

**FERNANDO GANZAROLLI DE OLIVEIRA**

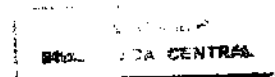
**EFEITO DA VITAMINA E SOBRE OS NÍVEIS DE  
AUTO-ANTICORPOS FORMADOS CONTRA LDL  
OXIDADA EM HAMSTERS HIPERLIPIDÊMICOS**

*Dissertação de mestrado apresentada ao curso  
de pós-graduação em Clínica Médica da  
Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas para  
obtenção do título de Mestre em Medicina na  
área de concentração da Clínica Médica*

**ORIENTADOR: Dr. Lício Augusto Velloso**

**Campinas**

**1998**



36342

|              |                                     |
|--------------|-------------------------------------|
| UNIDADE      | BC                                  |
| N.º CHAMADA: |                                     |
| V.           | Ex.                                 |
| TI. MBO      | BC/36342                            |
| PROC.        | 229/99                              |
| C            | <input type="checkbox"/>            |
| D            | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO        | R\$ 11,00                           |
| DATA         | 28/06/99                            |
| N.º CPD      |                                     |

CM-00120440-6

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

Ol40e

Oliveira, Fernando Ganzarolli de

Efeito da vitamina e sobre os níveis de auto-anticorpos formados contra LDL oxidada em hamsters hiperlipidêmicos / Fernando Ganzarolli de Oliveira. Campinas, SP : [s.n.], 1998.

Orientador : Lício Augusto Velloso

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Aterosclerose. 2. lipoproteínas. 3. Colesterol. 4. Triglicérides. I. Lício Augusto Velloso. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

*Dedicatória*

*Aos meus pais,*

*Alcindo e Nadir*

**Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

**Orientador(a): Prof.Dr. LÍCIO AUGUSTO VELLOSO**



**Membros:**

1.

2.

3.

4.

5.

**Curso de Pós-Graduação em Medicina, área Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

**Data:**

## *AGRADECIMENTOS*

---

São inúmeras as dívidas de gratidão por mim contraídas ao longo do desenvolvimento deste trabalho;

Agradeço ao Dr Lício pela maneira serena e amiga com que me conduziu na orientação deste trabalho.

Ao Dr. Cláudio L. Rossi pela solicitude e pelo importante apoio prestado.

Ao meu irmão, Marcelo, pela efetiva participação em muitas etapas deste trabalho.

Aos meus pais, pelo incentivo, apoio, e carinho, sempre.

Ao Dr. Mário Saad, por ter me acolhido e incentivado na carreira médica e acadêmica, oferecendo um exemplo pessoal muito precioso.

À Cláudia Martelli e à Sônia, do Instituto de Química, pelo indispensável apoio prestado.

À Carla, pela valorosa ajuda e pelos muitos problemas que me ajudou a resolver ao longo do caminho.

À Dra. Eliana e à Dra. Lúcia, do Departamento de Patologia Clínica, que sempre demonstraram interesse em discutir aspectos deste trabalho, muitas vezes contribuindo para uma compreensão mais ampla do assunto.

Ao Sr. Luiz e à Conceição, sempre prontos a colaborar das mais variadas formas.

Ao serviço de estatística da F.C.M. UNICAMP

À Carmen, sem o incentivo de quem eu não teria sequer iniciado esta importante etapa da minha carreira.

|                                           | Pág.     |
|-------------------------------------------|----------|
| <b>RESUMO.....</b>                        | <i>i</i> |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                 | 1        |
| <b>2. ARTIGO.....</b>                     | 16       |
| Abstract.....                             | 18       |
| Introduction.....                         | 19       |
| Materials and Methods.....                | 20       |
| Results.....                              | 23       |
| Discussion.....                           | 24       |
| References.....                           | 27       |
| Figure legends.....                       | 31       |
| <b>3. DISCUSSÃO.....</b>                  | 40       |
| <b>4. CONCLUSÕES.....</b>                 | 46       |
| <b>5. SUMMARY.....</b>                    | 48       |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b> | 50       |

## *LISTA DE ABREVIATURAS*

---

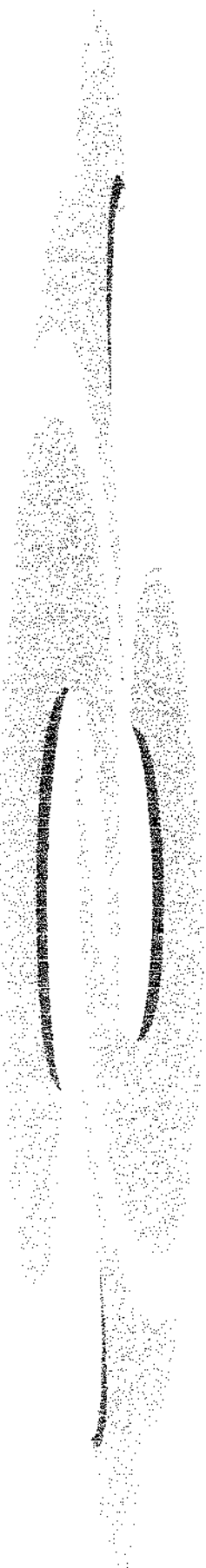
|                        |                                                                  |
|------------------------|------------------------------------------------------------------|
| <sup>125</sup> I-LDL - | lipoproteína de baixa densidade conjugada com <sup>125</sup> I   |
| 4-HNE -                | 4 hidroxí-nonenal                                                |
| BSA -                  | soroalbumina bovina                                              |
| ELISA -                | imunoensaio enzimático                                           |
| HDL -                  | lipoproteína de alta densidade                                   |
| HPLC -                 | cromatografia líquida de alta resolução                          |
| IgG -                  | imunoglobulina G                                                 |
| IgM -                  | imunoglobulina M                                                 |
| LDL -                  | Lipoproteína de baixa densidade                                  |
| MDA -                  | dialdeído malônico                                               |
| MDA-LDL -              | lipoproteína de baixa densidade conjugada com dialdeído malônico |
| Ox-LDL -               | lipoproteína de baixa densidade oxidada                          |
| PBS -                  | tampão fosfato-salina                                            |
| SEM -                  | erro padrão da média                                             |
| TMB -                  | tetrametilbenzidina                                              |
| VE -                   | vitamina E                                                       |
| VLDL -                 | lipoproteína de densidade muito baixa                            |
| WHHL -                 | coelhos Watanabe congenitamente hipercolesterolêmicos            |

## ***LISTA DE ILUSTRAÇÕES***

---

|               | <b>Pág.</b> |
|---------------|-------------|
| Table I.....  | 31          |
| Figure 1..... | 34          |
| Figure 2..... | 35          |
| Figure 3..... | 36          |
| Figure 4..... | 37          |
| Figure 5..... | 38          |
| Figure 6..... | 39          |





***RESUMO***

A oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) desempenha um papel importante dentro do processo de aterogênese, e a suplementação terapêutica de vitamina E (VE) torna as partículas de LDL mais resistentes à oxidação. Partículas de LDL oxidadas (Ox-LDL) são imunogênicas, levando à formação de anticorpos específicos. Usando uma modificação da técnica de ELISA, nós analisamos a modulação dos títulos de anticorpos contra um epítipo de Ox-LDL em hamsters alimentados com ração padrão, acrescida de 2% de colesterol e 10% de manteiga, com e sem adição de VE 0,2%. Os grupos alimentados com dieta hipercolesterolêmica apresentaram um aumento de três vezes no colesterol sérico ( $p < 0,01$ ), e de duas vezes nos triglicérides ( $p < 0,01$ ), em relação ao grupo controle. A suplementação de VE não alterou os níveis de lipoproteínas séricas, porém, levou a uma menor formação de autoanticorpos (Anti-Ox-LDL) ( $p < 0,05$ ). Houve correlação logarítmica inversa significativa entre o nível sérico de VE padronizado por lípidos e o aumento dos anticorpos anti Ox-LDL formados ao longo do experimento (20 semanas) ( $r = -0,46$ ;  $p < 0,01$ ). Tais resultados indicam que a suplementação de VE pode desempenhar um papel protetor frente ao processo autoimune que acompanha a aterosclerose.

# ***1. INTRODUÇÃO***

A aterosclerose é uma doença de patogênese complexa, de alta prevalência, relacionada a elevada morbidade, sendo hoje a principal causa de morte na civilização ocidental (WHO - MONICA PROJECT, 1994). O processo que dá origem a esta doença é certamente multifatorial, e geralmente relaciona-se à presença de fatores de risco modificáveis (principalmente fumo, hipertensão arterial e hipercolesterolemia) e não modificáveis (como idade, sexo e antecedente familiar). Macroscopicamente, a lesão mais precocemente detectável ao longo deste processo é a estria gordurosa, que consiste basicamente em depósitos subendoteliais de macrófagos ricos em lípidos (denominados *células espumosas*) e, em menor quantidade, células musculares lisas ricas em lípidos. Essa lesão primordial, potencialmente reversível, normalmente evolui de maneira lenta, ao longo de décadas, até constituir-se em lesões mais avançadas (como as placas fibrosas), as quais passam a ser obstrutivas e podem levar a eventos isquêmicos agudos (como o infarto do miocárdio) quando instabilizadas (ROSS, 1997). Assim, é de extrema importância a compreensão dos mecanismos envolvidos na formação da célula espumosa, principalmente diante da perspectiva de intervenções na gênese e evolução das placas de aterosclerose.

Os lípidos séricos desempenham um papel central na fisiopatologia da aterosclerose. As substâncias apolares (colesterol livre, colesterol esterificado, triglicerídeos e vitaminas lipossolúveis) são transportadas no plasma na forma de micelas de fosfolípidos, denominadas lipoproteínas. De acordo com seu tamanho, densidade, proporção relativa de colesterol/triglicérides no seu núcleo, e proteínas marcadoras de superfície (apolipoproteínas), elas podem ser classificadas em quilomicrons, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), ou de alta densidade (HDL), e a lipoproteína  $\alpha$ , bastante semelhante à LDL. Quando as lipoproteínas ricas em triglicérides (quilomicron e VLDL) são submetidas à ação da enzima lipase lipoprotéica endotelial, passam a ser reconhecidas com o adjetivo *restantes*, e a VLDL restante pode ser denominada lipoproteína de densidade intermediária (IDL). Dessas, a que se reveste de maior importância no processo de aterogênese é a LDL, que corresponde à principal partícula transportadora de colesterol (KANE & MALLOY, 1994).

Os macrófagos transformam-se em células espumosas por endocitose mediada por receptores, principalmente de partículas de LDL. Estas adentram as células do organismo por um processo específico de endocitose, que envolve a presença de receptores na superfície celular que reconhecem apolipoproteínas (no caso da LDL, a apolipoproteína B100). Estes receptores localizam-se aglutinados em pontos circunscritos da superfície celular, denominados *coated pits* (poços recobertos), e, uma vez que a LDL ligue-se a eles, é englobada por uma vesícula de invaginação que a leva para o interior da célula, onde ela é enzimaticamente desmontada em seus componentes, e o receptor é reciclado para a superfície da membrana celular novamente (BROWN & GOLDSTEIN, 1986). Esse mecanismo é o responsável pelo catabolismo da LDL no organismo, sendo sua meia-vida e concentração plasmática dependentes da atividade desses receptores, principalmente nos hepatócitos. A LDL atravessa o endotélio vascular, em proporção direta à sua concentração sérica, pelo mesmo processo de endocitose, porém, neste caso cerca de 10% das partículas de LDL (em condições normais) chegam até o espaço subendotelial (RIBEIRO JORGE, 1997).

Uma questão intrigante consiste no maciço desenvolvimento de células espumosas verificado em humanos ou animais de experimentação congenitamente desprovidos de receptores celulares para LDL. A resposta a este paradoxo surgiu a partir de experimentos em cultura de macrófagos peritoneais de camundongo, onde demonstrou-se que os mesmos eram incapazes de se transformar em células espumosas quando incubados em meio rico em LDL (GOLDSTEIN *et al.*, 1979). Embora estas células expressem em sua superfície o referido receptor de LDL, o mesmo é auto-regulado, ou seja, sofre modulação negativa, impedindo o acúmulo de lípidos no citoplasma. Porém, quando as mesmas células são incubadas em meio contendo LDL modificada por anidrido acético (LDL acetilada), esta é incorporada rapidamente às células, de uma maneira saturável (indicando o mecanismo de endocitose mediada por receptor), mas não auto regulada, levando assim à formação de células espumosas. A incorporação de LDL acetilada marcada com  $^{125}\text{I}$  também não apresenta inibição competitiva quando se acrescenta LDL nativa (íntegra) no meio. Os mesmos achados ocorrem ao se analisar monócitos humanos, além de macrófagos e células de Kupffer de outros animais, mas não em células não macrofágicas. Com tais experimentos, os pesquisadores postularam a existência de uma via alternativa para

degradação da LDL, expressa primariamente em células “lixadeiras” (*scavenger cells*), através de receptores para LDL modificada. Não há, entretanto, evidências que indiquem processo de acetilação da LDL *in vivo*. Por outro lado, verificou-se posteriormente que vários padrões de modificação química da LDL, de suposta ocorrência em nosso organismo (oxidação, glicosilação, glico-oxidação), levam-na a ser reconhecida e incorporada pelos macrófagos/monócitos, possivelmente pelo mesmo receptor.

Sabe-se que a oxidação da LDL ocorre *in vivo*, tanto em humanos como em modelos animais, em condições fisiológicas ou não (STEINBERG *et al.*, 1989) e a LDL oxidada *in vivo* é extensivamente captada por monócitos/ macrófagos em cultura celular, levando-os a constituírem células espumosas (KLIMOV, 1988).

