GABRIELA CRISTINA TONINI

**EFEITOS DA IMUNIZAÇÃO COM
LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE
OXIDADA NA ATEROSCLEROSE
EXPERIMENTAL MURINA E NO MODELO
DE DOENÇA RENAL CRÔNICA**

Trabalho apresentado Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Magnus Ake Gidlund

São Paulo
2010

RESUMO

TONINI, G. C. **Efeitos da Imunização com Lipoproteína de Baixa Densidade Oxidada na Aterosclerose Experimental Murina e no Modelo de Doença Renal Crônica.** 2010. 105 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A aterosclerose, principal causa de doença cardiovascular, é uma afecção inflamatória crônica e progressiva. Sabe-se os anticorpos contra LDL oxidada (oxLDL) estão envolvidos no desenvolvimento da lesão aterosclerótica. Neste trabalho induzimos a produção desses anticorpos através da imunização de camundongos apoE^{-/-} (*knock-out* para a apolipoproteína E) e C57Bl/6 com oxLDL. A fim de se avaliar o impacto dessa imunização avaliamos os perfis lipídico e de anticorpos anti-oxLDL e anti-pepD, sendo que o pepD é um peptídeo derivado da apolipoproteína B. Animais apoE^{-/-} possuem maiores níveis de lípides sorológicos que animais C57Bl/6, exceto de HDL. A imunização com oxLDL não altera o perfil lipídico desses animais. Todavia, os anticorpos anti-oxLDL das classes IgM e IgG e da subclasse de IgG₁ evidenciaram aumento, após a imunização com oxLDL. Anticorpos IgM anti-pepD aumentaram com a imunização em animais C57Bl/6 e não nos apoE^{-/-}. Acreditamos que isso ocorra porque nos animais C57Bl/6 deva ocorrer uma resposta primária contra a oxLDL enquanto os apoE^{-/-} já deviam ter sido estimulados por auto-antígenos. O adjuvante usado na imunização estimula a resposta Th2, e por isso ocorreu aumento de anticorpos IgG₁, que por si pode apresentar um efeito ateroprotetor. A aterosclerose pode ocorrer com maior frequência, em indivíduos portadores de doenças renais crônicas. Para estudar essa interferência submetemos os animais a um modelo de isquemia e reperfusão renal (I/R). A I/R promoveu aumento da concentração de TG. O aumento de anticorpos IgG anti-oxLDL promovidos pela I/R sugere que o este procedimento desencadei um processo inflamatório que causa aumento a oxidação de LDL. Desta forma, concluímos que a I/R pode ser considerado um procedimento pró-aterosclerótico. A imunização com oxLDL não foi capaz de reverter os efeitos pro-aterogênicos causados pela I/R.

Palavras-chave: Imunização. Aterosclerose. Lipoproteína LDL. Nefropatias. Peptídeo.

ABSTRACT

TONINI, G. C. **Effect of Immunization With Oxidized Low Density Lipoprotein in Experimental Atherosclerosis Model and Chronic Kidney Disease Model**. 2010. 105 p. Ph. D. Thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Atherosclerosis, the main cause of cardiovascular disease, is a chronic and progressive inflammatory condition. It is known that the oxidized LDL (oxLDL) antibodies are involved in the development of the atherosclerotic lesion. In the present work we induced the formation of such antibodies through apoE^{-/-} immunization with oxLDL (knock-out mice for apolipoprotein E). In order to evaluate the impact of this immunization we evaluate the lipids and antibody (anti-oxLDL and anti-pepD – pep D is a peptide derived from apolipoprotein B) profile. The apoE^{-/-} animals used have higher seric levels of most lipids than C57Bl/6 animals, the exception being HDL. Despite male apoE^{-/-} mice having higher seric concentration of triacylglycerols, total cholesterol and LDL, literature points out that they have smaller atherosclerotic lesions. The oxLDL immunization does not change apoE^{-/-} animals lipid profile. However, there was evidence of increased anti-oxLDL antibodies of the IgM, IgG classes and IgG₁ sub-class after the oxLDL immunization. On its turn, anti-pepD IgM antibodies increased with immunization in C57Bl/6 animals only, and not in apoE^{-/-}. We believe this happened not as a primary immune response against oxLDL in the apoE^{-/-}, but rather from the atheroprotector effect caused by the increased IgG₁ subclass antibodies due to the Th2 answer stimulated by the adjuvant used in the immunization. Atherosclerosis has a higher incidence in individuals with chronic renal conditions. In order to study such interference, we submitted the animals to a renal ischemia and reperfusion model (I/R). The I/R procedure increased TG concentration, what can make atherosclerosis more severe. The increase in IgG anti-oxLDL antibody caused by I/R suggests that the inflammation process set by the procedure increases LDL oxidation. This way, we conclude that the I/R can be considered a pro-atherosclerotic procedure. The oxLDL immunization was not able to revert the atherogenic effect caused by I/R model.

Key words: Immunization. Atherosclerosis. LDL lipoprotein. Nephropathies. Peptide.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ATEROSCLEROSE

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) as doenças cardiovasculares são as principais causas de morte no mundo. Aproximadamente 17,1 milhões de pessoas morreram devido doenças cardiovasculares em 2004, representando 29% de todas as mortes globais. Ao longo dos últimos anos a mortalidade por causas cardiovasculares em países desenvolvidos tem diminuído, ao passo que em países em desenvolvimento houve rápida elevação (BARRETO et al., 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). De acordo com as projeções da OMS, esta tendência tende a persistir, agravando ainda mais o quadro de morbi-mortalidade nos países em desenvolvimento. No Brasil, aproximadamente 27% dos óbitos são de causa cardiovascular perfazendo um coeficiente de mortalidade seis a sete vezes superiores aos observados para as doenças infecciosas e parasitárias nos grandes centros urbanos. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Estima-se que em 2030, 23,6 milhões de pessoas morrerão de doenças cardiovasculares no mundo (WHO, 2010).

O ônus econômico dessas doenças tem crescido exponencialmente nas últimas décadas. Dados previdenciários indicam que no Brasil ocorre aproximadamente um milhão de internações por doenças cardiocirculatórias por ano, com profundas repercussões na força de trabalho e com conseqüente custo social. Em 2000, as doenças cardiovasculares foram responsáveis pela principal alocação de recursos públicos em hospitalizações no Brasil, sendo a terceira causa de permanência hospitalar prolongada. No período de 1991 a 2000, os custos hospitalares atribuídos às doenças cardiovasculares tiveram uma alta de 176% (SANTOS, 2001).

A OMS (WHO, 2006) relaciona mais de 300 fatores de risco associados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, entre os quais destacam-se: gênero (incidência aumentada em homens); idade (homens acima de 45 anos e mulheres pós-menopausa); história familiar de evento aterosclerótico prematuro¹ (cardiopatia coronariana, acidente vascular cerebral, doença arterial periférica) em familiares de primeiro grau; dislipidemias, principalmente nos casos em que há altas concentrações plasmáticas de colesterol total (CT) e de lipoproteína de baixa

¹ Considera-se prematuro o evento ocorrido em homens antes dos 55 anos e em mulheres antes dos 65 anos de idade

densidade (*low density lipoprotein* – LDL) e baixas concentrações de lipoproteína de alta densidade (*high density lipoprotein* – HDL); tabagismo; hipertensão arterial ($\geq 140 \times 90$ mmHg ou pacientes sob tratamento anti-hipertensivo); diabetes melito; sedentarismo; e, obesidade (índice de massa corpórea acima de 30) (HACKAM; ANAND, 2003; FRUCHART et al., 2004). Naghavi et al. (2003) afirmaram que a presença concomitante dos diversos fatores de risco acelera drasticamente a aterogênese.

A aterosclerose é a doença base das principais complicações cardiovasculares que afetam o homem na atualidade, tais como: infarto agudo do miocárdio, angina instável, acidentes vasculares cerebrais, vasculopatias periféricas e aneurismas, entre outras. Apesar de a aterosclerose ter início nos primeiros anos de vida suas complicações aparecem acentuadamente após a terceira década, devido a sua lenta evolução. As diversas manifestações clínicas ocorrem, na maioria dos casos, após a ruptura de placas ateroscleróticas (WITZUM; STEINBERG, 1991).

