RAFAEL CARDOSO TRENTIN

Anticorpos contra Lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL) e peptídeo da apolipoproteína B apoB (apoBD) como possível marcador no acompanhamento da eficácia do tratamento com Rosuvastatina em pacientes hipercolesterolêmicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

São Paulo
2013

RAFAEL CARDOSO TRENTIN

Anticorpos contra Lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL) e peptídeo da apolipoproteína B apoB (apoBD) como possível marcador no acompanhamento da eficácia do tratamento com Rosuvastatina em pacientes hipercolesterolêmicos

Dissertação apresentada ao Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Magnus Ake Gidlund

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Trentin, Rafael Cardoso.

Anticorpos contra Lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL) e peptídeo da apolipoproteína B apoB (apoBD) como possível marcador no acompanhamento da eficácia do tratamento com Rosuvastatina em pacientes hipercolesterolêmicos / Rafael Cardoso Trentin. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Magnus Ake Gidlund.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Auto-anticorpos na aterosclerose.

Versão do título para o inglês: Auto-antibodies against oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and apoB peptide of apolipoprotein B (apoBD) as possible marker for monitoring effectiveness of Rosuvastatin treatment on hypercholesterolemic patients.

1. Aterosclerose 2. Hipercolesterolemia - (Diagnóstico; Terapia) 3. Lipoproteínas LDL 4. Auto-anticorpos 5. Peptídeos 6. Biomarcador I. Gidlund, Prof. Dr. Magnus Ake II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0110/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rafael Cardoso Trentin.

Título da Dissertação: Anticorpos contra Lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL) e peptídeo da apolipoproteína B apoB (apoBD) como possível marcador no acompanhamento da eficácia do tratamento com Rosuvastatina em pacientes hipercolesterolêmicos.

Orientador(a): Prof. Dr. Magnus Ake Gidlund.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

À minha mãe por todo seu amor,
apoio e dedicação. Sem você seria
impossível chegar até aqui.

À Deus por ter
sido referência de meu caminho.

Às dificuldades do caminho,
pois elas eram o reflexo do que
eu necessitava para aprender

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Imunofisiopatologia do Instituto de Ciências Biomédicas pelo inestimável auxílio e convivência.

Ao professor Magnus Ake Gidlund pela confiança, amizade e apoio para conseguir trilhar este caminho.

Àqueles que pertencem ou já pertenceram ao laboratório de imunofisiopatologia: Ronald, Andrea, Francisco, Gabriella, Eduardo, Henrique, Gustavo ... pelo convívio e referência de direção que sempre me passaram.

À Silvana Aparecida da Silva pelo apoio, amizade e pelo grande esforço para que meus experimentos fossem realizados da melhor maneira possível.

A Clínica e laboratório do Dr. Elia Ascer, pelo trabalho e material necessário à confecção deste trabalho.

À Dayane Maciel Picolotto pelo companheirismo e apoio em todos os momentos.

Aos amigos e professores pela dedicação e incentivo, convívio e amizade.

“Embora ninguém possa voltar atrás
e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora
e fazer um novo fim.”

Chico Xavier

RESUMO

TRENTIN, R. C. **Anticorpos contra Lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL) e peptídeo da apolipoproteína B apoB (apoBD) como possível marcador no acompanhamento da eficácia do tratamento com Rosuvastatina em pacientes hipercolesterolêmicos.** 2013. 66 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Embora as doenças cardiovasculares (DCV) tenham sido reduzidas drasticamente quanto à sua morbidade e mortalidade desde o advento de fármacos hipolipemiantes como as estatinas, indivíduos aparentemente saudáveis, sem dislipidemia evidente, são acometidos por repentinos ataques súbitos, como os derivados de tromboembolismo arterial. Deste modo, o foco de muitos grupos de pesquisa, foi alterado para as lipoproteínas modificadas, como a LDL oxidada (oxLDL) e para o processo imune envolvido no processo aterosclerótico. A aterosclerose é a patologia base das principais complicações cardiovasculares e o processo imunológico e inflamatório têm papel chave no desenvolvimento e progressão desta patologia. O processo imune está envolvido em todas as etapas da fisiopatologia da aterosclerose. Nesta dissertação, nós estudamos o efeito de um fármaco para redução de colesterol, a Rosuvastatina, sob pacientes hipercolesterolêmicos. A fim de estudar a eficácia da utilização de auto-anticorpos dirigidos para a LDL oxidada ou contra fragmentos peptídicos da apolipoproteína B (apoBD) como marcadores no acompanhamento da resposta ao tratamento farmacológico, realizamos um estudo prospectivo de 180 dias com administração da Rosuvastatina. Durante o intervalo do estudo, foi possível acompanhar 76 pacientes (Rosuvastatina, n=40 e controle, n=36) através de análises laboratoriais, que compreendem as seguintes variáveis: perfil lipídico (colesterol total, LDL, triglicérides e HDL), produto de oxidação lipídica (malondialdeído ou MDA), auto-anticorpos contra a oxLDL de dois isótipos (IgG e IgM) e auto-anticorpos IgG contra a apoBD. A partir dos resultados obtidos concluímos que em 180 dias de tratamento não houve alterações significativas no perfil lipídico decorrentes dos tratamentos; o tratamento controle resultou em redução significativa dos níveis circulantes de MDA; anticorpos IgM anti-oxLDL e IgG anti-apoBD foram sensíveis como marcadores e mostraram reduções significativas apenas nos pacientes tratados com Rosuvastatina; os níveis de anticorpos das classes IgM e IgG contra a oxLDL não são correlacionáveis; existe correlação diretamente proporcional entre anticorpos IgG anti-oxLDL e anti-apoBD; os níveis de LDL se correlacionam de forma inversamente proporcional aos níveis de anticorpos IgG anti-oxLDL e IgG anti-apoBD.