A oxidação da LDL leva à formação de uma classe heterogênea de partículas com algumas características comuns, quando comparadas à LDL nativa:

1. Reduzida capacidade de reconhecimento e captação pela via do receptor de LDL (GOLDSTEIN *et al.*, 1979);
2. Grande afinidade pelo receptor de LDL modificada, podendo levar à formação de células espumosas (KLIMOV, 1988);
3. Aumento das cargas elétricas negativas, com consequente aumento da mobilidade eletroforética (STEINBRECHER *et al.*, 1984);
4. Maior densidade, aumento no conteúdo de lisolecitina, diminuição na quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, aumento do conteúdo de formas oxidadas de colesterol e fragmentação da apolipoproteína B100 (JÜRGENS *et al.*, 1987);
5. Atividade quimiotática para monócitos, induzindo as células endoteliais a produzir o fator Proteína Quimiotática de Monócitos 1 (MCP-1) (QUINN *et al.*, 1987; CUSHING *et al.*, 1990);
6. Citotoxicidade (quando excessivamente oxidada) (DIMMELER *et al.*, 1997);

7. Inibição da mobilidade dos monócitos, quando no espaço intimal (QUINN *et al.*, 1987; MURUGESAN, CHISOLM, FOX, 1993);
8. Indução de disfunção endotelial (KUGIYAMA *et al.*, 1990);
9. Imunogenicidade, deflagrando a formação de auto-anticorpos contra muitos neo-epítomos formados (PALINSKI *et al.*, 1989);
10. Indução da expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais (KUME, CYBULSKI, GIMBRONE Jr, 1992);
11. Ativação de células T, estimulando a secreção de interferon gama, e de células B, aumentando a secreção de anticorpos (HUANG, RÖNNELID, FROSTEGARD, 1995);
12. Fluorescência em padrões espectrais específicos (JÜRGENS *et al.*, 1987).

Dessa forma, o processo de oxidação da LDL centralizou-se como objeto de estudo mecanístico na fisiopatologia da aterosclerose, além de abrir novas perspectivas terapêuticas. Sabe-se que todas as células participantes do processo de aterosclerose (células endoteliais, musculares lisas e monócitos/ macrófagos) podem individualmente oxidar a LDL em cultura celular (ROSS, 1997; RIBEIRO JORGE, 1997; STEINBERG *et al.*, 1989; BERLINER *et al.*, 1995; STEINBRECHER *et al.*, 1984; JÜRGENS *et al.*, 1987), e, além disso, a LDL pode ser auto-oxidada em ambientes livres de células, desde que isolada do plasma, e em meio contendo saturação de oxigênio ou traços de metais de transição ( $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ). O processo químico de oxidação da LDL foi exaustivamente estudado com técnicas cromatográficas e fluorimétricas (STEINBRECHER *et al.*, 1984; JÜRGENS *et al.*, 1987; STEINBRECHER, 1987; ESTERBAUER *et al.*, 1987). Seja qual for o método de oxidação efetuado, o que parece ocorrer primariamente é a lipoperoxidação dos ácidos graxos mais insaturados dos fosfolípidos, particularmente o aracdônico (20:4) e o linoléico (18:2). Esse processo é promovido a partir do ataque de radicais livres de oxigênio, particularmente superóxido e peróxido, que são produtos do metabolismo usual das células presentes na íntima arterial. Como subprodutos dessa oxidação, surgem diversas cetonas e aldeídos muito reativos. Destes últimos, os mais estudados são o dialdeído

malônico (MDA) e o 4- hidroxí-nonenal (4-HNE). A apolipoproteína B100, uma estrutura helicoidal-tubular que envolve intimamente a superfície da LDL, possui mais de 360 resíduos de Lisina em sua constituição (PALINSKI *et al.*, 1990). Estes são derivatizados pelos adutos formados (MDA, 4-HNE), que se ligam aos seus grupos  $\epsilon$ -amino, positivamente carregados, neutralizando-os (STEINBRECHER, 1987). Essas alterações respondem por muitas das propriedades da LDL oxidada, tais como aumento da velocidade de migração eletroforética, perda do reconhecimento pelo receptor de LDL, reconhecimento pelo receptor macrofágico de LDL modificada, fluorescência de padrões específicos, imunogenicidade e citotoxicidade. Corroborando tal afirmação, verifica-se que a LDL protegida contra oxidação e modificada *in vitro* com MDA ou 4-HNE apresenta as mesmas características físico químicas e biológicas daquela oxidada (JÜRGENS *et al.*, 1987; FOGELMAN *et al.*, 1980).

O processo de lipoperoxidação da LDL parece depender também da atividade da enzima fosfolipase A<sub>2</sub>, que é encontrada nas membranas celulares, bem como na camada de fosfolípides da própria LDL (PARTHASARATHY *et al.*, 1985). Ao que tudo indica, haveria um sinergismo recíproco em que o ataque de radicais livres de oxigênio à LDL ativaria a fosfolipase A<sub>2</sub>, em parte por hidrolisar os ácidos graxos insaturados dos fosfolípides em fosfatidilcolina, que constitui-se em um substrato mais apropriado à ação da fosfolipase A<sub>2</sub> (gerando lisofosfatidilcolina); Por outro lado, a atividade da fosfolipase poderia liberar os ácidos graxos peroxidados, permitindo seu livre deslocamento dentro da estrutura da LDL, o que acentuaria a propagação da peroxidação por reação em cadeia. De fato, o uso *in vitro* de brometo de *p*-bromofenato, um inibidor específico da fosfolipase A<sub>2</sub>, bloqueia a oxidação mediada por células ou por Cu<sup>++</sup> da LDL (PARTHASARATHY *et al.*, 1985).

Com a continuidade do processo oxidativo, a apolipoproteína B100 fragmenta-se, aumenta o conteúdo de produtos de oxidação do colesterol no núcleo da LDL (oxisterois), e por fim ela termina decompondo-se completamente (JÜRGENS *et al.*, 1987).

Muitas são as evidências que suportam a ocorrência de oxidação da LDL *in vivo*:



1. A LDL delicadamente extraída de lesões ateroscleróticas de coelhos e humanos apresenta propriedades físico-químicas e biológicas semelhantes àquelas descritas para a LDL oxidada: a)maiores mobilidade eletroforética, densidade e conteúdo de lisofosfatidilcolina; b)captação e degradação por macrófagos, inibida competitivamente por LDL oxidada e conjugada a MDA, mas não por LDL nativa; c)reação, em Western blot, com anticorpos que reconhecem lisina com adutos de MDA ou 4-HNE; d)presença de fragmentos de apolipoproteína B100 e de lisofosfatidilcolina; e)atividade quimiotática para macrófagos (YLÄ-HERTTUALA *et al.*, 1989).

2. Lesões ateroscleróticas de vários graus de severidade, obtidas de coelhos Watanabe congenitamente hipercolesterolêmicos (WHHL), quando submetidas a estudo imunocitoquímico mostram reação com anticorpos dirigidos contra vários epítomos específicos de LDL modificada por oxidação, bem como com auto-anticorpos contra LDL oxidada obtidos de soro humano (ROSENFELD *et al.*, 1990; BOYD *et al.*, 1989).

3. Quando  $^{125}\text{I}$ -LDL humana é injetada em coelhos hiperlipidêmicos e recolhida 4 horas após, a mesma apresenta afinidade alterada por receptores de fibroblastos (diminuída) e macrófagos (aumentada), própria da LDL oxidada, e este achado não se verifica quando simultaneamente injeta-se HDL, que exerce conhecida ação anti-oxidante de LDL (KLIMOV, 1988).

4. Tanto em humanos como em animais de experimentação, verifica-se a ocorrência de auto-anticorpos contra epítomos de LDL oxidada.

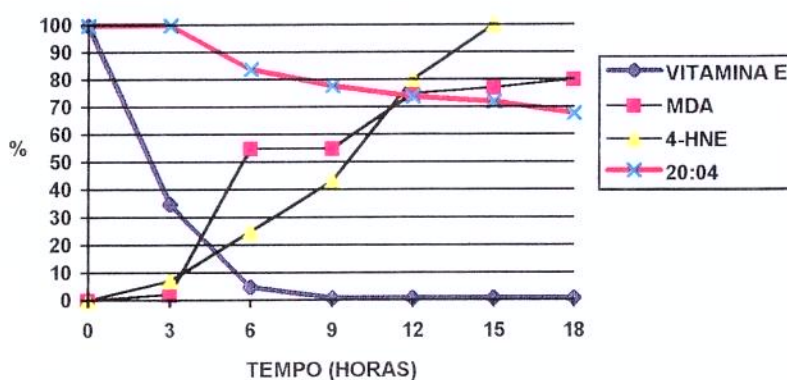
5. Presença de formas oxidadas de LDL em circulação no plasma de humanos, demonstrada por ELISA em *sandwich* de dupla camada (PALINSKI *et al.*, 1996).

Uma questão ainda polêmica diz respeito ao sítio onde ocorre o processo de oxidação da LDL. Sabe-se que o plasma oferece um ambiente rico em elementos protetores contra oxidação, e além disso, o sistema retículo endotelial rapidamente remove da circulação as formas oxidadas de LDL. Já o espaço subendotelial vascular pode oferecer um microambiente isolado dos antioxidantes plasmáticos, exposto a radicais livres de oxigênio, e onde a LDL pode ficar aprisionada, o que sugere ser este o sítio de oxidação

desta. A presença de LDL oxidada em circulação pode ser oriunda da passagem prévia desta pela parede arterial ou pelo fígado (PALINSKI, 1996). Supõe-se que num primeiro momento, dentro do processo de oxidação da LDL, ocorreriam apenas alterações discretas na estrutura da apolipoproteína B100, levando ao não reconhecimento da mesma pelos seus receptores específicos, mas ainda insuficientes para que ela seja reconhecida pelos receptores de LDL modificada dos macrófagos. Estas partículas teriam meia vida mais prolongada e poderiam novamente atravessar o endotélio, sendo então completamente oxidadas (STEINBERG, 1991).

A figura 1, adaptada de JÜRGENS *et al.*, (1987), representa a análise temporal do comportamento de vários elementos durante a oxidação *in vitro* da LDL, e oferece-nos a compreensão de um fenômeno que abriu novas possibilidades terapêuticas. Nela, pode-se observar que a degradação dos ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípides (aqui representados unicamente pelo ácido aracdônico - 20:4), bem como o surgimento dos aldeídos marcadores desse processo de lipoperoxidação (aqui representados pelo dialdeído malônico -MDA e pelo 4- hidroxi-nonenal - 4HNE), só se iniciam após o esgotamento da vitamina E carregada pela LDL.

FIGURA 1



Quando procede-se à oxidação *in vitro* da LDL, monitorando-se temporalmente o surgimento de marcadores de lipoperoxidação (por exemplo dienos conjugados), normalmente obtém-se uma curva em “S”, semelhante à demonstrada para o MDA ou 4-HNE na figura 1. A primeira fase, onde ainda não se verifica o surgimento de marcadores

da oxidação (e que corresponde ao tempo de consumo dos elementos anti-oxidantes), é denominada *lag fase*, ou fase de atraso; Em seguida, há um rápido desenvolvimento desses marcadores (fase de propagação), seguido pela estabilização, ou mesmo diminuição dos seus níveis (fase de decomposição). Prolongando-se graficamente a tangente da fase de propagação até o eixo do tempo, obtém-se nesse ponto o *lag time*, ou tempo de atraso antes do início da oxidação, e este é um indicador da oxidabilidade da LDL. Tem-se demonstrado que pacientes jovens portadores de coronariopatia aterosclerótica obstrutiva apresentam correlação inversa entre o grau da obstrução e o tempo de atraso (ou seja, correlação direta com a oxidabilidade da LDL) (REGNSTRÖN *et al.*, 1992), e que a oxidabilidade relaciona-se diretamente com o nível sérico de colesterol, e, principalmente, com o conteúdo de triglicérides das partículas de colesterol. Também foi documentada maior oxidabilidade da LDL em pacientes diabéticos tipo 2 em relação a controles não diabéticos (BABİY *et al.*, 1992).

As vitaminas lipossolúveis A e E apresentam atividade antioxidante e são carregadas no núcleo lipídico da LDL, bem como da HDL. A vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel, mas que pode estar envolvido na regeneração da vitamina E oxidada (radicais tocoferil) de volta à forma ativa (THOMAS, NEUZIL, STOCKER, 1996). Diante disso, alguns autores tem avaliado o efeito da suplementação desses elementos na oxidabilidade da LDL. MACKNESS *et al.*, (1993) verificaram o efeito da suplementação oral, em humanos saudáveis, por 20 dias, de selênio (200mg),  $\beta$ -caroteno (18 mg), vitamina C ( 180 mg) e vitamina E (74 mg). Observou-se aumento significativo no tempo de atraso para oxidação, principalmente no subgrupo de indivíduos que previamente apresentava tempo de atraso muito curto, ou ausente (oxidadores rápidos). Não houve, nesse estudo, variação no montante final de lipoperóxidos, mas uma crítica a ele pertinente consiste no uso de doses muito baixas, principalmente de vitamina E. Em um estudo semelhante (ABBEY, NESTEL, BAGHURST, 1993 ), usando-se 18 mg de  $\beta$ -caroteno, 900 mg de vitamina C e 200 mg de vitamina E em 22 sujeitos normais, pareados com controles sem suplementação, demonstrou-se alargamento significativo no tempo de atraso após 3 meses de suplementação, que aumentou ainda mais aos 6 meses, e houve uma correlação significativa e independente entre a porcentagem de aumento nos níveis séricos de vitamina E a porcentagem de alargamento no tempo de atraso para oxidação. O estudo mais

elucidativo, nesta mesma linha (JIALAL & GRUNDY, 1993) testou a suplementação oral combinada de vitamina C (1,0 g/dia) +  $\beta$ -caroteno (30 mg/dia) + vitamina E (800mg/dia) comparada com a suplementação oral apenas de vitamina E 800 mg/dia, com um grupo controle usando placebo. Após 3 meses houve aumento significativo no tempo de atraso e diminuição significativa na formação de lipoperóxidos nos grupos tratados, e, mais importante, essas diferenças foram iguais para o grupo de suplementação combinada em relação àquele suplementado apenas com vitamina E. Dessa forma, conclui-se que a suplementação dietética de vitaminas anti oxidantes lipossolúveis pode diminuir a oxidabilidade *in vitro* da LDL, e a suplementação combinada não oferece vantagem adicional em relação à suplementação exclusiva de vitamina E.