Um grande número de estudos epidemiológicos e de metabolismo tem estabelecido a relação entre altas concentrações séricas de CT e o aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, apontando as dislipidemias, principalmente a hiperlipidemia, como fatores de risco mais importantes. (ASCER et al., 2004). Entretanto, sabe-se que indivíduos com concentrações sorológicas de colesterol consideradas normais (CT <200 mg/mL, LDL <130 mg/mL, HDL >40 mg/mL e triacilgliceróis <150 mg/mL) podem desenvolver aterosclerose além de outras doenças cardiovasculares graves (RIDKER et al., 2008). Desta maneira, o foco de muitos grupos de pesquisa foi alterado para as lipoproteínas (LP) modificadas, principalmente para a LDL oxidada (oxLDL) (CHAPPEY et al., 1995) e para a resposta imune envolvida no processo aterosclerótico (FROSTEGARD et al., 1992). Anderson et al. (1987) demonstraram que indivíduos com altos níveis plasmáticos de LDL total e, particularmente, da forma oxidada (oxLDL) desenvolvem mais doenças coronarianas, sendo esta situação potencializada quando há redução das concentrações plasmáticas de HDL (JOHNSON et al., 1991). Em estudos sobre a resposta imune contra oxLDL, alguns pesquisadores mostram que anticorpos anti-oxLDL estão correlacionados com a modulação do processo aterosclerótico e com o risco de desenvolvimento de patologias secundárias a aterosclerose, onde pode ser evidenciada a presença de efeitos tanto pró-aterogênicos, quanto anti-aterogênicos.

1.1.1 Lipídios e Lipoproteínas

Os lipídios são elementos químicos fundamentais para formação de todas as células, secreção de vitaminas, bile, hormônios esteróides e para produção e armazenamento de energia. Fisiologicamente, os principais são: os ácidos graxos (AG), triacilgliceróis (TG), fosfolípides (PL) e o colesterol (C). A principal característica dessas biomoléculas quimicamente heterogêneas é a insolubilidade em água. A solubilização dos lipídeos no meio aquoso depende de um arranjo molecular, denominado de lipoproteína (LP) (Figura 1), no qual os TG e C esterificado (CE) são envolvidos por PL e C livre (CL), e, também, da interação entre esses componentes com proteínas específicas, chamadas de apolipoproteínas (apo) (HOEG; BREWER, 1986). As apo não possuem função apenas estrutural. Elas contribuem para a regulação do metabolismo das LP: modulando a atividade de enzimas, direcionando as LP aos locais de catabolismo e interagindo com receptores celulares específicos e de alta afinidade (DONMA; DONMA, 1989). As principais apo são apoA (A-I, A-II e A-IV), apoB (B-48 e B-100), apoC (C-I, C-II e C-III), apoD e apoE (FRANCESCHINI, 1996).

Apesar de apresentarem a mesma estrutura básica (Figura 1), as LP diferem quanto à composição, tamanho, mobilidade eletroforética e densidade. Como foram originalmente analisadas através da ultracentrifugação, sendo separadas em várias frações segundo, diferentes padrões de densidade, passaram a ser designadas em função desta característica. A Tabela 1 mostra algumas características das lipoproteínas plasmáticas, como densidade, tamanho, concentrações de CE, CL, TG, PL, TG e proteína (PR), bem como as principais apo (SANTOS, 2001).

Figura 1 – Esquema da estrutura básica das lipoproteínas. Núcleo hidrofóbico constituído por TG e CE, além de vitaminas lipossolúveis, circundado por componentes anfifílicos, PL, CL e um conjunto de proteína (apo). CE= colesterol Esterificado, CL= Colesterol Livre, TG= Triacilgliceróis, FL= fosfolípides, PR= proteínas

Tabela 1 – Características das lipoproteínas plasmáticas

Lipoproteína	Densidade (g/dL)	Diâmetro (Å)	Composição (%)					Apolipoproteína
			CE	CL	TG	PL	PR	
Quilomícron	>0,95	800-5000	5	2	84	7	2	B-48, E, C, A-I, A-II, A-IV
VLDL	>1,006	300-800	12	7	55	18	8	B-100, E, C
IDL	1,006 -1,019	250-350	23	8	32	21	16	B-100, E, C
LDL	1,019 -1,063	180-280	38	10	9	22	21	B-100
HDL-2	1,063 -1,125	90-120	16	6	4	30	44	A-I, A-II
HDL-3	1,125 -1,210	50-90	12	3	4	26	55	A-I, A-II

FONTE: SANTOS, 2001

NOTA: Abreviaturas: CE= colesterol Esterificado, CL= Colesterol Livre, TG= Triacilgliceróis, FL= fosfolípides, PR= proteínas, VLDL= lipoproteína de densidade muito baixa, IDL= lipoproteína de densidade intermediária, LDL= lipoproteína de baixa densidade e HDL= lipoproteína de alta densidade.

1.1.2 Lipoproteína de Baixa densidade (LDL) e Lipoproteína de Baixa densidade Oxidada (oxLDL)

A LDL é indispensável ao fornecimento do colesterol usado no processo ativo de divisão celular, na síntese de membranas e na síntese de hormônios e sais biliares. (BROWN; KOVANEN; GOLDSTEIN, 1981; BROWN; GOLDSTEIN, 1986). Sua captação é mediada pela interação dos resíduos de lisina da apoB com os receptores específicos para LDL (receptores B-E). Ao entrar na célula o colesterol exerce uma ação bloqueadora da produção desses receptores B-E (BROWN; GOLDSTEIN, 1986).

Em condições normais, a camada endotelial das artérias representa uma barreira para a livre difusão de macromoléculas, contudo aproximadamente 15% da LDL que circula no plasma atravessa o endotélio e penetra na camada íntima (FRY et al., 1986; VESSBY et al., 1987). Naturalmente, a entrada dessa lipoproteína na parede vascular é diretamente proporcional à sua concentração plasmática. Em condições fisiológicas, a concentração de LDL na camada íntima é vinte vezes maior que no fluído intersticial, sendo essa considerada hipercolesterolêmica em relação ao fluído intersticial de outros tecidos. Essa diferença, provavelmente, decorre da falta de linfáticos na íntima e da presença de uma densa matriz extracelular de carga negativa, que aprisiona certa proporção de LDL (PENTIKAINEN et al., 2000).

Contudo, há mecanismos fisiológicos que tendem a diminuir a concentração de LDL na íntima, como a atividade de células musculares, de monócitos e a capacidade de remoção HDL, que executam o chamado “transporte reverso do colesterol”.

A maior concentração de LDL na íntima arterial pode decorrer de: concentrações plasmáticas elevadas da LDL; alterações na funcionalidade endotelial, por ação de diferentes formas de injúria; dificuldades funcionais dos monócitos e das células musculares lisas; transporte reverso de colesterol insuficiente, por baixa concentração da fração HDL

Na região subendotelial da íntima a LDL pode ser modificada por enzimas, como mieloperoxidase, xantina oxidase, NADPH-oxidase e fosfolipases (KLOUCHE et al., 1998; KLOUCHE et al., 2000; LUSIS, 2000), por metilação, por glicação, por agregação (KHOO et al., 1988) e/ou por oxidação (GIDLUND et al., 1996; FERNVIK et al., 2004). Assim, novos antígenos são gerados (STEINBERG et al., 1989)

induzindo diferentes respostas imunes. A modificação de LDL em oxLDL, *in vivo*, comumente deve-se a espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzidas por células ativadas (linfócitos, monócitos/macrófagos, células endoteliais e musculares lisas) (ESTERBAUER; WÄG; PUHL, 1993; CARR; MCCALL; FREI, 2000; CHEN; THOMAS; KEANEY, 2003). Estas espécies desencadeiam uma sequência de reações na partícula onde, inicialmente, ocorre a peroxidação de seus ácidos graxos poliinsaturados liberados dos PF, dando origem à LDL minimamente oxidada. No decorrer do processo, os ácidos graxos se decompõem gerando cetonas e aldeídos reativos, os quais, interagindo com grupos lisina e histidina da apoB, alteram a carga elétrica, a densidade e as propriedades eletroforéticas da partícula de LDL (KEANEY, 2000). Ao longo deste processo, a apoB sofre degradação gradual, gerando fragmentos polipeptídicos. (ESTERBAUER et al., 1992). Além disso, a modificação de estrutura molecular impede seu reconhecimento pelo receptor B-E, porém permite que passe a ser reconhecida por receptores *scavenger* presentes nos macrófagos, cuja expressão não é auto-regulável pela concentração de colesterol intracelular. Por essa razão, há entrada ininterrupta de LDL para o interior dos macrófagos, resultando em células com gordura em demasia, chamadas de células espumosas (ou *foam cell*) (ENDEMANN et al., 1993).