Palavras-chave : Aterosclerose. Hipercolesterolemia. Lipoproteína LDL. Estatina. Rosuvastatina. Auto-anticorpos. Peptídeo.

ABSTRACT

TRENTIN, R. C. **Auto-antibodies against oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and peptide of apolipoprotein B apoB (apoBD) as possible marker for monitoring effectiveness of Rosuvastatin treatment on hypercholesterolemic patients.** 2013. 66 f. Masters thesis (Imunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Although the mortality and morbidity rates of cardiovascular diseases (CVC) have been expressively reduced since the advent of lipid-lowering drugs such as statins, apparently healthy individuals with non-evident dyslipidemia are affected by sudden attacks, as derived from arterial thromboembolism. Consequently, the focus of several research groups has been amended to modified-lipoproteins, as oxidized low density lipoprotein (oxLDL), and to the immune process involved to arteriosclerosis. Arteriosclerosis represents the underlying disease of main cardiovascular problems and the immune and inflammatory process have a significant function in the development and progression of this disease. The immune process is involved in all the stages of the arteriosclerosis physiopathology. In this dissertation, we study the effect of a drug to reduce cholesterol, Rosuvastatin, in hypercholesterolemic patients. In order to study the effectiveness of using auto-antibodies to oxidized LDL or against peptide fragments of apolipoprotein B (apoBD) as markers in monitoring the response to drug treatment, we conducted a prospective study of 180 days with administration of rosuvastatin. During the study interval, it was possible to follow 76 patients (Rosuvastatin, n = 40 and control, n = 36) by laboratory analysis, which comprise the following variables: lipid profile (total cholesterol, LDL, triglycerides, and HDL), lipid oxidation product (malondialdehyde or MDA), autoantibodies against oxLDL two isotypes (IgG and IgM) and IgG autoantibodies against apoBD. From the results we conclude that in 180 days of treatment there was not significant changes in lipid profile caused by treatments; the control treatment resulted in significant reduction of circulating levels of MDA; IgM anti-oxLDL and IgG anti-apoBD were susceptible as markers and showed significant reductions only in patients treated with rosuvastatin; antibody levels of IgM and IgG against oxLDL are not correlated, there are directly proportional correlation between IgG anti-oxLDL and anti-apoBD; LDL levels correlate in an inversely proportional form with levels of IgG anti-oxLDL and IgG anti-apoBD.

Keywords: Atherosclerosis. Hypercholesterolemia. Lipoprotein LDL. Statin. Rosuvastatin. Auto-antibodies. Peptide.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Doenças Cardiovasculares	12
1.2	Fisiopatologia da Aterosclerose	13
1.3	Aterosclerose e Imunidade	15
1.4	Lipoproteína de Baixa Densidade Oxidada (oxLDL)	18
1.5	Auto-anticorpos na Aterosclerose	19
1.6	Hipercolesterolemia	20
1.7	Estatina: Tratamento Farmacológico	21
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivos Gerais	27
2.2	Objetivos Específicos	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Pacientes	29
3.2	Amostras	31
3.3	Perfil Lipídico	31
3.4	Deteção de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	32
3.5	Isolamento, Oxidação da LDL e Dosagem do Grau de Oxidação	33
3.6	Deteção de Auto-anticorpos IgG e IgM contra a oxLDL	33
3.7	Deteção de Auto-anticorpos contra PepD da ApoB (APOBD)	34
3.8	Estatística	35
4	RESULTADOS	36
4.1	Caracterização Inicial dos Pacientes	37
4.2	Perfil Lipídico	38
4.3	Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	42
4.4	Auto-anticorpos IgG contra a oxLDL	43
4.5	Auto-anticorpos IgM contra a oxLDL	45
4.6	Auto-anticorpos contra APOB-D	47
4.7	Correlações entre os anticorpos	49
4.8	Correlação entre LDL e anticorpos	51
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Cardiovasculares

As Doenças Cardiovasculares (DCV) são apontadas como a principal causa de morte no mundo. Em 2008, 17,3 milhões de pessoas morreram por DCV, o que representa aproximadamente 30% das mortes registradas neste período. Estes dados salientam a importância e preocupação global com estas patologias (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

Dentre as DCV, as mortes ocorrem principalmente por isquemia cardíaca e acidentes vasculares cerebrais. Estes desfechos perfazem mais de 70% das mortes por DCV no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007).

No Brasil, o perfil epidemiológico é semelhante, uma vez que as doenças cardiovasculares aparecem em primeiro lugar entre as causas de mortalidade, representando quase um terço dos óbitos totais e 65% do total de mortes na faixa etária de 30 a 69 anos de idade, atingindo a população adulta em plena fase produtiva (BRASIL, 2006).

Os ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais são geralmente eventos agudos causados principalmente por obstrução arterial. Esta obstrução impede o sangue de fluir para órgãos vitais, como coração e cérebro, o que resulta na isquemia destes. A razão mais comum deste evento é um processo conhecido como aterosclerose (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2011).