Vitamina E é a designação formal conferida a um grupo de pelo menos 8 compostos, tocoferóis e tocotrienóis dietéticos, com características funcionais semelhantes, dos quais o mais potente é o D- $\alpha$ -tocoferol. A mais importante ação fisiológica desta classe de compostos é seu papel como antioxidante, protegendo os ácidos graxos poliinsaturados das membranas e outras estruturas celulares contra o ataque de radicais livres de oxigênio. As necessidades diárias mínimas de vitamina E, expressas em miligramas de  $\alpha$ -tocoferol, são de 10 mg (ou 15 UI) para um homem adulto, e a suplementação de doses até 800 mg/dia é considerada segura, podendo haver apenas efeitos colaterais discretos, como náuseas, flatulência e diarreia. Os produtos alimentícios mais ricos em vitamina E são também ricos em ácidos graxos poliinsaturados: óleos de soja, milho, algodão, girassol e germe de trigo. Grande parte da sua atividade é perdida na estocagem e no cozimento (RIVLIN, 1992). A estabilidade do  $\alpha$ -tocoferol pode ser aumentada usando-se a forma acetato de  $\alpha$ -tocoferol.

Uma vez documentada a eficácia do  $\alpha$ -tocoferol, isoladamente utilizado, em diminuir a oxidabilidade *in vitro* da LDL, e dada sua segurança e potencial de utilização clínica, o próximo passo consistia em verificar sua ação em bloquear a oxidação *in vivo* da LDL, e o consequente curso da doença aterosclerótica. WILLIAMS *et al.*, (1992) documentaram diminuição da deposição de colesterol, bem como da extensão macroscópica de lesões ateroscleróticas em aortas de coelhos WHHL modificados suplementados com vitamina E em relação aos controles. Porém, houve no grupo suplementado uma inesperada redução dos níveis séricos de colesterol, interferindo assim

na análise dos resultados. Já PRASAD & KALRA, (1993), utilizando coelhos Nova Zelândia submetidos a dieta controle (grupo I), dieta suplementada em vitamina E (grupo II), dieta hipercolesterolemiantes + vitamina E (grupo III) ou dieta hipercolesterolemiantes (grupo IV), ao final de 4 meses observaram significativa redução da extensão das lesões ateroscleróticas macro e microscópicas, bem como da deposição de células polimorfonucleares e MDA nas aortas dos animais do grupo III em relação aos do grupo IV, enquanto os níveis séricos de colesterol, triglicérides e MDA aórtico foram maiores no grupo III em relação ao grupo IV; Desta forma, este foi o primeiro trabalho experimental a relacionar o efeito protetor da vitamina E contra a formação de lesões ateroscleróticas com seu efeito antioxidante. Recentemente, MUNDAY *et al.*, (1998) também demonstraram efeito protetor contra aterosclerose em camundongos hipercolesterolêmicos C57BL/6, mas não conseguiram atribuir este efeito à atividade antioxidante, por ter havido redução nos níveis séricos de lipoproteínas nos animais suplementados. FRUEBIS, CAREW & PALINSKI (1995) não conseguiram evidenciar redução significativa da extensão das lesões aórticas ateroscleróticas em coelhos WHHL suplementados com VE, porém, houve uma tendência nessa direção, que poderia tornar-se relevante se a amostra fosse maior (apenas 10 animais em cada grupo). STEWART-LEE *et al.*, (1994) demonstraram reversão da disfunção endotelial em carótidas de coelhos hipercolesterolêmicos quando estes recebiam vitamina E, e RIBEIRO JORGE *et al.*, (1996) obtiveram resultados semelhantes na reversão da disfunção endotelial em coronárias de cães hipercolesterolêmicos pela suplementação de vitamina E, sem que houvesse com isso redução dos níveis de lipoproteínas plasmáticas. Já GILLIGAN *et al.*, (1994) não conseguiram demonstrar reversão da disfunção endotelial em humanos hipercolesterolêmicos após um mês de administração diária de um suplemento de vitaminas antioxidantes, contendo 800 UI de vitamina E. Estudos humanos retrospectivos correlacionando dosagem sérica de vitamina E com eventos coronários mostram resultados conflitantes, principalmente atribuíveis a diferentes modelos de estudos deste tipo. Assim, em um estudo epidemiológico transcultural (GEY *et al.*, 1991), foram dosados os níveis plasmáticos de vitamina E de homens de meia idade representativos de 16 diferentes populações européias onde havia uma variação de até seis vezes na mortalidade por doença isquêmica coronária, e observou-se que os níveis séricos de vitamina E padronizados por lipoproteínas mostraram significativa

correlação inversa com a mortalidade por doença coronária, sendo preditores mais potentes que os fatores de risco clássicos. Dois outros estudos entretanto (KARDINAAL *et al.*, 1993; HENSE *et al.*, 1993) falharam em constatar relação entre incidência de infarto do miocárdio e níveis de vitamina E no tecido adiposo ou no plasma, em indivíduos não suplementados. No mesmo ano foram publicados dois outros estudos epidemiológicos humanos, prospectivos, avaliando a ocorrência de eventos coronários em relação à ingesta habitual de vitamina E, fosse dietética (maioria) ou oriunda de suplementação. STAMPFER *et al.*, desenvolveram este estudo num grupo de 87.245 enfermeiras de 34-59 anos, seguidas por 8 anos, e RIMM *et al.*, seguiram 39.910 profissionais de saúde do sexo masculino, de 40-75 anos por 4 anos. Ambos observaram resultados semelhantes, constatando associação entre ingesta elevada (apenas obtida com suplementação farmacológica) de vitamina E e menor risco de doença coronária. O risco diminuía significativamente com suplementação de mais que 100 UI de vitamina E por dia, por mais que dois anos. Esse dado pode nortear uma crítica ao trabalho de TÖRNWALL *et al.*, (1997), que, analisando um estudo prospectivo duplo cego (ATBC cancer prevention study), onde 26.289 homens tabagistas de 50-69 anos foram aleatorizadamente designados para uso diário de cápsulas de placebo ou  $\alpha$ -tocoferol (50 mg) +  $\beta$ -caroteno (20 mg), não observaram redução na incidência de claudicação intermitente após 4 anos. Possivelmente a dose utilizada (75 UI) foi inadequada para avaliação deste tipo de resultado. O estudo CHAOS (STEPHENS *et al.*, 1996) foi o mais conclusivo desta série. Nele, 2002 pacientes com documentação angiográfica de aterosclerose coronária foram prospectivamente designados para uso de vitamina E (400 ou 800 UI/dia) ou placebo, com grupos aleatorizados e protocolo do tipo duplo-cego. Após 1 ano de seguimento já foi possível documentar diminuição significativa de infartos não fatais no grupo tratado. A morte cardiovascular não foi significativamente afetada, mas podemos supor que a amostra populacional e o tempo de seguimento não foram suficientemente extensos para este tipo de análise.

Conforme referido anteriormente, o processo de modificação oxidativa das partículas de LDL leva à formação de inúmeros neo-epítopos antigênicos na apolipoproteína B100, dentre os quais a Lisina-MDA. Desta forma, a ocorrência *in vivo* deste processo determina a produção de auto-anticorpos dirigidos contra estes neo-epítopos. Embora esta resposta imune seja observada em modelos animais, tanto quanto em

humanos, seu preciso papel fisiopatológico permanece obscuro. O soro de pacientes portadores de doença coronária aterosclerótica, quando incubado com lipoproteínas, aumenta a captação *in vitro* destas por macrófagos, supostamente por conter auto-anticorpos e dessa forma contribuir para sua captação pela via do receptor Fc (KLIMOV *et al.*, 1988). Esse dado foi melhor estudado por OREKHOV *et al.*, (1991), que pôde documentar que o fator não lipídico presente no soro destes pacientes, responsável pelo aumento na captação de LDL pelos macrófagos de cultura consiste em anticorpos dirigidos contra LDL modificada. KHOO *et al.*, (1992) demonstraram aumento da captação de agregados de partículas de LDL quando estas eram ligadas a um anticorpo monoclonal específico para o domínio da apolipoproteína B100 que é reconhecido pelo receptor de LDL nativa, e que esse aumento de captação era especificamente mediado pelo receptor Fc, já que esse efeito era abolido quando usavam-se fragmentos Fab ou F(ab')<sub>2</sub> deste mesmo anticorpo. Com base nestes dados, os autores sugeriram um possível papel de agravamento do processo de aterosclerose que seria desempenhado por estes anticorpos. Contrapondo-se a estes estudos, há evidências de dois grupos que conseguiram diminuir significativamente a extensão da área aórtica comprometida por aterosclerose em coelhos hipercolesterolêmicos pela sua imunização com LDL oxidada (AMELI *et al.*, 1996) ou LDL modificada por MDA (PALINSKI, MILLER & WITZTUM, 1995). Ao contrário dos primeiros, estes autores sugerem um papel protetor desempenhado pelos auto-anticorpos formados contra LDL oxidada. O principal mecanismo teórico para explicar este efeito seria o aumento da remoção das partículas de LDL oxidadas da circulação, feito pelos receptores Fc presentes nos macrófagos do sistema retículo-endotelial. Esta idéia é sustentável, apesar de sabermos que o processo de oxidação da LDL deve dar-se predominante no espaço intimal e não no plasma, pois sabemos da presença em circulação de partículas minimamente oxidadas de LDL, incapazes de serem reconhecidas quer pelo receptor de LDL nativa do hepatócito, quer pelo receptor de LDL modificada dos macrófagos do sistema retículo-endotelial (PALINSKI *et al.*, 1996). Entretanto, embora os títulos de anticorpos anti-LDL oxidada correlacionem-se diretamente com a extensão das lesões aórticas em vários estudos, os mesmos não puderam ser correlacionados à porcentagem de redução da extensão da aterosclerose nos animais submetidos à imunização. MIRONOVA, VIRELLA & LOPES-VIRELLA (1996), estudando anticorpos

anti-LDL oxidada em 2 indivíduos saudáveis sem fatores de risco cardiovascular e 6 pessoas com aterosclerose clinicamente comprovada, documentaram que os anticorpos isolados (por cromatografia de afinidade) constituíam-se predominantemente de IgG de subclasses 1 e 3, de baixa a moderada afinidade, e com variável reatividade cruzada (contra MDA-LDL, LDL nativa e cardiolipina). Se o papel fisiopatológico destes auto-anticorpos permanece ainda bastante polêmico, o seu papel como marcadores do processo de oxidação *in vivo* da LDL, e, conseqüentemente, como marcadores de risco para complicações da aterosclerose, encontra respaldo em vários trabalhos. PALINSKI *et al.*, (1995), usando um método de radioimunoensaio para estudar a modulação de auto-anticorpos anti-MDA-LDL em camundongos deficientes em receptores de LDL submetidos a diferentes dietas, documentou correlação linear significativa entre os títulos desses auto-anticorpos e os níveis séricos de colesterol total, bem como com a extensão das lesões ateroscleróticas aórticas. Em um estudo humano retrospectivo, BERGMARK *et al.*, (1995), usando uma técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), documentou níveis de auto-anticorpos contra LDL oxidada significativamente maiores em pacientes comprovadamente portadores de insuficiência arterial periférica em relação a controles pareados. BELLOMO *et al.*, (1995), também usando técnicas de ELISA, avaliou os títulos de anticorpos contra vários antígenos (MDA-LDL, LDL oxidada, LDL glicosilada e LDL glico-oxidada), sempre na forma de uma relação com LDL nativa, em indivíduos portadores de diabetes tipo 2 e controles pareados. Todas as relações de anticorpos testadas foram significativamente maiores nos pacientes diabéticos, e o fato de haver correlação linear entre os títulos de anti-LDL oxidada e anti-LDL glicosilada e glico-oxidada levou os autores a sugerirem que a glicosilação não enzimática das LDL seria um fator predisponente à oxidação das mesmas. Outro interessante estudo desenvolvido no mesmo centro de pesquisa (MAGGI *et al.*, 1994) havia investigado retrospectivamente 94 pacientes portadores de aterosclerose carotídea em relação a controles pareados, no que diz respeito a 3 possíveis marcadores: a) oxidabilidade da LDL; b) concentração de vitamina E na LDL; c) auto-anticorpos anti LDL oxidada. As únicas diferenças significativas encontradas foram níveis maiores de auto-anticorpos nos pacientes em relação aos controles e menor eficiência da vitamina E nas partículas de LDL dos pacientes. Este último parâmetro correlaciona os níveis de vitamina E nas partículas de LDL com o tempo de atraso da curva de



oxidabilidade das mesmas, fornecendo assim uma informação sobre a tendência à oxidação da LDL, independente do seu teor de vitamina E. SALONEN *et al.*, (1992), usando uma técnica de radioimunoensaio, documentou títulos de anticorpos anti-LDL-MDA (definidos como relação entre estes e os anticorpos contra LDL nativa) maiores em homens com progressão acelerada de aterosclerose carotídea (avaliada ultrassonograficamente por dois anos) em relação a controles pareados, onde esta progressão não se deu. Finalmente, PUURUNEN *et al.*, (1994), usando técnica de ELISA, demonstraram que os níveis séricos de auto-anticorpos contra LDL oxidada são preditores independentes para o desenvolvimento de infarto do miocárdio, num seguimento de 5 anos. Após ajuste para os fatores de risco clássicos, houve um aumento de 2,5 vezes no risco de desenvolvimento de um evento coronário para os indivíduos no maior tercil do nível de auto-anticorpos, em relação àqueles do tercil inferior (intervalo de confiança 95%, 1,3 a 4,9;  $p=0,005$ ).

Há muitas técnicas descritas para a dosagem de autoanticorpos contra LDL modificadas, nenhuma das quais isenta de críticas ou limitações. Ainda assim, conforme revisado neste texto, elas possibilitaram uma série de estudos sobre o papel de marcador prognóstico desempenhado por estes auto-anticorpos. Entretanto, muito ainda resta a fazer para o aperfeiçoamento metodológico destas técnicas, bem como na aplicação das mesmas em diferentes modelos humanos e experimentais.