A oxLDL é um potente agente pro-inflamatório: atua estimulando a camada de células endoteliais a produzir moléculas de adesão celular como VCAM-1 (molécula-1 de adesão da célula vascular), ICAM-1 (molécula-1 de adesão intercelular), fatores de crescimento, tal como M-CSF (fator estimulador de colônia de macrófago) e proteínas quimiotáticas, como MCP-1 (proteína-1 quimiotática para monócitos), resultando na adesão e no recrutamento de monócitos e linfócitos circulantes para dentro da parede arterial (LUSIS, 2000), além de aumentar a permeabilidade vascular (SVENSJÖ et al., 2003). Na íntima os monócitos sofrem modificações fenotípicas que os transformam em macrófagos, e por ação quimiotática da oxLDL, são impedidos de retornarem ao sangue circulante (FROSTEGÅRD et al., 1996; STEINBERG, 1997; QUINN et al., 1987; KIM et al., 1994).

1.1.3 Aterogênese

A aterosclerose pode ser definida como um processo inflamatório crônico e degenerativo que acomete as grandes e médias artérias, sendo caracterizada pelo acúmulo de lipídeos, células inflamatórias e elementos fibrosos no espaço subendotelial da íntima (VANDERLAAN; REARDON; GETZ, 2004; LUSIS, 2000).

Na literatura não há um consenso a respeito do fenômeno inicial da aterogênese: se, primeiramente, o endotélio sofre uma injúria ou se a LDL atravessa a parede do vaso antes da injúria endotelial. Contudo, já se sabe que: a LDL pode atravessar a parede do vaso por difusão simples (WILLIAMS; TABAS, 1995); a LDL modificada (mLDL) pode lesionar o endotélio, e que o endotélio lesionado permite um maior influxo de LDL (ROSS; GLOMSET, 1973, BACHEM et al., 1999). Como descrito anteriormente, no espaço subendotelial a LDL é modificada pelo processo de oxidação.

A LDL minimamente modificada, ou seja, quando apenas a fração lipídica está oxidada, induz maior adesão de monócitos, mas não de neutrófilos, às células endoteliais (BERLINER, et al., 1990). A mLDL age nas células da íntima e induz a expressão de citocinas inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão levando a aderência de monócitos e linfócitos ao endotélio e a migração destes para a camada subendotelial. Nessa camada, ocorre a diferenciação dos monócitos em macrófagos (FROSTEGÅRD et al., 1996; STEINBERG, 1997; QUINN et al., 1987, KIM et al., 1994).

O macrófago internaliza a mLDL através de receptores *scavengers*, principalmente SR-A e CD36 (HARA; TAKETOMI, 1987; HASSALL, 1992), sem que ocorra retroalimentação negativa na expressão desse tipo de receptor. Desta maneira o macrófago fica repleto de gotículas citoplasmáticas de ésteres de colesterol, passando a ser chamado de célula espumosa, e, juntamente com células musculares e linfócitos T, formam as estrias gordurosas (LIBBY, 2000). Este é considerado o primeiro estágio do processo aterosclerótico e que pode ser formado nos primeiros anos de vida (MUNRO; COTRAN, 1988).

As células espumosas secretam diversos mediadores inflamatórios incluindo fator ativador de plaqueta (PAF), eicosanoides, interleucinas, fosfolipases e metaloproteases. Em resposta a fatores de crescimento e citocinas secretados por macrófagos e células T, células musculares lisas migram da camada média para a

camada íntima onde se proliferam e produzem matriz extracelular a fim de formar uma cápsula ao redor das células espumosas e do colesterol livre (LEE; LIBBY, 1997). Essa estria fibro-gordurosa caracteriza a fase intermediária da lesão aterosclerótica.

Placas avançadas têm um centro de células gordurosas, debris celulares e lipídios extracelulares circundados por uma capa fibrosa de células musculares lisas e matriz extracelular rica em colágeno. Com a progressão do processo aterosclerótico, as citocinas inflamatórias inibem a proliferação das células musculares lisas e a produção de colágeno e induzem a produção de metaloproteases que degradam o colágeno enfraquecendo a lesão o que a torna suscetível à ruptura (HANSSON et al., 1989; MACH, 1997; AMENTO, 1991).

Figura 2 – Aterogênese. A LDL migra do sangue por difusão simples para a camada íntima, onde é oxidada. A oxLDL estimula as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão, e a produção local de citocinas inflamatórias. Os monócitos são recrutados para a íntima, se diferenciam em macrófagos, e passam a captar oxLDL via receptores *scavenger*, transformando-se em células espumosas.

FONTE: Adaptado de: GLASS; WITZTUM, 2001

1.1.4 Modelos Animais Usados no Estudo da Aterosclerose

Devido à complexidade e a cronicidade da aterosclerose, associada à ausência de métodos de detecção não invasivos que permitam uma caracterização seqüencial da doença, modelos animais têm sido utilizados para definir seus mecanismos fisiopatológicos e se tentar estabelecer alvos precisos para possíveis tratamentos. Vários modelos animais, como coelhos, porcos, primatas e roedores são utilizados em estudos de doenças cardiovasculares, todavia os mais utilizados são os camundongos. No entanto, os camundongos selvagens são altamente resistentes ao desenvolvimento de aterosclerose. Estes animais apresentam baixos níveis sorológicos de VLDL (*very low density lipoprotein*) e LDL e a maior parte do colesterol está na fração de HDL, em resposta a uma dieta com baixos níveis de lipídeos e colesterol. Em camundongos selvagens a HDL é responsável pelo transporte de mais de 85% do colesterol plasmático, enquanto que em humanos a LDL é a principal LP transportadora de colesterol (65-85%) (HOFKER et al., 1998; BRESLOW, 1996; PLUMP, et al., 1992). Apesar dessa diferença metabólica, os camundongos são usados como modelos experimentais para o estudo da aterosclerose por possuírem o mesmo conjunto de genes que controlam o metabolismo de LP em humanos, com poucas exceções. Ainda sua utilização é facilitada pela rápida reprodução, amplo conhecimento da sua genética e pelo pequeno porte dos animais (VANDERLAAN et al., 2004; HOFKER et al., 1998).

As técnicas transgênicas, mormente a de *knockout*, têm possibilitado a criação de modelos murinos para o estudo da fisiopatologia e dos componentes específicos do sistema imune na aterosclerose. Atualmente, dois modelos de camundongos *knockout*, que desenvolvem hipercolesterolemia e aterosclerose são usados: os que são *knockout* para a apoE (*apoE^{-/-}*) e os para receptor de LDL (*Ldlr^{-/-}*). Os *apoE^{-/-}* desenvolvem hipercolesterolemia e aterosclerose espontaneamente enquanto que os *Ldlr^{-/-}* precisam ser alimentados com dieta rica em colesterol (ISHIBASHI et al., 1993; VENIANT et al., 2001).

1.1.4.1 Apolipoproteína E

A apoE é um componente constitutivo dos quilomicrons, e pode estar presente na HDL, VLDL e IDL (*intermediate density lipoprotein*), sendo fundamental para a estabilização, solubilização e catabolismo destas partículas. É sintetizada principalmente pelos hepatócitos, porém pode ser produzida em células de origem hematopoiéticas, como os macrófagos. Atua no transporte de colesterol e outros lipídios entre o tecido periférico e o fígado, ligando-se a receptores específicos nas células desses tecidos (MAHLEY; HUANG, 1999). A deficiência na apoE leva a uma remoção deficiente de quilomicrons remanescentes e de VLDL e IDL da circulação (PLUMP et al., 1992).

Camundongos apoE^{-/-} desenvolvem lesões ateroscleróticas similares as humanas, progredindo desde estrias gordurosas a placas fibrogordurosas e a lesões avançadas (PIEDRAHITA et al., 1992; PLUMP et al., 1992). Entretanto, seu perfil lipídico difere do humano, uma vez que possuem preponderantemente elevação na fração VLDL.

A apoE possui diversas outras funções fisiológicas como na coagulação, estresse oxidativo, homeostase das células neuronais e da glia, função adrenal, proliferação celular e inflamação. Na aterosclerose esta proteína apresenta um papel protetor, uma vez que, sendo produzida localmente pelos macrófagos, promove o efluxo do colesterol dessas células, reduz o estresse oxidativo e inibe os mecanismos da inflamação. (HARA; YOKOYAMA, 1991; HAYEK et al., 1994).