A aterosclerose é um processo inflamatório crônico de origem multifatorial que decorre das diversas formas de agressão endotelial, acometendo principalmente as artérias de médio e grande calibre, resultando em progressivo espessamento da parede arterial, devido ao acúmulo de lipídio, detritos e células inflamatórias (LIBBY, 2002).

Os estudos prospectivos apontam como principais fatores de risco para a aterosclerose, assim como para a cardiopatia isquêmica resultante, a idade, o gênero e a predisposição genética, classificados como fatores constitucionais. Entretanto, incluem-se fatores agravantes, que potencialmente respondem a mudanças, tais como: a dislipidemia, a hipertensão arterial, a obesidade, a composição da dieta, a inatividade física, o tabagismo e o *diabetes mellitus* (MOZZAFARIAN, 2008; PERK, 2009). Importante também, lembrarmos que em países sub-desenvolvidos fatores como a desnutrição e o alto índice de infecções são outros fatores agravantes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011, 2007).

A idade é um fator preditivo de risco cardiovascular, mas o processo aterosclerótico tem início precoce na vida, desenvolvimento lento e geralmente é assintomático por um longo período. Para reduzir a morbidade e mortalidade associada a DCV são necessárias intervenções, a longo prazo e de ação constante, no estilo de vida e quando necessário, combinadas com tratamento medicamentoso (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007).

Entretanto, apesar dos grandes avanços no tratamento de pacientes, um grande número de vítimas de DCV são indivíduos aparentemente saudáveis que morrem subitamente sem sintomas prévios, geralmente apresentando altos níveis de mediadores inflamatórios (ROSS, 1999).

1.2 Fisiopatologia da Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica e degenerativa que acomete principalmente a camada íntima das artérias de médio e grande calibre. O processo inflamatório, decorrente da agressão do endotélio, interage com fatores de risco metabólicos, resultando em progressivo espessamento da camada íntima arterial. Estes espessamento, conhecido como placa aterosclerótica ou ateroma, é composto pelo acúmulo de lipídios, células, detritos e elementos conectivos teciduais (HANSSON, 2005).

As várias formas de injúria do endotélio e do músculo liso na parede das artérias são resultado de uma excessiva resposta inflamatória fibroproliferativa. A função vasomotora, inflamação celular, migração e proliferação de células musculares lisas e trombogenicidade são interprocessos biológicos complexos, que contribuem para a aterogênese e manifestações clínicas da aterosclerose.

Estruturalmente, as lesões ateroscleróticas, da sua formação a seu desfecho, são divididas em quatro fases: disfunção do endotélio vascular; formação de estrias gordurosas; formação de cápsula fibrosa; e instabilidade da placa e ruptura (GOTTLIEB, 2005; ROSS, 1999).

Figura 1 – Progressão de lesão aterosclerótica

Eventos fisiopatológicos envolvidos na progressiva obstrução do espaço luminal arterial.
 Fonte: Ross, 1999.

A disfunção do endotélio (fig. 1-A) ocorre provavelmente por diversos fatores, como a retenção e modificação da lipoproteína de baixa densidade (mLDL), agentes infecciosos, tabagismo, hipertensão arterial, diabetes e alterações gênicas. Principalmente, por participação conjunta destes e de outros fatores (WITZTUM, 1991).

As estrias gordurosas (fig. 1-B), lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose, são compostas principalmente por células espumosas, as quais são resultados da captação não seletiva da mLDL por macrófagos. Estas células capturam a mLDL através de seus receptores scavenger (CD36) e o colesterol absorvido da captação da mLDL, que não for utilizado em seu metabolismo celular, irá se transformar em gotículas citosólicas, transformando-as em células espumosas (ROSS, 1999; WITZTUM, 1991).

Estas estrias gordurosas são prevalentes em pessoas jovens, são assintomáticas e podem progredir para uma lesão aterosclerótica com placa fibrosa ou simplesmente desaparecer.

A formação da placa fibrosa é resultante da progressiva migração de células musculares lisas para o local (fig. 1-C). Estas células são responsáveis pela deposição no tecido conjuntivo ao redor da estria gordurosa, de matriz extracelular rica em colágeno. Esta matriz de camada fibrosa, recobre o núcleo da lesão, o qual está repleto de células espumosas, lipídios extracelulares e material celular necrótico. O crescimento desta placa resulta em remodelamento vascular com progressivo estreitamento luminal, causando anormalidades no fluxo sanguíneo (; GOTTLIEB, 2005, ROSS, 1999).

Nos estágios mais tardios e avançados da lesão, a instabilidade da placa aterosclerótica, ou ateroma, pode levar a ruptura da mesma. Macrófagos e outros leucócitos produzem metaloproteínases e outras enzimas proteolíticas que degradam a matriz da placa rica em colágeno. Linfócitos T elaboram interferon gama (IFN-gama), que dificulta a proliferação de células musculares lisas e síntese de colágeno no tecido vascular. Assim, a inflamação contínua pode levar ao enfraquecimento desta placa fibrosa com conseqüente ruptura (fig. 1-D).

A ruptura da placa expõe material trombogênico, como fosfolípidos, fatores teciduais, moléculas da matriz fibrosa que são adesivas de plaquetas, e outros fatores pró-trombóticos e coagulantes liberados por leucócitos. A formação do trombo pode levar a obstrução parcial ou completa do vaso sanguíneo (HANSSON, 2005).