## ***2. ARTIGO***

**EFFECT OF VITAMIN E SUPPLEMENTATION ON ANTIBODY LEVELS  
AGAINST MALONDIALDEHYDE MODIFIED LDL IN HYPERLIPIDEMIC  
HAMSTERS**

Oliveira FG<sup>a</sup>, Rossi CL<sup>b</sup>, Oliveira MG<sup>c\*</sup>, Saad MJA<sup>a</sup>, Velloso La<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Internal Medicine

<sup>b</sup>Department of Clinical Chemistry

<sup>c</sup>Chemistry Institute

State University of Campinas - UNICAMP Campinas, S.P. - Brazil

\*Corresponding author: Dr. Marcelo G. de Oliveira, Instituto de Química - UNICAMP;  
C.P.: 6154, CEP 13083-970, Campinas, S.P., BRASIL  
e-mail: mgo@iqm.unicamp.br ; FAX: +55 19 7883023

## ABSTRACT

Oxidation of low-density lipoproteins plays an important role in atherogenesis, and the supplementation of vitamin E may protect low-density lipoprotein particles against oxidation. Oxidized low-density lipoprotein particles are immunogenic and lead to specific antibody formation. Using an modified ELISA technique we have analyzed the modulation of autoantibody titers against an epitope of oxidized low-density lipoprotein in hamsters that were fed standard rodent chow, plus 2% cholesterol and 10% butter, with and without 0,2% DL  $\alpha$  tocopherol. The groups that were fed a cholesterol-fat enriched diet presented a three fold increase in total serum cholesterol ( $p<0,01$ ) and two fold increase in serum triglycerides ( $p<0,01$ ) as compared to control. Vitamin E supplementation played no role in serum cholesterol and serum triglyceride concentration. However, DL  $\alpha$  tocopherol supplementation led to a decreased autoantibody (anti low-density lipoprotein - malondialdehyde) formation ( $p<0,05$ ). Such results indicate that vitamin E supplementation may play a protective role in the autoimmune process that accompanies atherogenesis.

*keywords:* LDL oxidation; Atherosclerosis; Cardiovascular Diseases, Autoantibodies; Vitamin E

## 1. INTRODUCTION

Several evidences suggest that low-density lipoprotein (LDL) particles undergo oxidative modifications *in vivo* (1-5), leading to an increased atherogenicity by several mechanisms, such as enhanced uptake by macrophages (4) chemotactic activity for circulating monocytes (6), inhibition of macrophage motility (7), cytotoxicity for endothelial cells (8,9), and induction of endothelial dysfunction (10). During oxidative modification of LDL, highly reactive lipid peroxidation products, such as malondialdehyde (MDA) form adducts with free amino groups of lysines of apolipoprotein B (apo B). Modified apo B is highly immunogenic, and circulating autoantibodies to epitopes of oxidized LDL, such as MDA-lysine, have been demonstrated in plasma and in atherosclerotic lesions of humans and animals (1,5). The titer of these autoantibodies may reflect the extent of the LDL oxidation *in vivo*, serving as a marker of the process. The development of autoantibody titers correlates with the extent of atherogenesis in cholesterol-fed receptor-deficient mice (11). A number of studies have suggested that higher titers of these autoantibodies are found in patients with increased progression of carotid atherosclerosis (12), peripheral vascular disease (13) and diabetes (14), and may be used to predict myocardial infarction (15). Vitamin E (VE), particularly  $\alpha$ -tocopherol, is a first line natural defense against LDL oxidation (16), and VE supplementation has been demonstrated to decrease aortic lesions and aortic levels of malondialdehyde in hyperlipidemic rabbits (17), as well as to decrease LDL oxidability in humans (18). More recently, Stephens et al.(19), in an prospective double-blind, placebo-controlled study with stratified randomization of 2002 patients with angiographically proven coronary atherosclerosis, have shown that VE supplementation may significantly reduce the risk of myocardial infarction.

In the present work, we analyzed the effect of VE supplementation on the modulation of anti-MDA-LDL autoantibody formation in an animal model of hyperlipidemia. The hypothesis predicted that VE supplementation would partially protect LDL particles from *in vivo* oxidation, mitigating the increase in the serum levels of anti-MDA-LDL.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. *Experimental animals*

Thirty three male hamsters (*Mesocricetus auratus*), four weeks-old, were divided in 3 groups: Group A (n=13) was fed with a standard rodent chow (Nuvilab CR1 - Nuvital, Curitiba, S.P., Br) plus 2% cholesterol and 10% butter; Group B (n=12) was fed with the same diet as group A plus 0.2% (w/w) VE in the form of DL  $\alpha$ -tocopherol acetate (Ephynal® - Roche, Jacarepagua, R.J., Br) ; Group C (n=8) was fed with standard rodent chow. The antibody levels were determined in each animal at 4 weeks of age (while on standard rodent chow) and after 20 weeks of experimental diet. In both occasions, blood samples were collected by intracardiac puncture, and serum was stored at -80°C. The 3 groups of animals were housed under conditions of 12-hour light/dark periods. Food and water were provided *ad libitum* and individual ponderal curve was registered along the study.

2.2. *Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against oxidized-LDL.* Because malondialdehyde (MDA)-modified LDL has been reported to represent a prominent epitope of oxidized-LDL (ox-LDL) (20), MDA-modified LDL (MDA-LDL) was used as an antigen for detecting autoantibodies generated against ox-LDL. The MDA-LDL was prepared as described by Palinski et al (21), with minor modifications. Fresh MDA was generated from malonaldehyde bis (dimethyl acetal) (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, USA), by acid hydrolysis. Lyophilized human LDL (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was incubated with freshly prepared MDA (100 $\mu$ L/ mg of LDL) at 37°C for 3 hours. The MDA-LDL was then extensively dialyzed against phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 1 mmol/L EDTA. Protein was measured in the dialyzed preparation by the biuret method (Biorad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). The MDA-LDL was then dissolved in the coating buffer (carbonate/bicarbonate 50 mmol/L, pH 9.7) to a final protein concentration of 0.05  $\mu$ g/mL, and 100  $\mu$ L of this solution was added to each well of ELISA polystyrene plates (Corning Incorporated, Corning, NY, USA). The plates were incubated 90 minutes at 37°C and then overnight at 4°C. After washing two times with PBS pH 7.4 containing 0.05% polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween 20 - Sigma), the plates

were blocked with PBS, pH 7.4, containing 0.1% Tween 20 and 2% bovine soroalbumin (BSA) Fraction V (Calbiochem - Novabiochem Corporation, La Jolla, CA, USA) at 37°C for 3 hours. After removing the blocking solution, the plates were stored at -20°C until use. To perform the ELISA, the plates were defrosted, washed 4 times, and serum samples were added (100 µL/well, diluted 1:11 in PBS/Tween 20 at 0.1%/ BSA 0.05%) and incubated at 37°C for 4 hours. After washing 3 times, the plates were incubated with monoclonal antibody anti-hamster IgG and IgM (Sigma) diluted 1:500 in PBS/Tween 0.1%/BSA 0.05%, at 37°C for 90 minutes. The plates were then washed 3 times, and peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (whole molecule) antibody (Sigma), diluted 1:500 in PBS/Tween 0.1%/BSA 0.05% was added, and the mixture was incubated for 90 minutes at 37°C. After washing 4 times, the plates were developed using the substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride (TMB-Sigma) diluted in acetate/acetic acid buffer, 0.1 mol/L, pH 6.1 plus hydrogen peroxide 0,01% (100 µL/well), incubated for 30 minutes at 37°C in the dark, followed by the addition of sulfuric acid 1 mol/L, 100µL/well. The absorbance was read at 450 nm in an automatic ELISA microplate reader (Multiskan MS Type 352, Labsystems, Finland). Each sample was tested in triplicate, and the results were expressed as mean optical density values subtracted from the mean blank value (arbitrary units). The intra-assay coefficient of variation was < 4%.

### *2.3. Determination of serum $\alpha$ -tocopherol*

The lipidic fraction was extracted from the samples according to Stewart-Lee et al (21). A high performance liquid chromatography method was developed using a Waters 600-E liquid cromatographer with a model 484 variable wavelenght UV-Vis detector and a 4400 integrator (Waters, chromatograph division, Milford, MA, USA), equipped with a reversal-phase column  $\mu$ -Bondapack C<sub>18</sub> (3.9 x 150 mm) (Waters), and acetonitril as mobile phase. Detection was performed spectrophotometricaly with absorption measure at 286 nm. Results were plotted on a calibration curve obtained with  $\alpha$ -tocopherol acetate standards in the range of 2 to 75 µg/mL.

#### *2.4. Other analytical procedures.*

Quality control of the antigen prepared for the ELISA tests (MDA-modified LDL) was performed by spectrofluorimetric analysis in a AMINCO SPF-500C spectrofluorimeter (SLM Instruments Inc., Urbana, IL, USA) with excitation 400 nm / emission 465 nm (16).

Serum total cholesterol and triacylglycerols were determined enzymatically (Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, MG, Br) with an autoanalyzer (Microlab 200 - Merck, Dieren, The Netherlands).

#### *2.5. Statistical analysis*

All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was evaluated using the Student's *t* test for comparisons between two means, after testing of the data for appropriateness of use of this parametric test. A value of  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant. The statistical analyses were carried out by using the SPSS 7.5 for windows statistical software



### 3. RESULTS

The main results are summarized in Table I. Although there were no statistical differences in body weight between the three groups at the beginning, it was observed that animals from group A had a significant lower weight gain ( $p=0.03$ ). Total serum cholesterol at the end of the experimental period was significantly greater in group A ( $p=0.003$ ) and B ( $p=0.00002$ ) than group C; serum triglycerides was significantly greater in group A ( $p=0.00002$ ) and B ( $p=0.003$ ) than group C. There were no significant differences in serum lipids between groups A and B. Serum lipids are showed in figure 1. Serum levels of VE (Figure 2) were greater in group B as compared to group A ( $p=0.0001$ ) and C ( $p=0.002$ ), with no difference between A and C. Figure 3 shows the lipid-standardized serum VE levels (serum VE level divided by total serum lipids), which provide an estimate of the VE content of lipoproteins. Group B was greater than groups A ( $p=0.00006$ ) and C ( $p=0.03$ ), and group C was greater than group A ( $p=0.009$ ). No significant differences in serum anti-LDL-MDA antibody levels were observed between the three groups at the beginning of the experimental period (table I). However, at the end of the experiments the levels were greater in group A and B ( $p=0.0005$ ) than C, but there was no significant difference between groups A and B (table I). All groups increased significantly the levels of autoantibodies, and the absolute difference in those levels from the beginning to the end of the experimental period was statistically different between groups A and B ( $p < 0.05$ ), A and C ( $p = 0.006$ ), but not between B and C (Figure 4). In the groups not supplemented with VE (A and C), there was a significant correlation between the final level of anti-LDL-MDA antibodies and total serum cholesterol ( $p=0.01$ ,  $r=0.54$ ), serum triglycerides ( $p=0.015$ ,  $r=0.52$ ) and total lipids ( $p=0.004$ ,  $r=0.6$ ) (Figure 5). Finally, the analysis of all groups together showed a significant inverse correlation between the absolute variation in the antibody levels (final - baseline titles of anti LDL-MDA antibody) and lipid-standardized log of VE (log VE divided by total lipids), with  $p=0.007$  and  $r= -0.46$  (Figure 6).

#### 4. DISCUSSION

In the animal model herein presented, a cholesterol-fat enriched diet led to a substantial increase in serum lipids, and to an increase in autoantibody formation against MDA-Lysine. These data, obtained from hamsters, is in agreement with previous reports by Palinski et al (11), working with rabbits. Recently, Hulthe, J. et al. (23) reported data showing no significant differences in antibody titers against ox-LDL or MDA-LDL between a group of patients with familial hypercholesterolemia and a control group. However, a confounding bias in this work was the fact of all but 3 hypercholesterolemic patients underwent cholesterol-lowering therapy during follow-up, 65% of them with pravastatin, which have recognized antioxidant properties, attenuating oxidative susceptibility of LDL in hypercholesterolemic patients (24).

The addition of VE to a cholesterol-fat enriched diet did not modify the increase in serum levels of cholesterol and triglycerides. However, VE down modulated the formation of specific anti-MDA-LDL antibodies. It can be considered that the greater the serum levels of lipoproteins, the more intense will be the oxidative modifications of LDL particles. It is known that LDL particles cross the endothelium to the intimal space in direct proportion of their serum concentration, and is most likely that oxidative modifications of LDL occur primarily in the intima microdomains protected from the various antioxidants found in plasma (10). In the hamster model, despite the serum levels of VE were very similar between groups A and C, the lipid standardized serum levels of VE were significant lower in group A than in group C. Thus, the greater is the serum level of lipoprotein, the lower will be the proportional content of VE per particle of LDL, and consequently the lower will be its antioxidative activity upon specific substrates.

The humoral immune response (as measured by the titer of plasma autoantibodies) is regulated by a diversity of mechanisms, and does not reflect only antigen burden. The relation between serum total lipids and serum anti MDA-LDL levels observed in the present work provides an indirect evidence of *in vivo* oxidation of LDL.

More important is the evidence suggesting a protective effect of VE supplementation on reduction of oxidative modification of LDL in hyperlipidemic

conditions. Thus, the VE supplemented animals increased significantly less its autoantibodies levels, and there was an inverse logarithmic correlation between lipid-standardized VE and autoantibody anti-LDL-MDA formation.

Besides its action as an inhibitor of LDL oxidation, VE may modulate the immune response. In a recent randomized controlled trial, VE supplementation enhanced cell-mediated and antibody response following hepatitis B, tetanus and diphtheria vaccination in healthy elderly subjects (25). Thus, the results observed in the present study may represent a combination of the effects of VE upon antigen formation and immune system activation, resulting in an apparent milder autoimmune response.