1.1.5 Anticorpos e Aterosclerose

Os diversos neo-antígenos formados a partir da modificação da LDL podem ser reconhecidos por auto-anticorpos. Eles reagem não apenas contra antígenos de natureza lipídica, como relatado na literatura (DAMASCENO et al., 2000), mas também contra a parte protéica da LDL, sugerindo uma importante resposta imune humoral contra a apoB (GIDLUND et al., 1996). O papel desse tipo de resposta imune contra a oxLDL ainda gera muita controvérsia. Alguns estudos tentam correlacionar altos níveis de anticorpos anti-oxLDL ao aumento do risco de desenvolvimento de aterosclerose (HULTHE et al., 2001). Enquanto outros, mais

recentes, mostram a existência de uma relação inversa entre níveis destes anticorpos e a suscetibilidade à ocorrência dessa doença (SHOJI et al., 2000). Em recente publicação, Ketelhuth et al., 2008 testaram frações de oxLDL separadas por tamanho molecular contra soro de pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e de controles normolipidêmicos, sendo que este grupo apresentou títulos mais elevados de anticorpos contra as frações de maior peso molecular e o grupo DAC contra frações de menor peso molecular.

Esses dados reforçam a hipótese da existência de anticorpos contra diferentes fragmentos da oxLDL. A suscetibilidade ou proteção à aterosclerose deve estar relacionada não só aos níveis destes anticorpos, mas também às suas especificidades e suas diferentes classes e subclasses.

Apesar dos animais hiperlipidêmicos apresentarem auto-anticorpos contra oxLDL, o papel dos mesmos no processo aterosclerótico ainda não está esclarecido. Alguns estudos têm demonstrado que anticorpos IgM são anti-aterogênicos por possibilitarem a remoção de partículas de oxLDL através da via clássica de ativação do complemento por C1q (SHAW et al., 2001; LEWIS et al., 2009).

Como em muitas doenças inflamatórias o balanço entre a resposta Th1 e Th2 influencia a progressão da aterosclerose bem como nas subclasses de anticorpos contra os antígenos específicos da doença. A lesão aterosclerótica contém citocinas que promovem uma resposta tipo Th1, predominantemente. Não obstante, quando se analisa as subclasses de IgG anti-oxLDL em modelos murinos tipicamente Th1 (C57Bl/6) a subclasse IgG_{2a} apresenta título maior que a subclasse IgG₁ (SCHULTE et al., 2008).

1.1.5.1. Anticorpos Naturais

Anticorpos naturais são uma classe de anticorpos, principalmente IgM, que são produzidos por células B1 sem a participação de células T. O anticorpo natural IgM que promove proteção contra infecções pneumocócicas é chamado de T15, (SHAW et al., 2000).

Camundongos apoE^{-/-} possuem clones de IgM de anti-oxLDL são idênticos aos T15 na região variável. Esses clones reconhecem a fosforilcolina presente na parede celular de pneumococos, fosfolípidos oxidados e células apoptóticas e inibem a captação de oxLDL e de células apoptóticas por

macrófagos (PALINSKI et al., 1996; HÖRKKÖ et al., 1999; CHANG et al., 1999; SHAW et al., 2001). O efeito ateroprotetor desses anticorpos pode ser através dessa inibição de captação de oxLDL com conseqüente inibição da formação de células espumosas. A vacina anti-pneumocócica reduz a aterosclerose em modelos experimentais (BINDER et al., 2003).

1.1.6 Imunização e Aterosclerose

Muitos estudos mostram a presença de anticorpos IgM e IgG na placa aterosclerótica (ZHOU; HANSSON, 1999; HANSSON, 1979). Essas observações são a base de muitas hipóteses a respeito da função desses anticorpos.

A imunização de camundongos apoE^{-/-} com homólogo de homogeneizado de placa aterosclerótica ou MDA-LDL causa redução da lesão aterosclerótica (ZHOU et al., 2001; GEORGE et al., 1998). Estes estudos mostraram que a presença de anticorpos IgG contra estes antígenos foi o motivo dessa redução.

Outros estudos, observaram que a imunização de animais apoE com peptídeos específicos da apoB também reduziram a aterosclerose (FREDRIKSON et al., 2003; CHYU et al., 2005). Tratamento com IgG humana recombinante contra peptídeos da apoE também reduzem a aterosclerose experimental (SCHIOPU et al., 2004).

1.1.6.1 Adjuvantes na imunização contra Aterosclerose

Os adjuvantes ("adjuvare" = auxiliar) são substâncias utilizadas como estimuladores não-específicos em associação a antígenos, com o objetivo específico de auxiliar ou potencializar a resposta imunológica que seria de menor intensidade, se o antígeno fosse ministrado isoladamente. Além disso, servem para evitar o catabolismo do antígeno, retê-lo no sítio de inoculação e recrutar células imunes a interagirem com o imunógeno. Atuam, também, ativando de maneira seletiva as subpopulações de células T_{helper} (MITCHELL et al., 2001).

O adjuvante influencia na apresentação antigênica, induz a produção de citocinas imunomoduladoras e age sobre as células apresentadoras de antígeno

aumentando, acelerando, modificando ou prolongando a resposta imune específica ao antígeno. O adjuvante de Freund completo, composto por óleo mineral e células mortas de *Mycobacterium tuberculosis*, induz uma forte resposta Th1, DTH (*delayed-type hypersensitivity* - hipersensibilidade tardia) e formação de anticorpos, enquanto que o adjuvante de Freund incompleto, que não contém a micobactéria, induz a uma resposta do tipo Th2, formação de anticorpo, porém não induz DTH (NILSSON; HANSSON; SHAH, 2005). Alum é usado como uma alternativa do adjuvante de Freund por causar menos efeitos adversos. Este, junto com o fosfato de cálcio, são os únicos adjuvantes licenciados para o uso humano (LINDBLAD, 2004). Khallou-Laschet et al. (2006) demonstraram que a injeção de Alum ou adjuvante de Freund completo ou incompleto em camundongos apoE^{-/-} leva a uma grande redução no tamanho da lesão aterosclerótica. Outros estudos demonstram que a imunização de coelhos e camundongos com adjuvante de Freund completo induz a formação de uma resposta imune pró-aterogênica contra HSP (XU et al., 1992; GEORGE et al., 1999). Nos primeiros estágios de ativação do sistema imune na aterosclerose as células Th1 promovem o desenvolvimento dessa doença (BINDER et al., 2002; HANSSON et al., 2002). Neste cenário, adjuvantes que favoreçam uma resposta antiinflamatória Th2 podem ser mais eficientes na imunização contra a aterosclerose.

1.1.7 Aterosclerose e Doença Renal

A mortalidade por doenças cardiovasculares é 10-20 vezes maior em pacientes com doença renal crônica (FOLEY et al., 1998) devido ao fato de apresentarem processos ateroscleróticos avançados.

Idade avançada, hipertensão arterial, diabetes e dislipidemia são fatores de risco comuns às doenças cardiovasculares e renais (LONGENECKER et al., 2002). Contudo, Go et al. (2004) mostraram que somente a taxa de filtração glomerular reduzida constitui fator de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular. Em estudo observacional de longo prazo, estratificado por faixa etária, foi demonstrado que o déficit de função renal é um fator de risco independente para a ocorrência de eventos cardiovasculares e óbitos decorrentes desses eventos (FRIED et al., 1998).

É crescente o número de evidências que sugerem o efeito direto da aterosclerose sobre a função renal; em grande parte por causa da doença microvascular e intraglomerular que representam a fase silenciosa da isquemia do rim (MEYRIER; HILL; SIMON, 1998; TEXTOR, 2004). Anormalidades na função deste órgão podem estar presentes nos primeiros estágios da aterogênese e em pacientes com evidências de aterosclerose apenas extrarenal (BAGGIO et al., 2001).

A patogênese envolvida na interação entre essas doenças ainda está pouco esclarecida, principalmente por serem doenças multifatoriais. Os animais apoE^{-/-} têm sido utilizados a fim de se entender os mecanismos de interação entre elas (KULAH et al., 2007; WEN et al., 2002; BUZELLO et al., 2003). Knowles et al., 2000, estudando camundongos deficientes em óxido nítrico sintase endotelial e em apoE observaram, em 4 meses, diminuição no peso dos rins, aumento da creatinina plasmática, e um aumento do número de glomérulos com depósitos de lipídios, porém não explicaram o mecanismo envolvido nesse processo.