1.3 Aterosclerose e Imunidade

A injúria do endotélio altera a permeabilidade vascular. Assim, é importante percebermos o papel do acúmulo de lipídios na disfunção endotelial. Mediadores inflamatórios liberados, como TNF- α , IL-1 e CSF-M, aumentam a transcrição gênica do receptor de LDL no endotélio e conseqüentemente aumentam a captação de LDL. Processos oxidativos e enzimáticos modificam esta LDL, causando a exposição/liberação de diversos neo-epítomos, como fosfolípidos e fragmentos da apolipoproteína B-100. Estas transformações causam a imunogenicidade desta partícula (HANSSON, 2005). Portanto, a infiltração, retenção e modificação da LDL serve como “combustível” para a inflamação na lesão aterosclerótica.

Figura 2 – Aterogênese

Eventos imunofisiopatológicos iniciais para o desenvolvimento da placa aterosclerótica.
 Fonte: Adaptado de Hansson, Robertson, Södeberg-Nauclér (2006).

O aumento de permeabilidade vascular e a injúria do endotélio e de células da íntima, induzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão para monócitos e linfócitos (fig. 1-A). Entretanto, as plaquetas são as primeiras células a migrarem para o endotélio ativado, onde, através da ação de suas glicoproteínas (IB e IIb/IIIa), aumentam ainda mais a expressão de moléculas de adesão para outros leucócitos (ROSS, 1999).

Entre as moléculas de adesão expostas pelo endotélio ativado, destaca-se a proteína VCAM-1, uma molécula da superfamília das imunoglobulinas, que facilita o movimento de transpassagem endotelial (diapedese) dos monócitos e linfócitos. O movimento de leucócitos, através do endotélio para o espaço sub endotelial, é regulado por fatores quimiotáticos ou quimiocinas. Em modelos experimentais, bloqueio de certas moléculas de adesão e certas quimiocinas inibem a propagação da aterosclerose (HANSSON, 2005; LIBBY, 2002).

Este aumento de moléculas de adesão e de quimiocinas, como o fator estimulante de colônia para macrófagos (M-CSF), contribuem para que monócitos circulantes infiltrem a camada íntima do endotélio, diferenciando-se em macrófagos. Devido a fatores do meio, estes aumentam a sua expressão de receptores de reconhecimento padrão (PRR), dentre os quais, incluem-se os receptores do tipo “scavenger” (CD36) e os receptores do tipo “toll” (TLR). Os receptores “scavenger” reconhecem e levam a fagocitose/destruição de uma variedade de moléculas e partículas com padrão moleculares associado à patógenos (PAMP). A LDL oxidada (oxLDL), endotoxinas bacterianas e fragmentos de células apoptóticas são exemplos destas moléculas e partículas. Entretanto, os receptores TLR, se ligam a estes padrões moleculares e iniciam uma cascata de sinalização que resulta na ativação celular. Assim, macrófagos ativados liberam uma variedade de mediadores inflamatórios, citocinas, proteases, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS). Estes mediadores aumentam a progressão da lesão e também a instabilidade da placa.

Outros leucócitos e células endoteliais também possuem receptores TLR. Essa ativação conjunta resulta em amplificação do processo inflamatório, com maior disfunção endotelial, maior migração leucocitária e maior retenção e transformação de lipoproteínas (GLASS, 2003; HANSSON, 2005).

Como os macrófagos capturam a LDL modificada através de seus receptores scavenger (CD36), o colesterol absorvido da captação da oxLDL, que não for utilizado em seu metabolismo celular, irá se transformar em gotículas citosólicas, transformando-as em células espumosas (foam cells), célula prototípica da placa aterosclerótica (fig. 2). Linfócitos T também acumulam colesterol, mas em menor quantidade (HASSAL, 1994; WITZTUM, 1991).

A ação de linfócitos, que estão sempre presentes na lesão aterosclerótica, tem papel chave dentro da imunidade adaptativa, na progressão da doença, quer seja por efeitos pró-inflamatórios, quer seja por efeitos reguladores (GLASS, 2003). O subtipo mais abundante é o CD4+, o qual reconhece antígenos associados ao MHCII apresentados por células apresentadoras de antígenos. Existem linfócitos CD4+ reativos contra oxLDL, proteína de choque térmico 60, entre outros antígenos. Linfócitos CD8+ atuam também neste processo. Estes podem reconhecer antígenos virais e células alteradas e através de efeitos citotóxicos podem participar na

inviabilidade celular e necrose de células dentro da lesão, através de citotoxicidade e indução de apoptose (HANSSON, 2005).

Portanto, quando o receptor de células T é ativado, ocorre uma cascata que resulta na liberação de um “set” de citocinas, moléculas de superfície e enzimas. As respostas de um linfócito CD4+, dentro deste processo, estão relacionadas a atividade efetora de suas duas subpopulações, Th1 e Th2.

A resposta do eixo Th1, é de efeito similar ao da hipersensibilidade tardia, com funções características da defesa contra patógenos intracelulares. Através da liberação de IFN- γ , estas células amplificam a resposta efetora de macrófagos. Assim, estas aumentam sua capacidade de apresentação de antígenos e liberam mais citocinas (TNF, IL-1), radicais livres e enzimas proteolíticas (SCHULTE, 2008).