Regarding the role of autoantibodies in the atherogenic process, it remains elusive. Some authors (26,27) have described accentuation of *in vitro* formation of foam cells when antibodies against modified LDL or apolipoprotein B100 were added to modified LDL or LDL aggregates, suggesting an atherogenic role to these autoantibodies. On the other hand, more important evidence came from two studies using immunization of animal models of hyperlipidemia with oxidized or MDA modified LDL, that showed a significant reduction in the extent of atherosclerotic lesions in aorta, and suggested a protective effect of these autoantibodies against the atherosclerotic process (28,29). Apart from the role of the autoantibodies in the physiopathologic process, their measurement may also be useful as an indicator of the extent of LDL oxidation *in vivo*, or even of the atherogenic process itself. The modified ELISA technique described in the present study is faster and more straightforward than the usual ELISA technique described for this purpose, due to short incubation times at 37 °C and the possibility of preparing several ELISA plates simultaneously, which can be kept frozen until use. With slight variations, most published assays of antibodies against different types of modified LDL are based on determining the difference or the ratio between the binding of a given sample to modified LDL and to native LDL. However, as discussed by Virella G., Mironova, M. and Lopes-Virella, M. (30), this approach ignores the fact that the modification of LDL adds negative charges to the LDL molecule, increasing its potential for charge-dependent non-covalent interactions with IgG. This fact becomes relevant when considering that the antioxidantized LDL autoantibodies isolated from human subjects appear to be predominantly of moderate-to-

low affinity, and of variable cross-reactivity (31). Moreover, Hulthe et al. (23) has demonstrated that ELISA plates coated with “native” LDL probably exposes epitopes common with modified LDL, suggesting that during coating process, despite the presence of antioxidants, LDL is in some extent modified. For this reason, in our experiment, we performed an ELISA technique using the absolute quantification of the antibody titers, without other reference value but the mean blank value of each ELISA plate. In the present study, all the ELISA analysis were performed simultaneously, eliminating the need for a reference standard. However, to get acceptable reproducibility on this technique in order to use it for clinical or experimental purposes, it will become necessary to use an standard purified anti-LDL-MDA antibody in progressive dilutions in each ELISA plates.

Atherosclerosis is a complex, multifactorial disease. Environmental factors and genetic background play determinant roles in blood lipoprotein levels, vascular wall lesion and clinical manifestations. As in other multifactorial diseases, such as diabetes and hypertension, the dissection and characterization of every element possibly involved in the pathogenesis will sum for the complete understanding of the disease.

## REFERENCES

- [1] Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 1989; 84: 1086-1095.
- [2] Rosenfeld ME, Palinski W, Ylä-Herttuala S, Butler S, Witztum JL. Distribution of oxidation specific lipid-protein adducts and apolipoprotein B in atherosclerotic lesions of varying severity from WHHL rabbits. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 336-49.
- [3] Boyd HC, Gown AM, Wolfbauer G, Chait A. Direct evidence for a protein recognized by a monoclonal antibody against oxidatively modified LDL in atherosclerotic lesions from a watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Am J Pathol* 1989; 135: 815-25.
- [4] Klimov A. In vivo formation of modified lipoproteins with increase affinity for macrophages. *Atherosclerosis Reviews* 1988; 17: 75-86.
- [5] Palinski W, Hörkkö S, Miller E, Steimbacher UP, Powell HC, Curtiss LK, Witztum JL. Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest* 1996; 98: 800-814.
- [6] Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84: 2995-8.
- [7] Quinn MT, Parthasarathy S, Steinberg D. Endothelial cell-derived chemotactic activity for mouse peritoneal macrophages and the effects of modified forms of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 5949-53.
- [8] Morel DW, Dicorleto PE, Chisolm GM. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 1984; 4: 356-64.

- [9] Hessler JR, Robertson AL Jr., Chisolm GM. LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. *Atherosclerosis* 1979; 32: 213-29.
- [10] Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J.Clin.Invest.* 1991; 88:1785-1792.
- [11] Palinski W, Tangirala RK, Miller E, Young SG, Witztum, JL. Increased autoantibody titers against epitopes of oxidized LDL in receptor-deficient mice with increased atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1569-1576.
- [12] Salonen JT, Ylä-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, Nyyssönen K, Palinski W, Witztum JL. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 1992; 339: 883-887.
- [13] Bergmark C, Wu R, Faire U, Swedenborg J. Patients with early-onset peripheral vascular disease have increased levels of autoantibodies against oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 441-445.
- [14] Bellomo G, Maggi E, Poli M, Agosta FG, Bollati P, Finardi G. Autoantibodies against oxidatively modified low-density lipoproteins in NIDDM. *Diabetes* 1995; 44: 60-66.
- [15] Puurunen M, Mänttari M, Manninen V, Tenkanen L, Alfthan G, Ehnholm C, Vaarala O, Aho K, Palosuo T. Antibody against oxidized low-density lipoprotein predicting myocardial infarction. *Arch Intern Med* 1994;154: 2605-2609.
- [16] Jürgens G, Hoff HF, Chisolm GM, Esterbauer H. Modification of human serum LDL by oxidation- characterization and pathophysiological implications. *Chem Phys Lipids* 1987; 45: 315-336.
- [17] Prasad K, Kalra J. Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: Effect of vitamin E. *Am Heart J* 1993; 125: 958-973.
- [18] Jialal I, Grundy SM. Effect of combined supplementation with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbate and beta carotene on low-density lipoprotein oxidation. *Circulation* 1993; 88: 2780-2786.

- [19] Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ, Brown MJ. Randomized controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996;347: 781-786.
- [20] Holvoet P, Perez G, Zhao Z., Brouwers E, Bernar H, Collen D. Malondialdehyde-modified low density lipoproteins in patients with atherosclerotic disease. *J Clin Invest* 1995; 95: 2611-2619.
- [21] Palinski W, Ylä-herttuala S, Rosenfeld ME, Butler SW, Socher SA, Parthasarathy S, Curtiss LK, Witztum JL. Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during oxidative modification of low density lipoprotein. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 325-335.
- [22] Stewart-Lee AL, Forster LA, Nourooz-Zadeh J, Ferns GAA, Angaard EE. Vitamin E protects against impairment of endothelium-mediated relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 494-499.
- [23] 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; 18: 1203-1211.
- [24] Chen MF, Hsu HC, Lee YT. Short-term treatment with low-dose pravastatin attenuates oxidative susceptibility of low-density lipoprotein in hypercholesterolemic patients. *Cardiovasc Drugs Ther* 1997; 11: 787-793.
- [25] Meydani SM, Meydani M, Blumberg JB, Leka LS, Siber G, Lozewski R, Thompson C, Pedrosa MC, Diamond RD, Stollar D. Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects. *Jama* 1997; 277: 1380-1386.
- [26] Orekhov AN, Tertov VV, Kabakov AE, Adamova IY, Pokrovsky SN, Smirnov VN. Autoantibodies against modified low density lipoprotein: Nonlipid factor of blood plasma that stimulates foam cell formation. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 316-326.

- [27] Klimov AN, Denisenko AD, Vinogradov AG, Nagornev VA, Pivovarova YI, Sitnikova OD, Pleskov VM. Accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with human lipoprotein-antibody autoimmune complex. *Atherosclerosis* 1988; 74: 41-46.
- [28] Ameli S, Hultgardh-Nilsson A, Regniström J, Calara F, Yano J, Cercek B, Shah PK, Nilsson J. Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16: 1074-1079.
- [29] Palinski W, Miller E, Witztum JL. Immunization of LDL receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 821-825.
- [30] Virella G, Mironova M, Lopes-Virella M. Comparing assays of antibodies to modified low-density lipoproteins. *Clin Chem* 1995; 41: 324-325.
- [31] Mironova M, Virella G, Lopes-Virella MF. Isolation and characterization of human antioxidized LDL autoantibodies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 222-229.



**TABLE I:**

|                                                  | GROUP A   | GROUP B   | GROUP C   |
|--------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Initial weight (g)                               | 154±6,3   | 161±5,3   | 161±4,1   |
| Final weight (g)                                 | 164±3,7   | 176±4,8   | 178±4,3   |
| Total cholesterol (mg/dl)                        | 334±12    | 349±18    | 99±7      |
| Triglycerides (mg/dl)                            | 370±62    | 335±33    | 149±27    |
| VE (µg/ml)                                       | 5.1±1.2   | 45.6±8.9  | 6.0±2.0   |
| Lipid-standardized VE<br>(µg VE/mg total lipids) | 0.82±0.21 | 6.74±0.43 | 2.73±0.77 |
| Initial anti LDL-MDA (AU)                        | 243±12    | 267±16    | 224±14    |
| Final anti LDL-MDA (AU)                          | 427±25    | 372±27    | 286±20    |
| Final - initial anti LDL-MDA                     | 184±28    | 105±26    | 62±26     |

## FIGURE LEGENDS:

**Figure 1:** Total serum cholesterol (mg/dL) and tryglicerides (mg/dL) in 33 male hamsters divided in 3 groups, at the end of the experimental period. Hamsters were fed a control diet containing 2% cholesterol and 10% butter (group A), or the same diet as group A plus 0.2% vitamin E (group B), or control diet (group C).

**Figure 2:** Serum levels of vitamin E in 33 hamsters at the final of the experimental period, divided in 3 groups, as detailed in figure 1. Hamsters were fasted overnight, and vitamin E levels were determined by reversal-phase high performance liquid chromatography. All values are expressed as  $\mu\text{g/mL}$  and presented as mean  $\pm$  SEM.

**Figure 3:** Lipid-standardized serum levels of vitamin E (Vitamin E serum levels divided by total lipids) in the 33 male hamsters at the final of the experimental period, divided in 3 groups, as defined in figure 1. Total serum cholesterol and tryglicerides (total lipids) were determined by enzymatic method, and serum levels of vitamin E were determined by HPLC. The relation was expressed in  $\mu\text{g}$  of VE/mg of total serum lipids. All results are presented as mean  $\pm$ SEM.

**Figure 4:** Increase in anti-MDA-LDL autoantibody levels (final level - baseline level) in 33 hamsters, along the experimental period (20 weeks), divided in 3 groups of animals, as defined in figure 1. The antibody levels were determined by ELISA, and are expressed as arbitrary units (A.U.). All determinations were performed in triplicates, and the results are presented as mean  $\pm$ SEM.

**Figure 5:** Linear regression of total serum lipids (mg/dL) vs final level of anti-MDA-LDL autoantibodies in 21 male hamsters from groups A and C (as defined in figure 1), showing a significant linear positive correlation. Total serum lipids (serum cholesterol + tryglicerides) were determined by an enzyme based method, expressed in mg/dL; Serum levels of anti-MDA-LDL were determined by ELISA, and expressed in arbitrary units. Lateral bands define confidence interval of 95%.

**Figure 6:** Linear regression of lipid standardized Log of vitamin E (Log of vitamin E serum levels divided by total serum lipids of each animal at the final of experimental period) vs absolute variation in anti MDA-LDL autoantibodies levels (final - baseline antibody levels) in 33 hamsters from the 3 groups defined in figure 1. Vitamin E serum levels were determined by HPLC, serum lipids were determined by enzymatic method, and the relation was expressed in  $\mu\text{g}$  of VE/mg of total serum lipids; Anti MDA-LDL autoantibody levels were determined by ELISA, and expressed in arbitrary units. Linear regression analysis showed a significant correlation between these parameters. Lateral bands define confidence interval of 95%.