Um modelo experimental usado para estudo de doenças renais crônicas é o de isquemia e reperfusão, onde se realiza a obstrução da via arterial do rim. Após o retorno do fluxo sanguíneo para o parênquima renal ocorre o desencadeamento de uma gama de eventos fisiopatológicos, caracterizados pela produção de espécies reativas de oxigênio, infiltrado de células inflamatórias, produção de citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas (MOLITORIS, 1991).

6 CONCLUSÃO

Muito se especula a respeito dos anticorpos na aterosclerose. Sugere-se que seu efeito ateroprotetor deve-se principalmente a classe ou subclasse a qual ele pertence (SCHIOPU et al., 2004).

Concluimos que a imunização com oxLDL aumenta as classes e subclasses dos anticorpos anti-oxLDL estudadas, porém aumenta apenas os anticorpos IgG e IgG₁ anti-pepD. Por termos tido um pequeno número de animais para análise das lesões ateroscleróticas não podemos dizer qual a correlação destes anticorpos com a aterogênese.

Além disso, concluimos também, que a I/R pode agravar os fatores promotores da aterosclerose, sendo que a imunização com oxLDL não é capaz de reverter estes efeitos pro-aterogênicos.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Saúde Brasil 2007:** Uma análise da Situação de Saúde: Perfil de Mortalidade do Brasileiro. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/coletiva_saude_061008.pdf. 5 jan. 2010.

ALLAIN, C. C.; POON, L. S.; CHAN, C. S.; RICHMOND, W.; FU, P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clin. Chem.**, v. 20, n. 4, p. 470-475, 1974.

AMENTO, E. P.; EHSANI, N.; PALMER, H.; LIBBY, P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. **Arterioscler. Thromb.**, v. 11, n. 5, p. 1223-1230, 1991.

ANDERSON, K. M.; CASTELLI, W. P.; LEVY, D. Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the Framingham study. **JAMA**, v. 257, n. 16, p. 2176-2180, 1987.

ASCER, E.; BERTOLAMI, M. C.; VENTURINELLI, M. L.; BUCCHERI, V.; SOUZA, J.; NICOLAU, J. C.; RAMIRES, J. A.; SERRANO, C. V. JR. Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. **Atherosclerosis**, v.177, n. 1, p. 161-166, 2004.

BACHEM, M. G.; WENDELIN, D.; SCHNEIDERHAN, W.; HAUG, C.; ZORN, U.; GROSS, H. J.; SCHMID-KOTSAS, A.; GRÜNERT, A. Depending on their concentration oxidized low density lipoproteins stimulate extracellular matrix synthesis or induce apoptosis in human coronary artery smooth muscle cells. **Clin. Chem. Lab. Med.** v. 37, n. 3, p. 319-326, 1999.

BAGGIO, B.; BUDAKOVIC, A.; CASARA, D.; GAMBARO, G.; SALADINI, G.; PICCOLI, A.; VERLATO, F. Renal involvement in subjects with peripheral atherosclerosis. **J. Nephrol.**, v. 14, n. 4, p. 286–292, 2001.

BARRETO, S. M., PASSOS, V. M.; CARDOSO, A. R.; LIMA-COSTA, M. F. Quantifying the risk of coronary artery disease in a community: the Bambui project. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 81, n. 8, p. 556-561, 2003.

BERLINER, J. A.; TERRITO, M. C.; SEVANIAN, A.; RAMIN, S.; KIM, J. A.; BAMSHAD, B.; ESTERSON, M.; FOGELMAN, A. M. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. **J. Clin. Invest.**, v. 85, n. 4, p. 1260-1266, 1990.

BINDER, C. J.; CHANG, M. K.; SHAW, P. X.; MILLER, Y. I.; HARTVIGSEN, K; DEWAN, A; WITZTUM, J. L. Innate and acquired immunity in atherogenesis. **Nat. Med.**, v. 8, n. 11, p. 1218-1226, 2002.

BINDER, C. J.; HÖRKKÖ, S.; DEWAN, A.; CHANG, M. K.; KIEU, E. P.; GOODYEAR, C. S.; SHAW, P. X.; PALINSKI, W.; WITZTUM, J. L.; SILVERMAN, G. J. Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. **Nat. Med.**, v. 9, n. 6, p. 736-743, 2003.

BOSCHCOV, P.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A.; GIDLUND, M. Development of a peptide-based ELISA for the detection of antibodies against oxidized low density lipoprotein (oxLDL). **Atherosclerosis**, v. 151, n. 1, p. 224, 2000.

BRESLOW, J. L. Mouse models of atherosclerosis. **Science**, v. 272, n. 5262, p. 685-688, 1996.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, v.232, p.34-47, 1986.

BROWN, M. S.; KOVANEN, P. T.; GOLDSTEIN, J. L. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. **Science**, v. 212, n. 4495, p. 628-635, 1981.

BUZELLO, M.; TÖRNIG, J.; FAULHABER, J.; EHMKE, H.; RITZ, E.; AMANN, K. The apolipoprotein e knockout mouse: a model documenting accelerated atherogenesis in uremia. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 14, n. 2, p. 311-316, 2003.

CANTO, J. G.; GOLDBERG, R. J.; HAND, M. M.; BONOW, R. O.; SOPKO, G.; PEPINE, C. J.; LONG, T. Symptom presentation of women with acute coronary syndromes: myth vs reality. **Arch. Intern. Med.**, v. 167, n. 22, p. 2405-2413, 2007.

CARR, A. C., MCCALL, M. R.; FREI, B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, p. 1716-1723, 2000.

CAZITA, P. M.; BERTI, J. A.; AOKI, C.; GIDLUND, M.; HARADA, L. M.; NUNES, V. S.; QUINTÃO, E. C.; OLIVEIRA, H. C. Cholesteryl ester transfer protein expression attenuates atherosclerosis in ovariectomized mice. **J. Lipid. Res.**, v. 44, n. 1, p. 33-40, 2003.

CHANG, M. K.; BERGMARK, C.; LAURILA, A.; HÖRKKÖ, S.; HAN, K. H.; FRIEDMAN, P.; DENNIS, E. A.; WITZTUM, J. L. Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, n. 11, p. 6353-6358, 1999.

CHAPPEY, B., MYARA, I.; BENOIT, M. O.; MAZIÈRE, C.; MAZIÈRE, J. C.; MOATTI, N. Characteristics of ten charge-differing subfractions isolated from human native low density lipoprotein (LDL). No evidence of peroxidative modifications. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1259, n. 3, p. 261-70, 1995.

CHEN, K.; THOMAS, S. R.; KEANEY, J. F. JR. Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 35, n. 2, p. 117-132, 2003.

CHYU, K. Y.; ZHAO, X.; REYES, O. S.; BABBIDGE, S. M.; DIMAYUGA, P. C.; YANO, J.; CERCEK, B.; FREDRIKSON, G. N.; NILSSON, J.; SHAH, P. K. Immunization using an Apo B-100 related epitope reduces atherosclerosis and plaque inflammation in hypercholesterolemic apo E (-/-) mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 338, n. 4, p. 1982-1989, 2005.

DAMASCENO, N. R.; GIDLUND, M. A.; GOTO, H.; DIAS, C. T.; OKAWABATA, F. S.; ABDALLA, D. S. Casein and soy protein isolate in experimental atherosclerosis: influence on hyperlipidemia and lipoprotein oxidation. **Ann. Nutr. Metab.**, v. 45, n. 1, p. 38-46, 2001.

DAMASCENO, N. R.; GOTO, H.; RODRIGUES, F. M.; DIAS, C. T.; OKAWABATA, F. S.; ABDALLA, D. S.; GIDLUND M. Soy protein isolate reduces the oxidizability of LDL and the generation of oxidized LDL autoantibodies in rabbits with diet-induced atherosclerosis. **J. Nutr.**, v. 130, n. 11, p. 2641-7, 2000.

DONMA, M. M., DONMA, O. Apolipoproteins: Biochemistry, methods and clinical significance. **Biochem. Educ.**, v. 17, p. 63-68, 1989.

ENDEMANN, G.; STANTON, L. W.; MADDEN, K. S.; BRYANT, C. M.; WHITE, R. T.; PROTTER, A. A. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 16, p. 11811-11816.

ESTERBAUER, H.; GEBICKI, J.; PUHL, H.; JÜRGENS, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 13, n. 4, p. 341-390, 1992.

ESTERBAUER, H.; WÄG, G.; PUHL, H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. **Br. Med. Bull.**, v. 49, n. 3, p. 566-76, 1993.

FEINGOLD, K. R.; GRUNFELD, C. Role of cytokines in inducing hyperlipidemia. **Diabetes**, v. 41, p. 97-101, 1992, Suppl 2.