Já as citocinas liberadas pelo eixo das células efectoras Th2, desencadeiam uma resposta semelhante ao processo alérgico, mas com capacidade anti-aterosclerótica. Entretanto, a mudança de eixo pode não ser favorável, pois podem resultar em aneurisma por indução de enzima elastolítica (HANSSON, 2005; NILSSON, 2005).

1.4 Lipoproteína de Baixa Densidade Oxidada (oxLDL)

A LDL é a lipoproteína mais abundante no plasma, sendo responsável pelo transporte de colesterol para células em processo ativo de divisão, na síntese de membrana ou por tecidos que utilizam colesterol na síntese de hormônios esteróides ou sais biliares (Brown et al., 1981).

É constituída principalmente por lipídios, vitaminas lipossolúveis e uma parte protéica, a apolipoproteína B-100 (apoB-100). Trata-se de uma partícula esférica com um diâmetro entre 180 a 280 Å e densidade entre 1,019 a 1,063 g/mL. A partícula de LDL contém cerca de 2.700 moléculas de ácidos graxos, onde a maior parte é poliinsaturada com predominância de ácido linoléico e ácido araquidônico. O antioxidante associado mais abundante é o α -tocoferol, com cerca de 6 a 8 moléculas por partícula de LDL. Outros antioxidantes também estão presentes como o γ -tocoferol, ubiquinol-10, α -caroteno, β -caroteno, licopeno e criptoxantina, entretanto em baixas concentrações na partícula de LDL (Hevonoja et al., 2000).

Com o processo de oxidação, ocorrem mudanças na composição da partícula de LDL, que podem variar de acordo com o tipo, concentração e tempo de

exposição ao agente oxidante utilizado no experimento. Dessa forma, em um processo extenso de oxidação, que chega a atingir lipídeos internos e a parte proteica da partícula, ocorre um aumento de subprodutos tóxicos, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), os quais podem servir como marcadores do processo de oxidação (JESSUP et al., 2002; REQUENA et al., 1997)

O processo de oxidação *in vitro* ocorre na presença de íons metálicos, como ferro ou cobre, os quais funcionam como catalisadores da decomposição de lipoperóxidos. (ZAREV et al., 2003).

1.5 Auto-anticorpos na 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).

Auto-anticorpos interagem com a oxLDL circulante ou fixa no tecido. Devido ao fato da diversidade de classes e sub-classes dos anticorpos e de epítomos formados pela modificação da LDL, a ação destes no processo aterosclerótico é tema de grande contrariedade e arbitrariedade. Desta forma, efeitos anti e pró aterogênicos são relacionados a estes anticorpos (CHOU, 2008; GIDLUND, 1996; SHOENFELD et al., 2004).

A ação neutralizante, decorrente da captura e desintoxicação de lipídios oxidados, os quais são pró-inflamatórios, pode ter ação contrária ao processo aterosclerótico. A atividade protetora destes auto-anticorpos, muito relatado em crianças, pessoas saudáveis e até mesmo com doença coronária, pode ser mediada em parte por anticorpos naturais IgM, o arco humoral da imunidade inata (CHOU, 2008; SHAW, 2000; SJOBERG, 2007).

Quanto a seus efeitos pró-aterogênicos, estes auto-anticorpos podem induzir efeitos imunológicos, tais como opsonização para fagócitos e ativação do sistema complemento, amplificando a resposta imune e resultando em maior injúria do endotélio. Elevados títulos de anti-oxLDL pode ser um preditor de desenvolvimento da aterosclerose (HULTHE, 2001; MEDEIROS, 2010)

Auto-anticorpos da classe IgG são associados a maiores efeitos pró-

aterogênicos. A IgG2 é a subclasse dominante na resposta a epítomos contendo fosfolípidos, porém a IgG3 fixa complemento melhor e se liga a receptores Fc com maior avidade. Desta forma, IgG3 tem maior propriedade patogênica do que IgG2 (SHOENFELD et al., 2004).

Alguns estudos têm demonstrado que anticorpos IgM são antiaterogênicos por possibilitarem a remoção de partículas de oxLDL através da via clássica de ativação do complemento por C1q (LEWIS et al., 2009; SHAW et al., 2001).

1.6 Hipercolesterolemia

O metabolismo também interage no balanço pro e anti inflamatório. O alto nível de colesterol contribui para a deposição lipídica na artéria e na formação de tecido adiposo. O tecido adiposo de indivíduos obesos e/ou em síndrome metabólica também produz citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 e adipocinas (HANSSON, 2005).

A concentração de colesterol plasmático no organismo é regulada pela biossíntese do colesterol, absorção de colesterol dietético, remoção do colesterol circulante e excreção de colesterol e ácidos biliares nas fezes (SUDHAHAR, KUMAR e VARALAKSHMI, 2006).

Contudo, as dietas ricas em colesterol, bem como a modificação dos padrões dietéticos que incluem aumento no consumo de energia, açúcares, sal, gorduras totais, trans e saturadas (MAGALHÃES, 2005), aliadas à inatividade física, possibilitam o aumento na prevalência de dislipidemia, a qual é considerada um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares e caracterizada pela elevação dos níveis plasmáticos de triacilgliceróis, colesterol total e sua fração LDL-c, associados à diminuição nos valores de HDL-c (BRUCKNER, 2008).