## FIGURES:

FIGURE 1

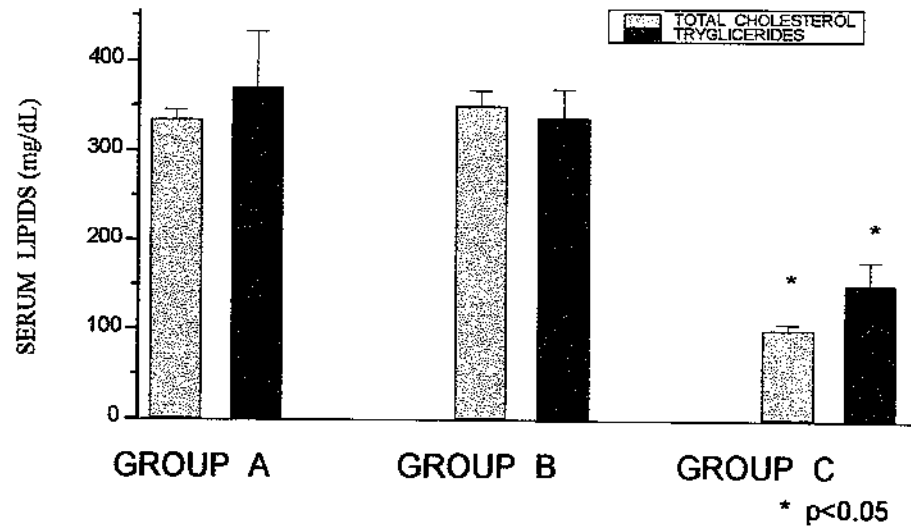


FIGURE 2

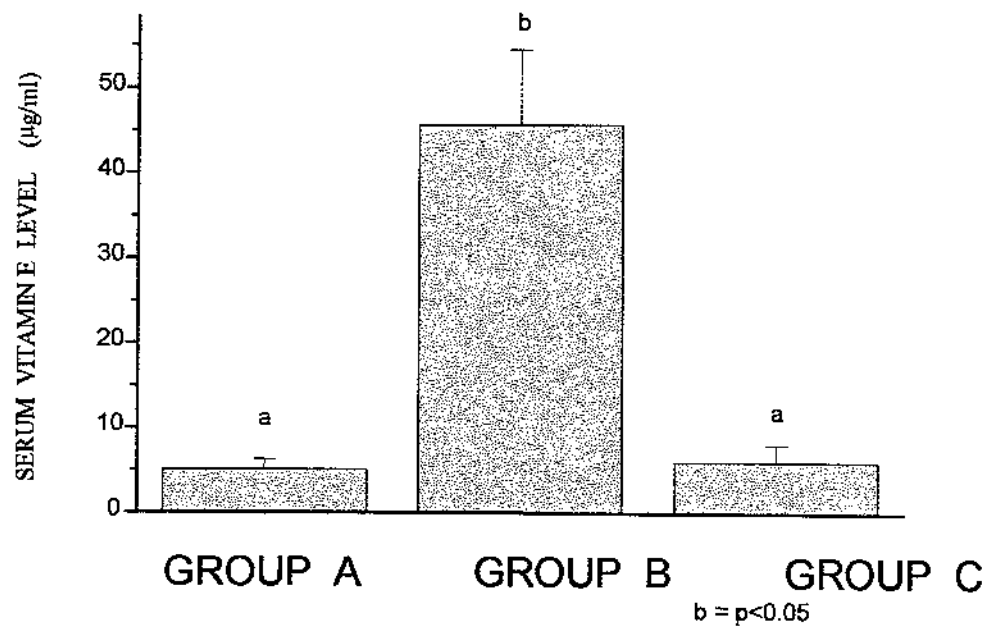


FIGURE 3

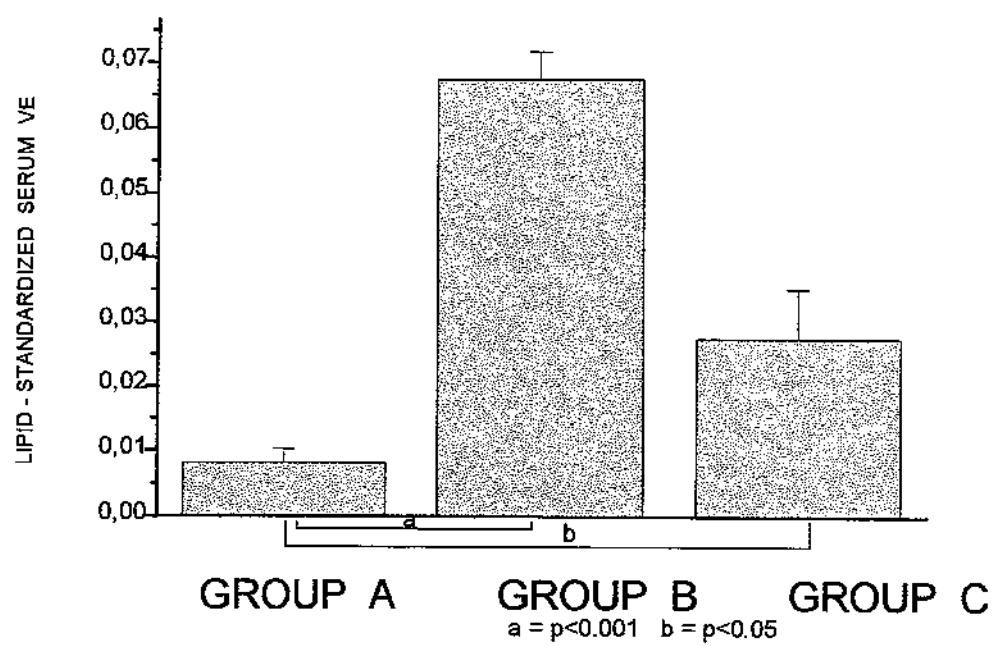


FIGURE 4

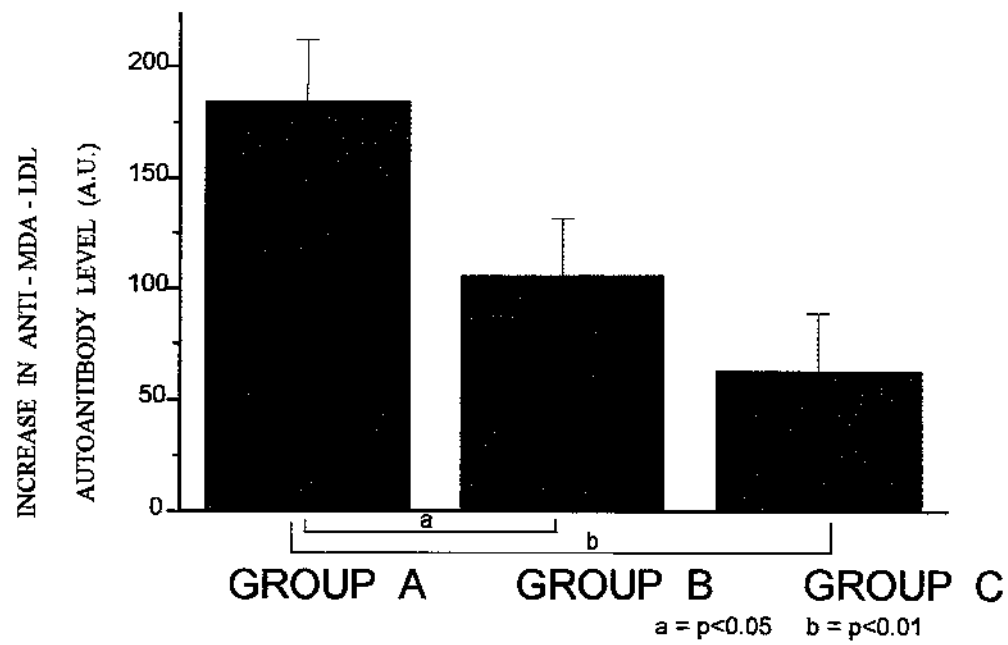


FIGURE 5

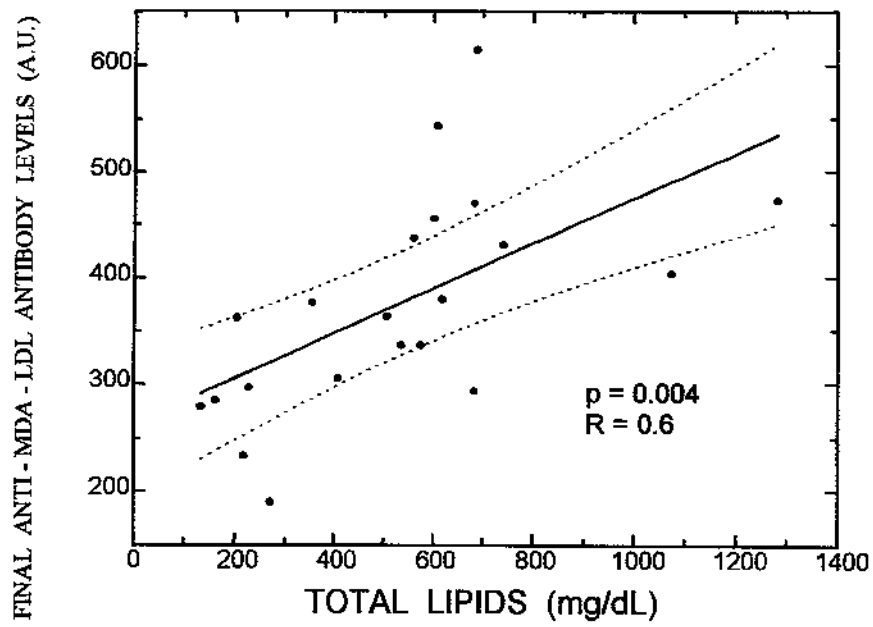
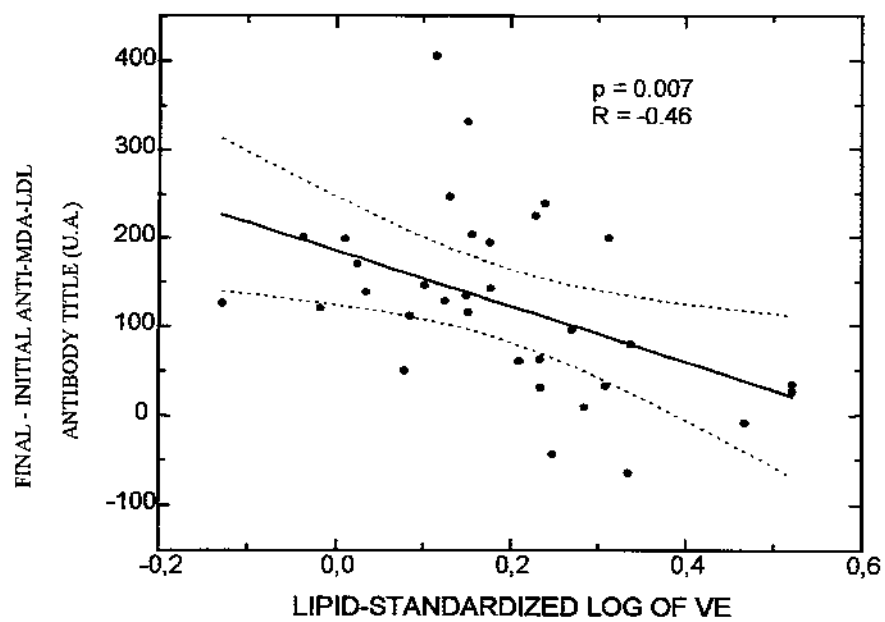




FIGURE 6



### ***3. DISCUSSÃO***

Embora o modelo animal mais utilizado para estudar dislipidemias e aterosclerose sejam os coelhos alimentados com dietas enriquecidas com colesterol, ou os coelhos WHHL (STEBENS, 1986), os hamsters tem despontado como alternativas promissoras. Além da praticidade e economia oferecidas pelas suas reduzidas dimensões corporais, o padrão de hiperlipidemia desenvolvido diante de uma dieta rica em colesterol e gordura saturada aproxima-se mais daquela usualmente encontrada em humanos. Ao contrário dos coelhos, em que a principal lipoproteína que se eleva é a fração  $\beta$ -VLDL, nos hamsters, a principal partícula transportadora de colesterol em situação de hiperlipidemia induzida por dieta é a LDL (NISTOR *et al.*, 1987). O hamster tem sido defendido também como modelo mais adequado para o estudo de antioxidantes em situação de hiperlipidemia, onde observam-se respostas com doses mais baixas de antioxidantes, diante de níveis séricos apenas moderadamente elevados de lipoproteínas, além de não se observar alteração de níveis de LDL quando da suplementação destes (PARKER *et al.*, 1995).

No presente estudo, utilizando uma dieta experimental semelhante à descrita por NISTOR *et al.* (1987), desenvolveu-se animais com hiperlipidemia mista, de características semelhantes às aquelas comumente encontradas em humanos com dislipidemia mista moderada. A maior dificuldade imposta por este modelo, entretanto, consiste na dificuldade em se obter amostras de sangue em volume adequado para as análises necessárias. Por esta razão deixamos de analisar as frações de lipoproteínas (o que poderia inviabilizar o restante das determinações), até porque o padrão de dislipidemia gerado por esta dieta experimental já havia sido exaustivamente detalhado anteriormente (NISTOR *et al.*, 1987).

No modelo animal aqui estudado, a elevação dos níveis séricos de colesterol total e triglicérides levou a um aumento estatisticamente correlacionado no nível sérico de anticorpos contra LDL modificada com dialdeído malônico (MDA-LDL). Esta observação está de acordo com dados descritos previamente por PALINSKI *et al.* (1995), trabalhando com coelhos dislipidêmicos. Recentemente, HULTHE *et al.* (1998) estudou o comportamento de auto-anticorpos anti-Ox-LDL e anti-MDA-LDL em humanos com hipercolesterolemia familiar heterozigótica, comparados com controles pareados, observando que não havia diferenças significantes entre os dois grupos.

Esse estudo, entretanto, não levou em consideração o fato de que, exceto por 3 pacientes, todo o grupo hipercolesterolêmico estava em tratamento com drogas redutoras de colesterol, e em 65% deles a droga empregada era a pravastatina, que apresenta potente atividade antioxidante, diminuindo a oxidabilidade das LDL em pacientes hipercolesterolêmicos (CHEN, HSU, LEE, 1997), o que compromete os resultados encontrados.

Se considerarmos que o nível sérico de anticorpos anti-MDA-LDL relaciona-se diretamente à quantidade absoluta de partículas de LDL oxidadas no organismo, podemos, a partir de nossos resultados, inferir que quanto maior o nível sérico de lipídeos, mais intenso será o processo de oxidação da LDL. Tal correlação pode ser explicada a partir de três fatos: 1) É sabido que as partículas de LDL atravessam o endotélio vascular em direção à íntima em direta proporção à sua concentração sérica, e que o sítio mais provável onde ocorre a modificação oxidativa das mesmas é justamente no microambiente intimal (WITZTUM & STEINBERG, 1991); 2) Como podemos observar a partir de nossos resultados, embora os níveis séricos de VE nos grupos de animais não suplementados (A e C) sejam muito semelhantes, quando analisamos os níveis séricos de VE padronizados por lipídeos (ou seja, divididos pelos lipídeos séricos totais), observamos valores significativamente menores destes no grupo A (hiperlipidêmico). Assim, para uma mesma ingesta dietética de VE (e possivelmente também para os demais antioxidantes lipossolúveis), com decorrentes níveis séricos de VE idênticos, aqueles indivíduos com níveis séricos maiores de lipoproteínas apresentarão menor conteúdo proporcional de VE por partícula de LDL, o que teoricamente levaria à maior oxidabilidade destas partículas em situação de hiperlipidemia. De fato, estudando 406 homens não suplementados com VE, demonstrou-se que a oxidabilidade não só da LDL, mas também das demais partículas aterogênicas (VLDL e IDL) apresentava correlação inversa significativa com níveis séricos de VE e VE padronizada por lipídeos (PORKKALA-SARATAHO, NYSSÖNEN, SALONEN, 1996); 3) Sabe-se que quanto maior o nível sérico de lipoproteínas, menor será sua remoção a partir de receptores celulares de alta afinidade (BROWN & GOLDSTEIN, 1986), portanto, maior será sua duração em circulação. Segundo o trabalho de WALZEM et al. (1995), quanto maior a permanência em circulação das lipoproteínas, maior a sua susceptibilidade à oxidação.

No presente estudo, observamos que a adição de VE à dieta rica em colesterol e gordura saturada não modificou o aumento obtido nos níveis de colesterol e triglicérides em relação aos animais submetidos apenas à dieta indutora de hiperlipidemia. Entretanto, a suplementação de VE levou a um aumento significativamente menor na formação de anticorpos anti-MDA-LDL, e demonstramos uma correlação logarítmica inversa significativa entre os níveis séricos de VE padronizada por lípidos e a formação de autoanticorpos anti-MDA-LDL, sugerindo assim um efeito redutor desta sobre a modificação oxidativa da LDL em condições de hiperlipidemia.

Devido ao MDA-LDL ter sido documentado como um epítopo proeminente da Ox-LDL (HOLVOET, PEREZ, ZHAO, 1995), avaliamos no presente estudo os níveis de anticorpos dirigidos contra MDA-LDL, entendendo-os como representativos dos níveis de anticorpos anti-Ox-LDL.

A resposta humoral (como aquela medida pelos níveis séricos de autoanticorpos) é regulada por vários mecanismos, não refletindo, portanto, apenas a carga antigênica. Assim, devemos considerar também outros fatores possivelmente envolvidos na modulação da reação imune que levou à formação dos anticorpos por nós avaliada. De particular importância é o efeito imunomodulador da VE sobre a resposta humoral. Em um recente estudo clínico aleatorizado e controlado com placebo, a suplementação de VE acentuou *in vivo* as determinações de imunidade celular, bem como a resposta humoral à vacinação contra hepatite B, tétano e difteria em indivíduos idosos saudáveis (MEYDANI *et al.*, 1997). Assim, não podemos descartar um possível papel da suplementação de VE como modificador da formação de autoanticorpos em resposta à produção *in vivo* de neo-epítopos (MDA-LDL), desempenhando desta forma uma função mecanística sobre os resultados finais observados.

