24
3	27,9	8,94	74	0,167	45,9
4	11,3	21,02	82	0,329	89,1
5	9,8	28,23	70	0,485	37,7
6	22,8	8,93	76	0,142	45,7
7	17,4	10,13	86	0,176	46,8
8	23,8	8,8	86	0,181	61,2
9	4,6	8,94	78	-	76,6
10	12,9	-	85	0,233	53,6
11	22,2	12,98	75	0,09	32,2
12	9,3	-	87	0,184	111,4
13	3,9	11,51	87	0,253	85
14	15,7	-	87	0,131	33,2
15	14,4	10,93	78	0,134	42,4
16	26,5	5,97	83	0,186	37,2
17	11,3	8,57	88	0,204	29,3
18	21,2	5,92	87	0,127	43,3
19	16,3	5,88	87	0,246	46,1
20	17	5,7	79	0,245	62,5
21	9,1	8,06	79	0,124	65,7
22	7,6	-	101	0,25	87,5
23	27,1	8,77	85	0,128	56,7

24	20,3	8,69	94	0,223	44,5
25	23,4	9,6	94	0,29	98,5
26	21,8	-	-	0,709	53,9
27	10,4	5,34	105	0,271	31,9
28	27,5	14,08	82	0,465	38,3
29	15,4	15,76	86	0,152	47,9
30	15,4	7,54	90	0,135	40,2
31	16,4	11,01	81	0,742	166,7
32	-	-	80	-	57
33	15,9	8,92	88	0,538	86,9
34	8,5	18,71	83	0,388	69,6
35	6,8	7,71	80	0,244	114,6
36	12,5	-	78	0,273	55,7
37	7,7	7,85	85	0,227	107,7
38	6,7	12,84	85	-	29,2
39	26,7	11,51	109	0,188	22,2
40	22,3	14,23	68	0,263	35,2
41	16,1	9,31	83	-	27,3
42	19	3,96	77	0,166	55,8
43	8,5	10,97	85	0,222	55,4
44	19,6	3,01	86	0,222	47,9
45	12,8	4,23	77	0,216	58,5
46	13,6	41,49	82	0,486	53
47	24,2	5,9	99	0,486	38,3
48	13,7	8,7	88	0,309	53,4
49	15,8	4,89	92	0,356	71,1
50	-	5,8	82	0,584	17
51	21,3	6,45	82	0,349	44
52	19,7	10,33	79	0,253	36,9
53	26,1	25,1	68	0,231	98,2
54	26,5	37,6	90	0,374	40,3

55	19,8	7,54	93	0,252	41,7
56	28,7	6,67	86	0,13	33,4
57	19,2	8	77	0,118	33,3
58	15,1	8,49	82	0,252	12,8
59	15,4	10,16	82	0,332	32,8
60	13,9	14,59	80	0,156	66,6
61	5,8	14,75	75	0,719	72,1
62	9,2	9,86	88	0,484	56,9
63	5,4	28,95	74	0,489	124,8
64	4,7	6,56	97	0,392	43,2
65	7,6	4,42	84	0,265	68,3
66	22	34,85	112	0,208	67,6
67	5,1	19,22	83	0,327	80,7
68	8,5	28,56	80	0,4	63
69	6,2	12,99	101	0,185	55,8
70	8,2	12,18	88	0,385	25,9
71	7,6	7,52	71	0,608	42,5
72	5,9	7,79	75	0,293	102,2
73	28	17,15	82	0,53	96,1
74	4,6	14,52	71	0,275	87
75	27,7	17,35	82	0,511	58,1
76	4,7	35,44	78	0,384	71,2
77	14,3	14,3	71	0,295	96,5
78	6,9	29,99	64	0,181	78,9
79	6,9	19,44	89	0,254	75,1
80	16,6	30,36	86	0,245	76,8
81	14,1	27,49	87	0,397	91
82	18,4	32,73	81	0,294	71,8
83	6,4	1,18	83	0,732	29,6
84	4,6	39,8	90	0,062	71,6
85	8,8	27,77	82	0,349	112

86	11	35,24	113	0,279	87
87	7,8	13,54	81	0,279	60,6
88	3,6	2,8	88	0,534	66,5
89	10,1	31,05	70	0,463	60,5
90	13,3	7,5	84	0,51	138,7
91	0,8	2,94	86	0,356	69
92	5	8,97	86	0,258	113,7
93	5,4	15,94	72	0,349	102,4
94	24,7	33,37	82	0,932	85,2
95	1,8	19,41	77	0,46	57,8
96	22,7	3,61	88	0,252	62,8
97	5,6	17,71	80	0,444	96,6
98	25,3	31,49	76	0,444	58,3
99	10	34,54	79	0,482	52,4
100	1,9	8,51	86	0,482	32,4
101	1,6	2,48	83	0,218	107,8
102	4,4	30,85	81	0,09	82,4
103	28,8	28,22	89	0,24	47,5
104	6,1	19,88	93	0,156	50,3
105	21,6	16,9	79	0,517	65,4
106	13,3	27,18	80	0,378	46,3
107	10,1	25,05	82	0,517	-

PACIENTE	LDLox/apoB100 (U/g)	LDLox/LDL-C (U/mmol)	CAROTIDA A	CAROTIDA B	Média cEIM
1	8,22	32,27	1,12	1,16	1,16
2	7,09	22,68	0,64	0,61	0,61
3	4,21	12,36	0,54	0,55	0,55
4	6,04	20,85	0,52	0,58	0,58