FERNVIK, E. C.; KETELHUTH, D. F.; RUSSO, M.; GIDLUND M. The autoantibody repertoire against copper- or macrophage-modified LDL differs in normolipidemics and hypercholesterolemic patients. **J. Clin. Immunol.**, v. 24, n. 2, p. 170-176, 2004.

FOLEY, R. N.; PARFREY, P.; SAMAK, M. J. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal failure. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 32, S112-S119, 1998.

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clin. Chem.**, v. 28, n. 10, p. 2077-2080, 1982.

FRANCESCHINI, G. Apolipoprotein function in health and disease: insights from natural mutations. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 26, n. 9, p. 733-746, 1996.

FREDRIKSON, G. N.; SÖDERBERG, I.; LINDHOLM, M.; DIMAYUGA, P.; CHYU, K. Y.; SHAH, P. K.; NILSSON, J. Inhibition of atherosclerosis in apoE-null mice by immunization with apoB-100 peptide sequences. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 23, n. 5, p. 879-884, 2003.

FREIGANG, S.; HÖRKKÖ, S.; MILLER, E.; WITZTUM, J. L.; PALINSKI, W. Immunization of LDL receptor-deficient mice with homologous malondialdehyde-modified and native LDL reduces progression of atherosclerosis by mechanisms other than induction of high titers of antibodies to oxidative neoepitopes. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 18, n. 12, p. 1972-1982, 1998.

FRIEDEWALD, J. J.; RABB, H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. **Kidney Int.**, v. 66, n. 2, p. 486-491, 2004.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of the low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

FRIED, L. P.; KRONMAL, R. A.; NEWMAN, A. B.; BILD, D. E.; MITTELMARK, M. B.; POLAK, J. F.; ROBBINS, J. A.; GARDIN, J. M. Risk factors for 5-year mortality in older adults: the Cardiovascular Health Study. **JAMA**, v. 279, n. 8, p. 585-592, 1998.

FROSTEGÅRD, J.; KJELLMAN, B.; GIDLUND, M.; ANDERSSON, B.; JINDAL, S.; KIESSLING, R. Induction of heat shock protein in monocytic cells by oxidized low density lipoprotein. **Atherosclerosis**, v. 121, n. 1, p. 93-103, 1996.

FROSTEGÅRD, J.; WU, R.; GISCOMBE, R.; HOLM, G.; LEFVERT, A. K.; NILSSON, J. Induction of T-cell activation by oxidized low density lipoprotein. **Arterioscler. Thromb.**, v. 12, n. 4, p. 461-467, 1992.

FRUCHART, J. C.; NIERMAN, M. C.; STROES, E. S.; KASTELEIN, J. J.; DURIEZ, P. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. **Circulation**, v. 109, n. 23, p. III15-19, 2004. Suppl 1.

FRY, D. L.; CORNHILL, J. F.; SHARMA, H.; PAP, J.M.; MITSCHELEN, J. Uptake of low density lipoprotein, albumin, and water by deendothelialized in vitro minipig aorta. **Arteriosclerosis**, v.6, n. 5, p. 475-490.

GEORGE, J.; AFEK, A.; GILBURD, B.; LEVKOVITZ, H.; SHAISH, A.; GOLDBERG, I.; KOPOLOVIC, Y.; WICK, G.; SHOENFELD, Y.; HARATS, D. Hyperimmunization of apo-E-deficient mice with homologous malondialdehyde low-density lipoprotein suppresses early atherogenesis. **Atherosclerosis**, v. 138, n. 1, p. 147-152, 1998.

GEORGE, J.; SHOENFELD, Y.; AFEK, A.; GILBURD, B.; KEREN, P.; SHAISH, A.; KOPOLOVIC, J.; WICK, G.; HARATS, D. Enhanced fatty streak formation in C57BL/6J mice by immunization with heat shock protein-65. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, n. 3, p. 505-510, 1999.

GIDLUND, M.; DAMASCENO, N. R.; LINDOSO, J. A.; ABDALLA, D. S.; GOTO, H. Monoclonal antibodies against low density lipoprotein with various degrees of oxidative modifications. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, n. 12, p. 1625-1628, 1996.

GLASS, C. K.; WITZTUM, J. L. Atherosclerosis. the road ahead. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 503-516, 2001.

GO, A. S.; CHERTOW, G. M.; FAN, D.; MCCULLOCH, C. E.; HSU, C. Y. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. **N. Engl. J. Med.**, v. 351, n. 13, p. 1296-1305, 2004 Published erratum appears in: **N Engl J Med.**, v. 18, n. 4, p. 4, 2008 .

HACKAM, D. G.; ANAND, S.S. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. **JAMA**, v. 290, n. 7, p. 932-940, 2003.

HANSSON, G. K.; BONDJERS, G.; NILSSON, L. A. Plasma protein accumulation in injured endothelial cells. Immunofluorescent localization of IgG and fibrinogen in the rabbit aortic endothelium. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 30, n. 1, p. 12-26, 1979.

HANSSON, G. K.; LIBBY, P.; SCHÖNBECK, U.; YAN, Z. Q. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. **Circ. Res.**, v. 91, n. 4, p. 281-291, 2002.

HANSSON, G. K.; HELLSTRAND, M.; RYMO, L.; RUBBIA, L.; GABBIANI, G. Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells. **J. Exp. Med.**, v. 170, n. 5, p. 1595-1608, 1989.

HARA, H.; YOKOYAMA, S. Interaction of free apolipoproteins with macrophages. Formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 5, p. 3080-3086, 1991.

HARA, A.; TAKETOMI, T. Occurrence of sulfatide as a major glycosphingolipid in WHHL rabbit serum lipoproteins. **J. Biochem.**, v. 102, n. 1, p. 83-92. 1987.

HASSALL, D. G. Three probe flow cytometry of a human foam-cell forming macrophage. **Cytometry**, v. 13, n. 4, p. 381-388, 1992.

HAYEK, T.; OIKNINE, J.; BROOK, J. G.; AVIRAM, M. Increased plasma and lipoprotein lipid peroxidation in apo E-deficient mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 201, n. 3, p. 1567-1574, 1994.

HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochem. J.**, v. 265, n. 3, p. 621-636, 1990.

HOEG, J.M.; BREWER, H. B. JR. Human lipoprotein metabolism and the liver. **Prog. Liver Dis.**, v. 8, p. 51-64, 1986.

HOFKER, M. H.; VAN VLIJMEN, B. J.; HAVEKES, L. M. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 137, n. 1, p. 1-11, 1998.

HÖRKKÖ, S.; BINDER, C. J.; SHAW, P. X.; CHANG, M. K.; SILVERMAN, G.; PALINSKI, W.; WITZTUM, J. L. Immunological responses to oxidized LDL. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 28, n. 12, p. 1771–1779, 2000.

HÖRKKÖ, S.; BIRD, D. A.; MILLER, E.; ITABE, H.; LEITINGER, N.; SUBBANAGOUNDER, G.; BERLINER, J. A.; FRIEDMAN, P.; DENNIS, E. A.; CURTISS, L. K.; PALINSKI, W.; WITZTUM, J. L. Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of oxidized low-density lipoproteins. **J. Clin. Invest.**, v. 103, n. 1, p. 117-128, 1999.

HULTHE, J.; WIKLUND, O.; HURT-CAMEJO, E.; BONDJERS, G. Antibodies to oxidized LDL in relation to carotid atherosclerosis, cell adhesion molecules, and phospholipase A(2). **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, n. 2, p. 269-274, 2001.

ISHIBASHI, S.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L.; GERARD, R. D.; HAMMER, R. E.; HERZ, J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **J. Clin. Invest.**, v. 92, n. 2, p. 883-893, 1993.

JOHNSON, W. J.; MAHLBERG, F. H.; ROTHBLAT, G. H.; PHILLIPS, M. C. Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1085, n. 3, p. 273-298, 1991.

KEANEY, J. F., Jr. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. **Mol. Aspects Med.**, v. 21, n. 4-5, p. 99-166, 2000.

KETELHUTH, D. F.; TONINI, G. C.; CARVALHO, M. D.; RAMOS, R. F.; BOSCHCOV, P.; GIDLUND M. Autoantibody response to chromatographic fractions from oxidized LDL in unstable angina patients and healthy controls. **Scand. J. Immunol.**, v. 68, n. 4, p. 456-462, 2008.