Com relação ao papel desempenhado pelos autoanticorpos contra Ox-LDL dentro do processo de aterogênese, o mesmo permanece polêmico. Acredita-se que eles desempenhem algum papel fisiopatológico, já que imunoglobulinas da classe IgG contra epítopos de Ox-LDL foram isoladas dentro de lesões ateroscleróticas em humanos e coelhos (YLÄ-HERTTUALA *et al.*, 1994). Alguns autores (OREKHOV *et al.*, 1991; KLIMOV *et al.*, 1988) descreveram acentuação *in vitro* da formação de células espumosas

quando anticorpos contra LDL modificada ou contra apolipoproteína B100 eram adicionados a meios contendo LDL modificada ou agregados de LDL, sugerindo um papel aterogênico a estes anticorpos. O mecanismo sugerido seria o aumento da captação de LDL modificada pelos monócitos / macrófagos através da via do receptor Fc. Mais recentemente foi documentado que a incubação de macrófagos humanos com imunocomplexos (IC) LDL / anticorpos anti-LDL levava à extensa captação desses IC, preferencialmente através dos receptores Fc  $\gamma$  RI, e a uma paradoxal regulação positiva dos receptores para LDL nativa nesses macrófagos (LOPES-VIRELLA *et al.*, 1997). Embora ainda mal compreendida, podemos especular que esta regulação positiva poderia levar os macrófagos a captarem também LDL nativa (o que não ocorre em condições usuais); uma vez captadas pelos macrófagos, essa LDL nativa seria rapidamente oxidada, de modo que podemos então inferir um papel multiplicador do processo aterogênico a estes autoanticorpos. Por outro lado, dois estudos onde se procedeu imunização ativa de modelos animais hiperlipidêmicos com Ox-LDL ou MDA-LDL demonstraram redução significativa na extensão das lesões ateroscleróticas aórticas, sugerindo um papel protetor desses autoanticorpos contra o processo aterogênico (AMELI *et al.*, 1996 ; PALINSKI, MILLER, WITZTUM, 1995).

Independentemente do papel fisiopatológico desempenhado pelos autoanticorpos anti Ox-LDL, sua quantificação pode ser útil como marcador do processo de oxidação da LDL *in vivo*, ou mesmo como indicador de risco para lesões ateroscleróticas (CHIESA *et al.*, 1998).

A técnica de ELISA desenvolvida neste trabalho é de execução mais prática e rápida em relação às técnicas usualmente descritas para este fim. As principais inovações propostas são os tempos curtos de incubação a 37 ° C (enquanto as técnicas usuais preconizam algumas incubações a 4 ° C por 12 horas), o uso de LDL liofilizada na preparação do antígeno, a possibilidade de preparar simultaneamente várias placas de ELISA, que podem ser mantidas congeladas até o momento de sua utilização, e a não utilização de LDL nativa como antígeno de referência. Com pequenas variações, a maioria das técnicas de ELISA descritas, para dosagem de anticorpos contra diversos tipos de LDL modificadas, baseavam-se na determinação de uma diferença ou relação entre a ligação da amostra aos poços recobertos com LDL nativa e com LDL modificada.

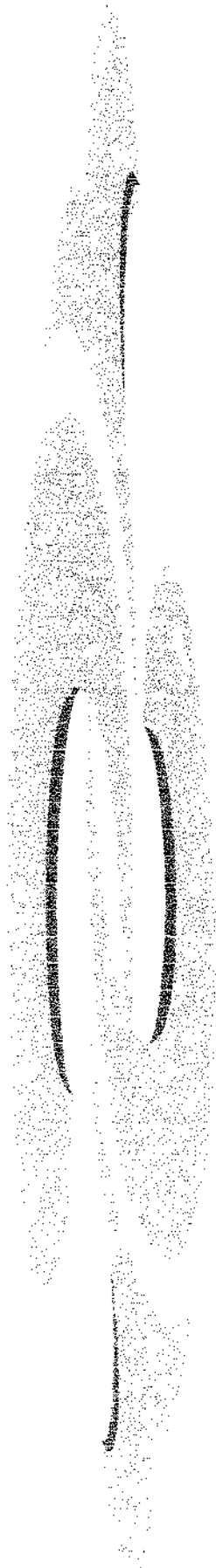
Tal abordagem, entretanto, ignora o fato que a modificação da LDL a torna mais negativa eletricamente, aumentando seu potencial para interações inespecíficas, carga-dependentes e não covalentes, com as imunoglobulinas IgG (VIRELLA, MIRONOVA, LOPES-VIRELLA, 1995). Tal fato adquire maior importância quando consideramos que os autoanticorpos anti Ox-LDL isolados de humanos são predominantemente de baixa a moderada afinidade, e exibem reatividade cruzada variável (MIRONOVA, VIRELLA, LOPES-VIRELLA, 1996). Além disto, HULTHE et al. (1998) demonstraram que placas de ELISA recobertas com LDL “nativo” provavelmente expunham epítomos comuns à LDL modificada, sugerindo que apesar do uso de antioxidantes, a LDL era modificada durante o processo de recobrimento das placas. Por estas razões, no presente trabalho optamos por testar os soros apenas em poços recobertos por MDA-LDL, usando como único valor de referência o “branco” de cada placa (valor da absorbância em poços recobertos pelo antígeno, onde se processou toda a técnica sem a adição de soro algum). No presente estudo, todas as análises foram efetuadas simultaneamente, eliminando assim a necessidade do uso de um padrão de referência. Entretanto, para obter reprodutibilidade em testes não simultâneos, seria necessária a utilização de um anticorpo padrão anti MDA-LDL aplicado em séries de diluição progressiva em cada placa.

Finalizando, os dados obtidos neste trabalho, bem como a revisão da literatura, apontam para um papel promissor da suplementação de vitamina E na prevenção ou atenuação do processo aterogênico. A determinação laboratorial de anticorpos anti Ox-LDL pode vir a ser um importante elemento para estratificação de risco de doenças ligadas à aterosclerose, ou mesmo um instrumento de pesquisas que possa auxiliar-nos para um melhor entendimento da complexa rede fisiopatológica que envolve esta doença.

## ***4. CONCLUSÕES***

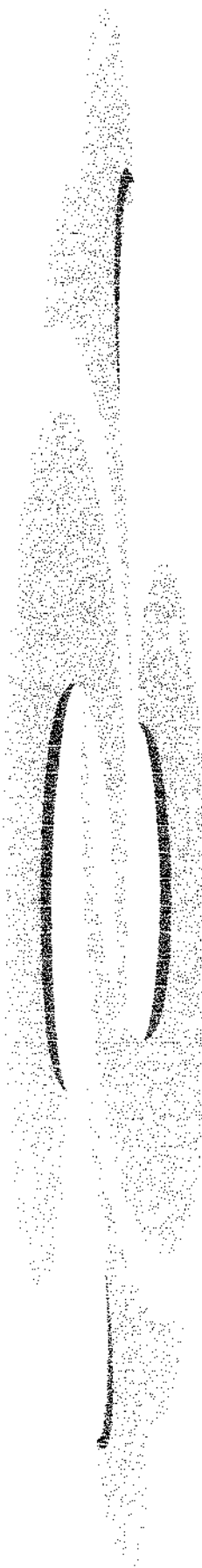


- No modelo animal por nós estudado, as dietas experimentais foram capazes de induzir uma hiperlipidemia mista moderada e elevar os níveis séricos de vitamina E.
- O método de ELISA por nós modificado mostrou-se eficiente para dosar os níveis séricos de autoanticorpos formados contra MDA-LDL.
- Os níveis séricos de colesterol e de triglicérides correlacionaram-se diretamente com os níveis séricos de autoanticorpos formados contra MDA-LDL, sugerindo maior oxidação das lipoproteínas quanto maior forem os níveis séricos das mesmas.
- A suplementação de vitamina E aos animais dislipidêmicos minimizou significativamente a elevação dos títulos de anticorpos contra MDA-LDL, sugerindo efeito protetor *in vivo* contra a oxidação das lipoproteínas.



## ***5. SUMMARY***

Oxidation of low-density lipoproteins plays an important role in atherogenesis, and the supplementation of vitamin E may protect low-density lipoprotein particles against oxidation. Oxidized low-density lipoprotein particles are immunogenic and lead to specific antibody formation. Using an modified ELISA technique we have analyzed the modulation of autoantibody titers against an epitope of oxidized low-density lipoprotein in hamsters that were fed standard rodent chow, plus 2% cholesterol and 10% butter, with and without 0,2% DL  $\alpha$  tocopherol. The groups that were fed a cholesterol-fat enriched diet presented a three fold increase in total serum cholesterol ( $p<0,01$ ) and two fold increase in serum triglycerides ( $p<0,01$ ) as compared to control. Vitamin E supplementation played no role in serum cholesterol and serum triglyceride concentration. However, DL  $\alpha$  tocopherol supplementation led to a decreased autoantibody (anti low-density lipoprotein - malondialdehyde) formation ( $p<0,05$ ). Such results indicate that vitamin E supplementation may play a protective role in the autoimmune process that accompanies atherogenesis



## ***6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

- ABBEY, M.; NESTEL, P.J.; BAGHURST, P.A. - Antioxidant vitamins and low-density-lipoprotein oxidation. **Am. J. Clin. Nutr.**, 58:525-32, 1993.
- AMELI, S.; HULTGARDH-NILSSON, A.; REGNISTRÖM, J.; CALARA, F.; YANO, J.; CERCEK, B.; SHAH, P.K.; NILSSON, J. - Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 16: 1074-1079, 1996.
- BABIY, A.V.; GEBICKI, J.M.; SULLIVAN, D.R. ; WILLEY, K. - Increased oxidizability of plasma lipoproteins in diabetic patients can be decreased by probucol therapy and is not due to glycation. **Biochem. Pharmacol.**, 43: 995-1000, 1992.
- BELLOMO, G.; MAGGI, E.; POLI, M.; AGOSTA, F.G.; BOLLATI, P.; FINARDI, G. - Autoantibodies against oxidatively modified LDL in NIDDM. **Diabetes**, 44: 60-66, 1995.
- BERGMARK, C.; WU, R.; de FAIRE, U.; LEFVERT, A.K.; SWEDENBORG, J. - Patients with early-onset peripheral vascular disease have increased levels of autoantibodies against oxidized LDL. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 15: 441-445, 1995.
- BERLINER, J.A.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A.M.; FRANCK, J.S.; DEMER, L.L.; EDWARDS, P.A.; WATSON, A.D.; LUSIS, A.J. - Atherosclerosis: Basic mechanisms. Oxidation, inflammation and genetics. **Circulation**, 91: 2488-96, 1995.
- BOYD, HC; GOWN, AM; WOLFBAUER, G; CHAIT, A. - Direct evidence for a protein recognized by a monoclonal antibody against oxidatively modified LDL in atherosclerotic lesions from a Watanabe heritable hiperlipidemic rabbit. **Am J Pathol**, 135: 815-825, 1989.
- BROWN, MS & GOLDSTEIN, JL: A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, 232: 34-47, 1986.
- CHEN, MF; HSU, HC; LEE, YT. - Short-term treatment with low-dose pravastatin attenuates oxidative susceptibility of low-density lipoprotein in hypercholesterolemic patients. **Cardiovasc Drugs Ther** , 11: 787-793, 1997.

- CHIESA, R.; MELISSANO, G.; CASTELLANO, R.; ASTORE, D.; MARONE, E.M.; GROSSI, A.; MAGGI, E.; FINARDI, G.; CASASCO, A.; BELLOMO, G. - In search of biological markers of high-risk carotid artery atherosclerotic plaque: enhanced LDL oxidation. **Ann. Vasc. Surg.**, 12: 1-9, 1998.
- CUSHING, S.D.; BERLINER, J.A.; VALENTE, A.J.; TERRITO, M.C.; NAVAB, M.; PARHAMI, F.; GERRITY, R.; SCHATZ, C.J.; FOGELMAN, A.M. - Minimally modified LDL induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial and smooth muscle cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 87: 5134-5138, 1990.
- DIMMELER, S.; HAENDELER, J.; GALLE, J.; ZEHER, A.M. - Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. **Circulation**, 95: 1760-1763, 1997.
- ESTERBAUER, H.; JÜRGENS, G.; QUEHENBERGER, O.; KOLLER, E. - Autoxidation of human low density lipoprotein: Loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generations of aldehydes. **Journal of Lipid Research**, 28: 495- 509, 1987.
- FOGELMAN, A.M.; SHECHTER, I.; SEAGER, J.; HOKON, M.; CHILD, J.S.; EDWARDS, P.A. - Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 77: 2214-18, 1980.
- FRUEBIS, J.; CAREW, T.E.; PALINSKI, W. - Effect of vitamin E on atherogenesis in LDL receptor-deficient rabbits. **Atherosclerosis**, 117: 217-224, 1995.
- GEY, K.F.; PUSKA, P.; JORDAN, P.; MOSER, U.K. - Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. **Am. J. Clin. Nutr.**, 53: 326S-334S, 1991.
- GILLIGAN, D.M.; SACK, M.N.; GUETTA, V.; CASINO, P.R.; QUYYUMI, A.A.; RADER, D.J.; PANZA, J.A.; CANNON III, R.O. - Effect of antioxidants vitamins on LDL oxidation and impaired endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic patients. **J.Am.Coll.Cardiol.**, 24:1611-1617, 1994.