Nas últimas décadas as DCVs passaram a ser a principal causa de morbimortalidade nos países desenvolvidos e também em proporções cada vez maiores nos países em desenvolvimento (FALUDI e BERTOLAMI, 2005; REHRAH et al., 2007). Dentre os fatores de risco para enfermidades cardiovasculares, Martinez e colaboradores (2003) determinaram os níveis de colesterol em 81.262 indivíduos com mais de 18 anos em 13 cidades brasileiras e observaram que a prevalência dos níveis de colesterol acima de 200 e 240 mg/dL foram de 40% e 13%, respectivamente. Além disso, os mesmos observaram que quanto maior a

quantidade de fatores de risco associados, maiores os níveis de colesterol ($p < 0,0001$) e a proporção de indivíduos com colesterol > 200 mg/dL ($p = 0,032$) (MARTINEZ et al., 2003). Em estudo transversal realizado na cidade de São Paulo com pessoas de 15 a 59 anos de idade, Marcopito et al. (2005) constataram prevalência de 8,1% de indivíduos com colesterol total >240 mg/dL; 27,1% com HDL-colesterol <40 mg/dL; 14,4% com triacilgliceróis >200 mg/dL.

Nas dislipidemias, a principal conduta terapêutica até então adotada por muitos profissionais de saúde é o controle do LDL-c, composto conhecido popularmente como o “colesterol ruim” por depositar o colesterol nas células (COSTA; SILVA, 2005). Tal preocupação provém de dados científicos que indicaram a elevação deste componente como a maior causa de doença arterial coronariana (DAC), pois quando oxidada, esta molécula atua no início e na progressão da aterosclerose (ARAÚJO et al., 2005; DINIZ, 2005; MATSUURA et al., 2006; NOVELLI).

As recomendações nutricionais para dislipidemias são, entre outras, ingerir frutas, legumes e verduras variados, grãos, leguminosas, peixes, frango sem pele e carnes magras, leite e derivados desnatados; adequar a ingestão de calorias para promoção da perda de peso quando necessária; reduzir a ingestão de gorduras saturadas e trans ($< 7\%$ e 2% do valor calórico total da dieta, respectivamente) e do colesterol total (< 200 mg/dia) (COSTA; SILVA, 2005; SPOSITO et al., 2007). Tais condutas, aliadas à substituição isocalórica de ácidos graxos saturados pelos insaturados provocam redução do colesterol total e do LDL-c (CAVALCANTI; BENSEÑOR, 2005).

1.7 Estatina: Tratamento Farmacológico

Os inibidores da 3-hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase (estatinas), formam o mais novo e mais potente grupo de drogas hipocolesterolemiantes (DAIROU et al., 1994; ENDO et al., 1992; GRUNDY et al., 1988; GRUNDY et al., 1995). Endo et al. (1976) descobriram a ação inibitória da mevastatina (ou compactina), extraída de uma cultura do fungo *Penicillium citrinum*, sobre a HMG-CoA redutase. Quase que simultaneamente, Brown et al. (1976) isolaram o mesmo composto, a partir do *Penicillium brevicompactum*.

Apesar do efeito hipocolesterolemizante, a mevastatina foi abandonada devido a seus efeitos colaterais (DAIROU et al., 1994). Com o passar do tempo, foram desenvolvidos vários compostos de ação semelhante, com menos efeitos tóxicos. A lovastatina (ou mevinolina), extraída do *Aspergillus terreus* (ALBERS et al., 1980), a sinvastatina (epistatina; sinvinolina; MK 733), derivado semi-sintético obtido a partir da lovastatina (TODD; GOA, 1990), a pravastatina, obtida por transformação microbiana da mevastatina e a fluvastatina, que é um composto totalmente sintético (Tsujita et al., 1986). Suas moléculas, muito parecidas umas com as outras, apresentam-se muito similares à HMG-CoA, que é a base de seu modo de ação. As estatinas inibem a HMG-CoA redutase, que modula a redução da HMG-CoA ao mevalonato na biossíntese do colesterol (TODD; GOA, 1990).

Considerando-se que a aterosclerose é uma doença multifatorial, o seu tratamento exige uma abordagem ampla e simultânea em relação a todos os fatores de risco, priorizando-se inicialmente a mudança do estilo de vida, que inclui a terapia nutricional, a atividade física, a abstenção do tabagismo, associadas ou não ao tratamento farmacológico específico (KINLAY, 2005).

Tendo em vista os três principais mecanismos envolvidos na reversão da aterosclerose, as terapias têm como objetivos principais controlar a dislipidemia e a inflamação, além de proteger o endotélio vascular. Portanto, o uso de estatinas são indicados, pois inibem a biossíntese do colesterol, apresentam efeitos moduladores na inflamação e trombose e na função vasomotora do endotélio (GIELEN, 2009).

A biossíntese do colesterol endógeno é o alvo de atuação deste fármaco. As estatinas são agentes inibidores, seletivos e competitivos, da enzima HMG-CoA redutase, responsável pela conversão de HMG-CoA em mevalonato, um precursor do colesterol. Ao mesmo tempo, dentro desta via, as estatinas previnem a síntese de outros importantes intermediários isoprenóides (FONSECA, 2005), sobre os quais discutiremos adiante a sua importância na modulação da inflamação.

Devido à diminuição da biossíntese de colesterol, as estatinas reduzem a quantidade de lipoproteínas circulantes. Este efeito acarreta, também, aumento de receptores para a LDL na superfície dos hepatócitos, resultando em maior absorção e maior catabolismo desta lipoproteína (BLAKE, 2000; CAMPO, 2007).