KHALLOU-LASCHET, J.; TUPIN, E.; CALIGIURI, G.; POIRIER, B.; THIEBLEMONT N.; GASTON, A. T.; VANDAELE, M.; BLETON, J.; TCHAPLA, A.; KAVERI, S. V.; RUDLING, M.; NICOLETTI A. Atheroprotective effect of adjuvants in apolipoprotein E knockout mice. **Atherosclerosis**, v. 184, n. 2, p. 330-341, 2006.

KHOO, J. C.; MILLER, E.; MCLOUGHLIN, P.; STEINBERG, D. Enhanced macrophages uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. **Atherosclerosis**, v. 8, n. 4, p. 348-358, 1988

KIM, J. A.; TERRITO, M. C.; WAYNER, E.; CARLOS, T. M.; PARHAMI, F.; SMITH, C. W.; HABERLAND, M. E.; FOGELMAN, A. M.; BERLINER, J. A. Partial characterization of leukocyte binding molecules on endothelial cells induced by minimally oxidized LDL. **Arterioscler. Thromb.**, v. 14, n. 3, p. 427-433, 1994.

KLOUCHE, M.; GOTTSCHLING, S.; GERL, V.; HELL, W.; HUSMANN, M.; DORWEILER, B.; MESSNER, M.; BHAKDI, S. Atherogenic properties of enzymatically degraded LDL: selective induction of MCP-1 and cytotoxic effects on human macrophages. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 18, n. 9, p. 1376-1385, 1998.

KLOUCHE, M.; ROSE-JOHN, S.; SCHMIEDT, W.; BHAKDI, S. Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation. **Circulation**, v. 101, n. 15, p. 1799-1805, 2000.

KNOWLES, J. W.; REDDICK, R. L.; JENNETTE, J. C.; SHESELY, E. G.; SMITHIES, O.; MAEDA, N. Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-) Apoe(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 4, p. 451-458, 2000.

KORSTANJE, R.; LI, R.; HOWARD, T.; KELMENSEN, P.; MARSHALL, J.; PAIGEN, B.; CHURCHILL, G. Influence of sex and diet on quantitative trait loci for HDL cholesterol levels in an SM/J by NZB/BINJ intercross population. **J. Lipid. Res.**, v. 45, n. 5, p. 881-888, 2004.

KULAH, E.; TASCILAR, O.; ACIKGOZ, S.; TEKIN, I. O.; KARADENIZ, G.; CAN, M.; GUN, B.; BARUT, F.; COMERT, M. Oxidized LDL accumulation in experimental renal ischemia reperfusion injury model. **Ren. Fail.**, v. 29, n. 4, p. 409-415, 2007.

LEE, R. T.; LIBBY, P. The unstable atheroma **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 17, n. 10, p. 1859-1867, 1997.

LEWIS, M. J.; MALIK, T. H.; EHRENSTEIN, M. R.; BOYLE, J. J.; BOTTO, M.; HASKARD, D. O. Immunoglobulin M is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Circulation**, v. 120, n. 5, p. 417-426, 2009.

LIBBY, P. Changing concepts of atherogenesis. **J. Intern. Med.**, v. 247, n. 3, p. 349-358, 2000.

LINDBLAD, E. B. Aluminium adjuvants--in retrospect and prospect. **Vaccine**, v. 22, n. 27-28, p. 3658-3668, 2004.

LONGENECKER, J. C.; CORESH, J.; POWE, N. R.; LEVEY, A. S.; FINK, N. E.; MARTIN, A.; KLAG, M. J. Traditional cardiovascular disease risk factors in dialysis patients compared with the general population: the CHOICE Study. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 13, n. 7, p. 1918-1927, 2002.

LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, p. 233-241, 2000.

MACH, F.; SCHÖNBECK, U.; BONNEFOY, J. Y.; POBER, J. S.; LIBBY, P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. **Circulation**, v. 96, n. 2, p. 396-399, 1997.

MAHLEY, R. W.; HUANG, Y. Apolipoprotein E: From atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 10, n. 3, p. 207–217, 1999.

MEYRIER, A.; HILL, G. S.; SIMON, P. Ischemic renal diseases: new insights into old entities. **Kidney Int.**, v. 54, n. 1, p. 2–13, 1998.

MITCHELL, T. C.; HILDEMAN, D.; KEDL, R. M.; TEAGUE, T. K.; SCHAEFER, B. C.; WHITE, J.; ZHU, Y.; KAPPLER, J.; MARRACK, P. Immunological adjuvants promote activated T cell survival via induction of Bcl-3. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 5, p. 397–402. 2001.

MOLITORIS, B. A. New insights into the cell biology of ischemic acute renal failure. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 1, n. 12, p. 1263–1270, 1991.

MUNRO, J. M. E. COTRAN, R. S. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. **Lab. Invest.**, v. 58, n. 3, p. 249–261, 1988.

NAGHAVI, M.; LIBBY, P.; FALK, E.; CASSCELLS, S. W.; LITOVSKY, S.; RUMBERGER, J.; BADIMON, J. J.; STEFANADIS, C.; MORENO, P.; PASTERKAMP, G.; FAYAD, Z.; STONE, P. H.; WAXMAN, S.; RAGGI, P.; MADJID, M.; ZARRABI, A.; BURKE, A.; YUAN, C.; FITZGERALD, P. J.; SISCOVICK, D. S.; DE KORTE, C. L.; AIKAWA, M.; AIRAKSINEN, K. E.; ASSMANN, G.; BECKER, C. R.; CHESEBRO, J. H.; FARB, A.; GALIS, Z. S.; JACKSON, C.; JANG, I. K.; KOENIG, W.; LODDER, R. A.; MARCH, K.; DEMIROVIC, J.; NAVAB, M.; PRIORI, S. G.; REKHTER, M. D.; BAHR, R.; GRUNDY, S. M.; MEHRAN, R.; COLOMBO, A.; BOERWINKLE, E.; BALLANTYNE, C.; INSULL, W. JR.; SCHWARTZ, R. S.; VOGEL, R.; SERRUYS, P. W.; HANSSON, G. K.; FAXON, D. P.; KAUL, S.; DREXLER, H.; GREENLAND, P.; MULLER, J. E.; VIRMANI, R.; RIDKER, P. M.; ZIPES, D. P.; SHAH, P. K.; WILLERSON, J. T. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. **Circulation**, v. 108, n. 14, p. 1664–1672, 2003.

NILSSON, J.; HANSSON, G. K.; SHAH, P. K. Immunomodulation of atherosclerosis: implications for vaccine development. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 25, n. 1, p. 18–28, 2005.

NONOGAKI, K.; MOSER, A. H.; PAN, X. M.; STAPRANS, I.; GRUNFELD, C.; FEINGOLD, K. R. Lipoteichoic acid stimulates lipolysis and hepatic triglyceride secretion in rats in vivo. **J Lipid Res.**, v. 36, n. 9, p. 1987–1995, 1995.

PAIGEN, B.; MORROW, A.; HOLMES, P. A.; MITCHELL, D.; WILLIAMS, R. A. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. **Atherosclerosis**, v. 68, n. 3, p. 231–240, 1987.

PALINSKI, W.; HÖRKKÖ, S.; MILLER, E.; STEINBRECHER, U. P.; POWELL, H. C.; CURTISS, L. K.; WITZTUM, J. L. Cloning of monoclonal antibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma. **J. Clin. Invest.**, v. 98, n. 3, p. 800–814, 1996.

PARKE, A. L.; LIU, P. T.; PARKE, D. V. Multiple organ dysfunction syndrome. **Inflammopharmacology**, v. 11, n. 1, p. 87–95, 2003.

PELUZIO, M. C.; MIGUEL, E. J.; DRUMOND, T. C.; CESAR, G. C.; SANTIAGO, H. C.; TEIXEIRA, M. M.; VIEIRA, E. C.; ARANTES, R. M.; ALVAREZ-LEITE, J. I. Monocyte chemoattractant protein-1 involvement in the α -tocopherol-induced reduction of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. **Br. J. Nutr.**, v. 90, n. 1, p. 3-11, 2003.

PELUZIO, M. C.; HOMEM, A. P.; CESAR, G. C.; AZEVEDO, G. S.; AMORIM, R.; CARA, D. C.; SALIBA, H.; VIEIRA, E. C.; ARANTES, R. E.; ALVAREZ-LEITE, J. Influences of alpha-tocopherol on cholesterol metabolism and fatty streak development in apolipoprotein E-deficient mice fed an atherogenic diet. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, n. 12, p.1539-1545, 2001.