- GOLDSTEIN, J.L.; HO, Y.K.; BASU, S.K.; BROWN, M.S.- Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 76: 333-7, 1979.
- HENSE, H.W.; STENDER, M.; BORS, W.; KEIL, U. - Lack of an association between serum vitamin E and myocardial infarction in a population with high vitamin E levels. **Atherosclerosis**, 103: 21-28, 1993.
- HOLVOET, P., PEREZ, G., ZHAO, Z., et al. Malondialdehyde-modified low density lipoproteins in patients with atherosclerotic disease. **J Clin Invest**, 95: 2611-2619, 1995.
- HUANG, Y.H.; RÖNNELID, J.; FROSTEGARD, J. - Oxidized LDL induces enhanced antibody formation and MHC class II-dependent IFN- $\gamma$  production in lymphocytes from health individuals. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 15: 1577-1583, 1995.
- HULTHE, J.; WIKSTRAND, J.; LIDELL, A.; WENDELHAG, I.; HANSSON, G.K.; WIKLUND, O. - Antibody titers against oxidized LDL are not elevated in patients with familial hypercholesterolemia. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 18: 1203-1211, 1998.
- JIALAL, I. & GRUNDY, S.M. - Effect of combined supplementation with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbate and beta carotene on low-density lipoprotein oxidation. **Circulation**, 88: 2780-6, 1993.
- JÜRGENS, G.; HOFF, H.F.; CHISOLM III, G.M.; ESTERBAUER, H. - Modification of human low density lipoprotein by oxidation - characterization and pathophysiological implications. **Chem phys lipids**, 45: 315-36, 1987.
- KANE, J.P. & MALLOY, M.J. - Disorders of lipoprotein metabolism. *in*: GREENSPAN, F.S. & BAXTER, J.D. (eds) - **Basic & Clinical Endocrinology**. Appleton & Lange: 649-678, 1994.

- KARDINAAL, A.F.M.; RINGSTAD, F.J.K.; GOMEZ-ARACENA, J.; MAZAEV, V.P.; KOHLMEIER, L.; MARTIN, B.C.; ARO, A.; KARK, J.D.; DELGADO-RODRIGUEZ, M.; RIEMERSMA, R.A.; VAN'T VEER, P.; HUTTUNEN, J.K.; MARTIN-MORENO, J.M. - Antioxidants in adipose tissue and risk of myocardial infarction: the EURAMIC study. **Lancet**, 342: 1379-1384, 1993.
- KHOO, J.C.; MILLER, E.; PIO, F.; STEIMBERG, D.; WITZTUM, J. - Monoclonal antibodies against LDL further enhance macrophage uptake of LDL aggregates. **Arterioscler. Thromb.**, 12: 1258-1266, 1992.
- KLIMOV, A.N.; DENISENKO, A.D.; VINOGRADOV, A.G.; NAGORNEV, V.A.; PIVOVAROVA, Y.I.; SITNIKOVA, O.D.; PLESKOV, V.M. - Accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with human lipoprotein-antibody autoimmune complex. **Atherosclerosis**, 74: 41-46, 1988.
- KLIMOV, A.N.: *In Vivo* formation of modified lipoproteins with increase affinity for macrophages. **Atheroscler rev**, vol 17; 75-86 Raven press, 1988.
- KUGIYAMA, K.; KERNS, S.A.; MORRISETT, J.D.; ROBERTS, R.; HENRY, P.D. - Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. **Nature**, 344: 160-162, 1990.
- KUME, M.; CYBULSKI, M.I.; GIMBRONE Jr, M.A. - Lysophosphatidyl-choline, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured arterial endothelial cells. **J. Clin. Invest.**, 90: 1138-1144, 1992.
- LOPES-VIRELLA, M.; BINZAFAR, N.; RACKLEY, S.; TAKEI, A.; LA VIA, M.; VIRELLA, G. - The uptake of LDL-IC by human macrophages: predominant involvement of the FcγRI receptor. **Atherosclerosis**, 135: 161-170, 1997.
- MACKNESS, M.; ABBOTT, C.; ARROL, S.; DURRINGTON, P.N. - The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. **Biochem. J.**, 294: 829-34, 1993.



- MAGGI, E.; CHIESA, R.; MELISSANO, G.; CASTELLANO, R.; ASTORE, D.; GROSSI, A.; FINARDI, G.; BELLOMO, G. - LDL oxidation in patients with severe carotid atherosclerosis: A study of in vitro and in vivo oxidation markers. **Arterioscler Thromb.** 14: 1892-1899, 1994.
- MEYDANI, S.N.; MEYDANI, M.; BLUMBERG, J.B.; LEKA, L.S.; SIBER, G.; LOZEWSKI, R.; THOMPSON, C.; PEDROSA, M.C.; DIAMOND, R.D.; STOLLAR, D. - Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects. **JAMA**, 277: 1380-1386, 1997.
- MIRONOVA, M.; VIRELLA, G.; LOPES-VIRELLA, M.F. - Isolation and characterization of human antioxygenized LDL autoantibodies. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 16: 222-229, 1996.
- MUNDAY, J.S.; THOMPSON, K.G.; JAMES, K.A.C.; MANKTELOW, B.W. - Dietary antioxidants do not reduce fatty streak formation in the C57B/6 mouse atherosclerosis model. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 18: 114-119, 1998.
- MURUGESAN, G.; GISOLM, G.M.; FOX, P.L. - Oxidized low-density lipoprotein inhibits the migration of aortic endothelial cells in vitro. **J. Cell Biol.**, 120: 1011-1019, 1993.
- NISTOR, A.; BULLA, A.; FILIP, D.A.; RADU, A. - The hyperlipidemic hamster as a model of experimental atherosclerosis. **Atherosclerosis**, 68: 159-173, 1987.
- OREKHOV, A.N.; TERTOV, V.V.; KABAKOV, A.E.; ADAMOVA, I.Y.; POKROVSKY, S.N.; SMIRNOV, V.N. - Autoantibodies against modified low density lipoprotein: Nonlipid factor of blood plasma that stimulates foam cell formation. **Arterioscler Thromb**, 11: 316-326, 1991.
- PALINSKI, W.; ROSENFELD, M.E.; YLÄ-HERTTUALA, S.; GURTNER, G.C.; SOCHER, S.S.; BUTLER, S.W.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T.E.; STEINBERG, D.; WITZTUM, J.L. - Low-density lipoprotein undergoes oxidative modification *in vivo*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 86: 1372-1376, 1989.

- PALINSKI, W.; YLÄ-HERTTUALA, S.; ROSENFELD, M.E.; BUTLER, S.W.; SOCHER, S.A.; PARTHASARATHY, S.; CURTISS, L.K.; WITZTUM, J.L. - Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during oxidative modification of low density lipoprotein. **Arteriosclerosis**, 10: 325-35, 1990.
- PALINSKI, W.; MILLER, E.; WITZTUM, J.L. - Immunization of LDL receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 92: 821-825, 1995.
- PALINSKI, W.; TANGIRALA, K.; MILLER, E.; YOUNG, S.G.; WITZTUM, J.L. - Increased autoantibody titers against epitopes of oxidized LDL in LDL receptor-deficient mice with increased atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 15: 1569-1576, 1995.
- PALINSKI, W.; HÖRKKÖ, S.; MILLER, E.; STEIMBRECHER, U.P.; POWELL, H.C.; CURTISS, L.K.; WITZTUM, J.L. - Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice; Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma. **J. Clin. Invest.**, 98: 800-14, 1996.
- PARKER, R.A.; SABRAH, T.; CAP, M.; GIL, B.T. - Relation of vascular oxidative stress,  $\alpha$ -tocopherol, and hypercholesterolemia to early atherosclerosis in hamsters. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 15: 349-358, 1995.
- PARTHASARATHY, S.; STEINBRECHER, U.P.; BARNETT, J.; WITZTUM, J.L.; STEINBERG, D. - Essential role of phospholipase A<sub>2</sub> activity in endothelial cell-induced modification of low density lipoprotein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 82: 3000-4, 1985.
- PORKKALA-SARATAHO, E.; NYSSÖNEN, K.; SALONEN, J.T. - Increased oxidation resistance of plasma lipoproteins at high vitamin E levels in non-vitamin E supplemented men. **Atherosclerosis**, 124: 83-94, 1996.

- PRASAD, K. & KALRA, J. - Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: Effect of vitamin E. **Am Heart J**, 125: 958-973, 1993.
- PUURUNEN, M.; MÄNTTÄRI, M.; MANNINEN, V.; TENKANEN, L.; ALFTHAN, G.; EHNHOLM, C.; VAARALA, O.; AHO, K.; PALOSUO, T. - Antibody against oxidized low-density lipoprotein predicting myocardial infarction. **Arch Intern Med**, 154: 2605-2609, 1994.
- QUINN, M.T.; PATHASARATHY, S.; FONG, L.G.; STEINBERG, D. - Oxidatively modified low-density lipoproteins: A potential role in recruitment and retention of monocyte/ macrophages during atherosclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 84: 2995-2998, 1987.
- REGNSTRÖM, J.; NILSSON, J.; TORNVALL, P.; LANDOU, C.; HAMSTEN, A. - Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and atherosclerosis in man. **Lancet**, 339: 1183-6, 1992
- RIBEIRO JORGE, P.A.; OSAKI, M.; ALMEIDA, E.; NETO, L.C.; METZE, K. - Effects of vitamin E on endothelium-dependent coronary flow in hypercholesterolemic dogs. **Atherosclerosis**, 126: 43-51, 1996.
- RIBEIRO JORGE, PA - Endotélio, lípidos e aterosclerose. **Arq Bras Cardiol**, 68: 129- 34, 1997.
- RIMM, E.B.; MEIR, S.D.; STAMPFER, M.J.; ASCHERIO, A.; GIOVANNUCCI, E.; COLDITZ, G.A.; WILLETT, W.C. - Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. **N.Engl.J.Med.**, 328: 1450-1456, 1993.
- RIVLIN, R.S. - Disorders of vitamin metabolism: Deficiencies, metabolic abnormalities and excesses. *in* **Cecil textbook of medicine**, W.B.Saunders ed., 19<sup>th</sup> edition, 1170-82, 1992.
- ROSENFELD, ME; PALINSKI, W.; YLÄ-HERTTUALA, S.; BUTLER, S.; WITZTUM, J.L. - Distribution of oxidation specific lipid-protein adducts and apolipoprotein B in atherosclerotic lesions of varying severity from WHHL rabbits. **Arteriosclerosis**, 10: 336-49, 1990.

- ROSS, R : The pathogenesis of atherosclerosis . *in Braunwald Heart disease: A textbook of cardiovascular medicine*, 5<sup>th</sup> edition: 1105-25, 1997.
- SALONEN, J.T.; YLÄ-HERTTUALA, S.; YAMAMOTO, R.; BUTLER, S.; KORPELA, H.; SALONEN, R.; NYSSÖNEN, K.; PALINSKI, W.; WITZTUM, J.L. - Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet*, 339: 883-887, 1992.
- STAMPFER, M.J.; HENNEKENS, C.H.; MANSON, J.E.; COLDITZ, G.A.; BERNARD ROSNER, B.S.; WILLETT, W.C. - Vitamin E consumption and risk of coronary disease in women. *N.Engl. J. Med.*, 328: 1444-1449, 1993.
- STEBBENS, W. - An appraisal of cholesterol feeding in experimental atherogenesis. *Prog. cardiovasc. Dis.*, 29: 107-128, 1986.
- STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T.E.; KHOO, J.C.; WITZTUM, J.L. - Beyond cholesterol: Modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, 320: 915-924, 1989.
- STEINBERG, D. - Lipoprotein modification and atherosclerosis. *Atheroscl. Rev.*, 23: 115-21, 1991.
- STEINBRECHER, U.P.; PARTHASARATHY, S.; LEAKE, D.S.; WITZTUM, J.L. - Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 3883-7, 1984.
- STEINBRECHER, UP - Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. *J.Biol.Chem.*, 262: 3603-8, 1987.
- STEPHENS, N.G.; PARSONS, A.; SCHOFIELD, P.M.; KELLY, F.; CHEESEMAN, K.; MITCHINSON, M.J.; BROWN, M.J. - Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*, 347: 781-786, 1996.

- STEWART-LEE, A.L.; FORSTER, L.A.; NOUROOZ-ZADEH, J.; FERNS, G.A.A.; ANGAARD, E.E. - Vitamin E protects against impairment of endothelium-mediated relaxations in cholesterol-fed rabbits. **Arterioscler. thromb.**, 14: 494-499, 1994.
- THOMAS, S.R.; NEUZIL, J.; STOCKER, R. - Cosupplementation with coenzyme Q prevents the prooxidant effect of  $\alpha$ -tocopherol and increases the resistance of LDL to transition metal-dependent oxidation initiation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 16: 687-696, 1996.
- TÖRNWALL, M.E.; VIRTAMO, J.; HAUKKA, J.K.; ARO, A.; ALBANES, D.; EDWARDS, B.K.; HUTTUNEN, J.K. - Effect of  $\alpha$ -Tocopherol and  $\beta$ -carotene supplementation on the incidence of intermittent claudication in male smokers. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 17: 3475-3480, 1997.
- VIRELLA, G.; MIRONOVA, M.; LOPES-VIRELLA, M. - Comparing assays of antibodies to modified low-density lipoproteins. **Clin Chem**, 41: 324-325, 1995.
- WALZEM, R.L.; WATKINS, S.; FRANKEL, E.N.; HANSEN, R.J.; GERMANS, J.B. - Older plasma lipoproteins are more susceptible to oxidation: A linking mechanism for the lipid and oxidation theories of atherosclerotic cardiovascular disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 92: 7460-7464, 1995.
- WHO - MONICA PROJECT: Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization Monica Project: Registration procedures, event rates and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. **Circulation** 90: 583 , 1994.
- WILLIAMS, R.J.; MOTTERAM, J.M.; SHARP, C.H.; GALLAGHER, P.J. - Dietary vitamin E and the attenuation of early lesion development in modified Watanabe rabbits. **Atherosclerosis**, 94: 153-159, 1992.
- WITZTUM, J.L and STEINBERG, D. Role of oxidized Low Density Lipoprotein in atherogenesis. **J.Clin.Invest.**, 88:1785-1792, 1991.

- YLÄ-HERTTUALA, S.; PALINSKI, W.; BUTLER, S.; PICARD, S.; STEINBERG, D. WITZTUM, J.L - Rabbit and human atherosclerosis lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. **Arterioscler. Thromb.**, 14: 32-40, 1994.
- YLÄ-HERTTUALA, S.; PALINSKI, W.; ROSENFELD, M.E.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T.E.; BUTLER, S.; WITZTUM, J.L.; STEINBERG, D. - Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. **J. Clin. Invest.**, 84: 1086-95, 1989.