Além dos efeitos hipolipemiantes, particularmente da LDL, as estatinas são estudadas pela sua expressiva diminuição de morbidade e mortalidade cardiovascular. De forma independente da redução de colesterol, estas aparentam

alterar vários processos imunes inflamatórios e da progressão da lesão aterosclerótica.

Estudos analisam a sua ação reguladora da função endotelial, o aumento de estabilidade da placa aterosclerótica e a diminuição da atividade de leucócitos e mediadores de inflamação (BLAKE, 2000; KINLAY, 2005; GIELEN, 2009).

Retomando a via de ação das estatinas, a via do mevalonato resulta na formação de isoprenóides, geranilgeranilpirofosfatos (geranil-PP) e o farnesilpirofosfatos (farnesil-PP), os quais são intermediários na síntese do colesterol. Estes isoprenóides intermediários são requeridos para a ativação de pequenas GTPases, entre elas Rho, Ras e Rac (figura 4). Estas enzimas são necessárias para a ativação de vias chave de sinalização celular, incluindo a Rho/Rho Kinase (ROCK) – (FONSECA, 2005; LEVE, 2011; NOHRIA, 2009).

Portanto, a inibição da síntese dos isoprenóides intermediários, exercem papel anti-aterogênico, trabalhando na modulação da ativação celular e, conseqüentemente, do processo inflamatório.

Figura 3 – Ação farmacodinâmica das estatinas.

Via do mevalonato com ênfase em efeitos paralelos compostos pela redução de colesterol e pela redução da enzimas GTPases.

Fonte: própria.

Segundo a SBC (2007), existem seis estatinas que são distribuídas e comercializadas no Brasil: lovastatina, fluvastatina, atorvastatina, sinvastatina, pravastatina e rosuvastatina. Os diversos tipo de estatinas diferem-se em relação às propriedades farmacológicas dos seus componentes, incluindo: (1) afinidade pelo sitio ativo da HMG-CoA redutase; (2) taxa de entrada nos tecidos hepáticos; (3) disponibilidade na circulação sistêmica para captação pelos tecidos extra-hepáticos; (4) rotas e modos de transformação metabólicas e eliminação (McTAGGART, 2002).

A rosuvastatina é o fármaco mais recente aprovado pelas instituições regulatórias, em agosto de 2001. A eficácia, segurança e tolerabilidade têm sido avaliadas a longo prazo, por meio de estudos clínicos multicêntricos com doses que variam de 5-80 mg em pacientes com hipercolesterolemia. A dose típica de rosuvastatina para o tratamento da hipercolesterolemia e morbidades associadas é de 10-40 mg/dia (TIWARI, 2006).

A rosuvastatina apresenta uma série de vantagens farmacológicas, por exibir características únicas de ligação com a HMG Coa redutase e efeitos inibitórios superiores quando comparados com as outras estatinas (MCTAGGART, 2002).

Finalizando, as estatinas podem reduzir eventos vasculares adversos, através da inibição da biossíntese do colesterol e de efeitos moduladores da inflamação. Nesta dissertação, nós estudamos o efeito da Rosuvastatina. O propósito desta é reduzir o colesterol e assim diminuir a probabilidade do paciente sofrer um evento agudo cardiovascular, tal como um infarto coronariano ou um acidente vascular cerebral. Grande número de estudos são executados analisando o poder da família das estatinas em conseguir realizar este propósito. O valor preditivo e qualitativo de um estudo sobre o potencial benéfico do fármaco irá depender dos parâmetros utilizados no estudo. Os parâmetros mais utilizados são perfil lipídico (colesterol total, triglicérides, LDL e HDL) e marcadores inflamatórios (PCR e citocinas). A lógica destes parâmetros, em principal os inflamatórios, é que o evento aterosclerótico, que é um evento inflamatório local (injúria do endotélio, reparo, etc.), pode ser mensurado pela presença de citocinas circulantes e PCR e que estes marcadores irão ter um valor preditivo de futuros eventos cardiovasculares. A maioria dos estudos envolvendo uma grande quantidade de indivíduos mostra que, como esperado, alguns indivíduos irão responder ao fármaco e diminuir seus níveis de colesterol circulante enquanto outros não irão responder ou terão uma baixa resposta ao fármaco. Em termos de marcadores inflamatórios a situação é a mesma.

Com isto em mente, esta dissertação foi desenvolvida para tentar responder a seguinte questão:

É possível em um estágio inicial definir indivíduos que irão responder ao fármaco, não apenas em relação a diminuição de colesterol, mas também em relação a outros componentes associados a eventos cardiovasculares, que podem ter relevância mais profunda na progressão aterosclerótica?

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Nesta dissertação, nós estudamos o efeito de um fármaco para redução de colesterol, a Rosuvastatina, sob pacientes hipercolesterolêmicos. O objetivo principal deste estudo foi avaliar a eficácia da utilização de auto-anticorpos dirigidos para a LDL oxidada ou contra fragmentos peptídicos da apolipoproteína B (apoBD) como marcadores no acompanhamento da resposta a este tratamento farmacológico.