PENTIKAINEN, M. O.; OÖRNI, K.; ALA-KORPELA, M.; KOVANEN, P.T. Modified LDL - trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima. **J. Intern. Med.**, v. 247, p. 359, 2000.

PIEDRAHITA, J. A.; ZHANG, S. H.; HAGAMAN, J. R.; OLIVER, P. M.; MAEDA, N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 89, n. 10, p. 4471-4475, 1992.

PLUMP, A. S.; SMITH, J. D.; HAYEK, T.; AALTO-SETALA, K.; WALSH, A.; VERSTUYFT, J. G.; RUBIN, E. M.; BRESLOW, J. L. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**, v. 71, n. 2, p. 343–353, 1992.

PORTUGAL, L. R.; FERNANDES, L. R.; CESAR, G. C.; SANTIAGO, H. C.; OLIVEIRA, D. R.; SILVA, N. M.; SILVA, A. A.; LANNES-VIEIRA, J.; ARANTES, R. M.; GAZZINELLI, R. T.; ALVAREZ-LEITE, J. I. Infection with *Toxoplasma gondii* increases atherosclerotic lesion in ApoE-deficient mice. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 3571-3576, 2004.

QUINN, M. T.; PARTHASARATHY, S.; FONG, L. G.; STEINBERG, D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 84, n. 9, p. 2995-2998, 1987.

RIDKER, P. M.; DANIELSON, E.; FONSECA, F. A.; GENEST, J.; GOTTO, A. M. JR.; KASTELEIN, J. J.; KOENIG, W.; LIBBY, P.; LORENZATTI, A. J.; MACFADYEN, J. G.; NORDESTGAARD, B. G.; SHEPHERD, J.; WILLERSON, J. T.; GLYNN, R. J.; JUPITER Study Group. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. **N. Engl. J. Med.**, v. 359, n. 21, p. 2195-2207, 2008.

ROSS, R.; GLOMSET, J. A. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. **Science**, v. 29, n. 93, p. 1332- 1339, 1973

RUBIN, E. M.; KRAUSS, R. M.; SPANGLER, E. A.; VERSTUYFT, J. G.; CLIFT, S. M. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. **Nature**, v. 353, n. 6341, p. 265-267, 1991.

SANTOS DR. III Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretrizes de Prevenção da Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 77, p. 1-48, 2001, Supl. 3.

SCHULTE, S.; SUKHOVA, G. K.; LIBBY, P. Genetically programmed biases in Th1 and Th2 immune responses modulate atherogenesis. **Am. J. Pathol.**, v. 172, n. 6, p. 1500-1508, 2008.

SCHIOPU, A.; BENGTSSON, J.; SÖDERBERG, I.; JANCIAUSKIENE, S.; LINDGREN, S.; ARES, M. P.; SHAH, P. K.; CARLSSON, R.; NILSSON, J.; FREDRIKSON, G. N. Recombinant human antibodies against aldehyde-modified apolipoprotein B-100 peptide sequences inhibit atherosclerosis **Circulation**. v. 110, n. 14, p. 2047-2052, 2004.

SHAW, L. J.; BAIREY MERZ, C. N.; PEPINE, C. J.; REIS, S. E.; BITTNER, V.; KELSEY, S. F.; OLSON, M.; JOHNSON, B. D.; MANKAD, S.; SHARAF, B. L.; ROGERS, W. J.; WESSEL, T. R.; ARANT, C. B.; POHOST, G. M.; LERMAN, A.; QUYYUMI, A. A.; SOPKO, G.; WISE INVESTIGATORS. Insights from the NHLBI-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) Study: Part I: gender differences in traditional and novel risk factors, symptom evaluation, and gender-optimized diagnostic strategies. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 47, n. 3, p. S4-S20, 2006. Suppl.

SHAW, P. X.; HÖRKKÖ, S.; CHANG, M. K.; CURTISS, L. K.; PALINSKI, W.; SILVERMAN, G. J.; WITZTUM, J. L. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 12, p. 1731–1740, 2000.

SHAW, P. X.; HORKKO, S.; TSIMIKAS, S.; CHANG, M. K.; PALINSKI, W.; SILVERMAN, G. J.; WITZTUM, J. L. Human-derived anti-oxidized LDL autoantibody blocks uptake of oxidized LDL by macrophages and localizes to atherosclerotic lesions in vivo. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, n. 8, p. 1333-1339, 2001.

SHOENFELD, Y.; SHERER, Y.; GEORGE, J.; HARATS, D. Autoantibodies associated with atherosclerosis. **Ann. Med.**, v. 32, p. 37–40, 2000. Suppl. 1.

SHOJI, T.; NISHIZAWA, Y.; FUKUMOTO, M.; SHIMAMURA, K.; KIMURA, J.; KANDA, H.; EMOTO, M.; KAWAGISHI, T.; MORII, H. Inverse relationship between circulating oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and anti-oxLDL antibody levels in healthy subjects. **Atherosclerosis**, v. 148, n. 1, p. 171-177, 2000.

SIEMS, W.; QUAST, S.; CARLUCCIO, F.; WISWEDEL, I.; HIRSCH, D.; AUGUSTIN, W.; HAMPI, H.; RIEHLE, M.; SOMMERBURG, O. Oxidative stress in chronic renal failure as a cardiovascular risk factor. **Clin. Nephrol.**, v. 58, p. S12-S19, 2002. Suppl 1.

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.**, v. 320, n. 14, p. 915-924, 1989.

STEINBERG, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 34, p. 20963-20966, 1997.

SVENSJÖ, E.; BOSCHCOV, P.; KETELHUTH, D. F.; JANCAR, S.; GIDLUND, M. Increased microvascular permeability in the hamster cheek pouch induced by oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and some fragmented apolipoprotein B proteins. **Inflamm. Res.**, v. 52, n. 5, p. 215-220, 2003.

TEXTOR, S.C. Ischemic nephropathy: where are we now? **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 15, n. 8, p. 1974–1982, 2004.

VANDERLAAN, A. P.; REARDON, A. C.; GETZ, S. G. Site specificity of atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 24, n. 1, p. 12-22, 2004.

VENIANT, M. M.; WITHYCOMBE, S.; YOUNG, S.G. Lipoprotein size and atherosclerosis susceptibility in Apoe(-/-) and Ldlr(-/-) mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, n. 10, p. 1567-1570, 2001.

VESSBY, B.; GUSTAFSON, S.; CHAPMAN, M. J.; HELLSING, K.; LITHELL, H. Lipoprotein composition of human suction-blister interstitial fluid. **J. Lipid. Res.**, v. 28, n. 6, p. 629-641, 1987.

WEN, M.; SEGERER, S.; DANTAS, M.; BROWN, P. A.; HUDKINS, K. L.; GOODPASTER, T.; KIRK, E.; LEBOEUF, R.C.; ALPERS, C.E. Renal injury in apolipoprotein E-deficient mice **Lab. Invest.**, v. 82, n. 8, p. 999-1006, 2002.

WILLIAMS, K. J.; TABAS, I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 15, n. 5, p. 551-561, 1995.

WITZTUM, J. L.; STEINBERG, D. Role of oxidized low protein in atherosclerosis. **The J. Clin. Invest.**, v. 88, n. 6, p. 1785-1792, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Cardiovascular diseases. Available from: <http://www.who.int/cardiovascular diseases>. Cited from: 10 oct. 2006.

XU, Q.; DIETRICH, H.; STEINER, H. J.; GOWN, A. M.; SCHOEL, B.; MIKUZ, G.; KAUFMANN, S. H.; WICK, G. Induction of arteriosclerosis in normocholesterolemic rabbits by immunization with heat shock protein 65. **Arterioscler. Thromb.**, v. 12, n. 7, p. 789-799, 1992.

ZARATIN, A.; GIDLUND, M.; BOSCHCOV, P.; CASTILHO, L.; DE FARIA, E. C. Antibodies against oxidized low-density lipoprotein in normolipidemic smokers. **Am. J. Cardiol.**, v. 90, n. 6, p. 651-653, 2002.

ZHOU, X.; CALIGIURI, G.; HAMSTEN, A.; LEFVERT, A. K.; HANSSON, G. K. LDL immunization induces T-cell-dependent antibody formation and protection against atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, n. 1, p. 108-114, 2001.

ZHOU, X.; HANSSON, G. K. Detection of B cells and proinflammatory cytokines in atherosclerotic plaques of hypercholesterolaemic apolipoprotein E knockout mice. **Scand. J. Immunol.**, v. 50, n. 1, p. 25-30, 1999.