5	12,55	41,45	0,76	0,82	0,82
6	5,80	18,19	0,54	0,52	0,52
7	4,97	18,57	0,62	0,56	0,56
8	6,50	21,51	-	-	-
9	7,29	20,80	-	-	-
10	5,55	20,12	0,65	0,65	0,65
11	7,05	23,79	0,66	0,6	0,6
12	3,32	9,64	0,6	0,6	0,6
13	11,85	38,27	-	-	-
14	7,26	20,23	0,58	0,59	0,59
15	6,15	18,05	0,64	0,58	0,58
16	6,52	19,04	0,62	0,65	0,65
17	5,90	19,68	0,58	0,56	0,56
18	6,37	17,68	0,44	0,49	0,49
19	6,77	21,43	-	-	-
20	6,88	22,25	0,58	0,57	0,57
21	4,84	15,96	0,74	0,71	0,71
22	6,44	22,89	0,82	0,93	0,93
23	10,67	30,44	0,46	0,52	0,52
24	5,85	20,65	0,7	0,71	0,71
25	4,45	13,22	0,64	0,64	0,64
26	12,31	28,99	0,7	0,75	0,75
27	6,82	18,75	0,62	0,65	0,65
28	6,13	16,64	0,7	0,7	0,7
29	4,61	15,90	0,46	0,5	0,46
30	5,64	16,81	0,6	0,62	0,62
31	7,31	21,86	0,48	0,53	0,53
32	24,16	66,77	0,68	0,67	0,67
33	3,50	12,66	0,68	0,7	0,7
34	10,47	33,75	-	-	-
35	7,18	18,23	0,66	0,65	0,65

36	7,44	34,79	0,62	0,63	0,63
37	4,60	14,15	-	-	-
38	11,10	34,89	0,64	0,66	0,66
39	5,51	15,88	0,54	0,54	0,54
40	4,27	14,99	0,56	0,5	0,5
41	4,46	13,19	0,52	0,58	0,58
42	4,14	12,26	0,5	0,5	0,5
43	8,09	28,65	0,58	0,62	0,62
44	8,03	20,37	0,52	0,5	0,53
45	6,06	18,87	0,54	0,59	0,59
46	8,13	20,17	-	-	-
47	5,82	15,99	0,56	0,55	0,55
48	9,58	30,81	0,48	0,55	0,52
49	7,22	22,41	0,58	0,63	0,63
50	5,23	18,30	0,72	0,72	0,72
51	5,15	14,27	0,62	0,65	0,65
52	5,64	17,51	0,52	0,56	0,56
53	4,24	13,83	0,58	0,59	0,59
54	9,63	22,70	-	-	-
55	4,69	15,11	0,56	0,54	0,54
56	5,79	14,25	0,52	0,57	0,57
57	4,99	15,92	0,54	0,57	0,57
58	5,20	14,29	0,56	0,57	0,57
59	3,66	9,50	0,6	0,55	0,55
60	4,69	17,35	0,5	0,51	0,51
61	6,59	18,91	-	-	-
62	8,58	24,08	0,9	0,95	0,95
63	6,05	23,37	1,16	1,15	1,15
64	10,49	29,24	0,94	0,88	0,88
65	4,19	15,53	0,62	0,65	0,65
66	6,04	21,51	-	-	-

67	5,93	20,75	0,53	0,56	0,56
68	7,83	28,02	1,16	1,24	1,24
69	4,85	19,31	0,5	0,58	0,58
70	7,44	21,33	0,86	0,87	0,87
71	2,76	8,85	0,6	0,6	0,6
72	6,07	17,72	-	-	-
73	10,02	31,87	0,86	0,89	0,89
74	9,07	23,13	1,04	1	1
75	9,78	29,78	0,72	0,65	0,65
76	9,85	27,36	-	-	-
77	9,13	23,95	-	-	-
78	8,77	27,60	-	-	-
79	4,59	15,02	-	-	-
80	7,02	24,45	-	-	-
81	6,19	16,96	-	-	-
82	6,19	26,78	0,78	1,76	0,76
83	6,19	20,72	-	-	-
84	3,84	10,88	0,58	0,61	0,61
85	9,06	30,92	-	-	-
86	7,13	17,37	-	-	-
87	6,96	22,16	-	-	-
88	4,63	14,90	-	-	-
89	8,42	26,31	-	-	-
90	4,20	18,87	-	-	-
91	9,50	28,39	-	-	-
92	5,56	21,08	0,84	0,85	0,85
93	7,38	21,67	-	-	-
94	7,16	22,88	1,14	1,1	1,1
95	6,87	20,33	-	-	-
96	5,72	19,54	1,3	1,27	1,27
97	7,95	22,25	0,72	0,72	0,72

98	8,05	24,57	-	-	-
99	6,01	22,42	-	-	-
100	6,89	19,76	0,64	0,69	0,69
101	4,21	10,99	0,62	0,76	0,76
102	7,09	18,34	-	-	-
103	9,36	28,98	0,86	0,78	0,78
104	5,86	19,72	0,64	0,65	0,65
105	6,80	18,64	0,86	0,88	0,88
106	4,88	13,07	0,84	0,78	0,78
107	3,31	9,07	0,72	0,68	0,68