2.2 Objetivos Específicos

Para tanto, ao longo de período de tratamento abrangido por este estudo, executou-se:

- 1) Análise de Perfil Lipídico ;
- 2) Análise de grau de oxidação da LDL plasmática através de TBARS.
- 3) Análise de auto-anticorpos IgG contra a oxLDL;
- 4) Análise de auto-anticorpos IgM contra a oxLDL;
- 5) Análise de auto-anticorpos contra a apoBD.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Foi realizado um estudo sobre o efeito do fármaco Rosuvastatina, utilizado no tratamento da hipercolesterolemia, sobre parâmetros cardiovasculares ao longo do tempo.

Foram recrutados indivíduos com idade de 30 a 60 anos, em ambos os sexos, sem doença cardiovascular detectável na visita inicial e com dislipidemia definida de acordo com o National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Protocol III ou IV (NCEP/ATP III ou IV). Dentro deste, o parâmetro de inclusão foi o nível sanguíneo de LDL elevado ($\geq 160\text{mg/dL}$).

Os pacientes foram divididos de forma aleatória em dois grupos e ambos tiveram orientação para regime de redução de colesterol baseado em dieta alimentar e atividade física. O protocolo adotado foi: “Therapeutic Lifestyle Changes (TLC) do NCEP/ATP III. As recomendações principais deste protocolo está resumido abaixo:

Figura 4 - Componentes essenciais da TLC - NCEP/ATP III.

Table V.2–1. Essential Components of Therapeutic Lifestyle Changes (TLC)

Component	Recommendation
LDL-raising nutrients	
Saturated fats*	Less than 7% of total calories
Dietary cholesterol	Less than 200 mg/day
Therapeutic options for LDL lowering	
Plant stanols/sterols	2 grams per day
Increased viscous (soluble) fiber	10–25 grams per day
Total calories (energy)	Adjust total caloric intake to maintain desirable body weight/prevent weight gain
Physical activity	Include enough moderate exercise to expend at least 200 kcal per day

O protocolo ATP III recomenda uma abordagem multifatorial sobre estilo de vida para redução do risco de DCV.

Fonte: U. S. Department of health and human services, 2002.

Entretanto, para o estudo do efeito da Rosuvastatina, houve prescrição deste fármaco a apenas um dos grupos. A dose ministrada foi de 20 mg/dia, depois do jantar.

Figura 5 – Esquema da organização dos grupos.

Dois tratamentos para redução de colesterol foram organizados. Apenas no primeiro grupo houve a intervenção de Rosuvastatina. T.L.C. = Therapeutic Lifestyle Changes.

Quanto ao recrutamento, critérios de exclusão, não foram aceitos indivíduos em reposição hormonal pós menopausa, com disfunção hepática (enzimas aumentadas 2x em relação ao normal), com CPK maior que 3x o normal, com Diabetes Mellitus, com hipertensão descompensada (PAS>190 mmHg ou PAD >100mmHg), que tiveram câncer nos últimos 5 anos, com hipotireoidismo descompensado, tabagistas, sob uso recente de bebida alcoólica ou drogas que causem dependência física ou química, com artrite, lúpus eritematoso, colite, sob uso de agentes imunossupressores, tais como ciclosporina, tacrolimus, azatioprina ou corticosteróides.

Os pacientes deste estudo foram recrutados no ambulatório de uma clínica privada em São Paulo (CLÍNICA ELIA ASCER), sobre os cuidados do médico cardiologista Dr. Elia Ascer.

Foram feitas análises médicas clínicas e coleta de amostra sanguínea dentro da seguinte cronologia: visita inicial (washout de 4 semanas), 90 e 180 dias.

Figura 6 – Estrutura do estudo prospectivo.

1. Avaliações médicas.
2. **Avaliações laboratoriais:**
 - Perfil lipídico;
 - TBARS;
 - Auto-anticorpos IgG anti-oxLDL;
 - Auto-anticorpos IgM anti-oxLDL;
 - Auto-anticorpos IgG anti-pepD.

Os pacientes foram avaliados durante 180 dias de tratamento. Com pontos de checagem de pré-tratamento, 90 dias de tratamento e 180 dias de tratamento (final). Os pontos de checagem para este estudo compreendem as avaliações laboratoriais acima.

3.2 Amostras

As amostras foram coletadas em um tubo de coleta a vácuo (VACUTAINER) com EDTA e centrifugadas a 3000 g por 10 minutos para obtenção de plasma sanguíneo. O material foi estocado imediatamente a -80° C para evitar variações pré analíticas.

3.3 Perfil Lipídico

A concentração de colesterol total (CT) foi determinada de acordo com o método colesterol oxidase, utilizando-se kit enzimático comercial (COLESTEROL LIQUIFORM, LABTEST). O método consiste na hidrólise dos ésteres de colesterol pela colesterol esferase, produzindo colesterol livre, o qual é oxidado a colest-4-en-3-ona com a produção simultânea de peróxido de hidrogênio. Este sofre ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina, produzindo um composto róseo-avermelhado. A absorbância é medida em 500nm.

A concentração de TG foi determinada utilizando-se kit comercial (TRIGLICÉRIDES LIQUIFORM, LABTEST), de acordo com método colorimétrico enzimático. Neste método, os triagliceróis do soro foram hidrolisados pela lipase lipoprotéica produzindo glicerol livre, que é fosforilado pela enzima glicerol quinase, cujo produto sofre a ação da glicerol-P-oxidase, a qual em presença do oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Este, sob a ação peroxidase em presença de um reagente fenólico (p-clorofenol) e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado (quinona), com máximo de absorção a 492nm.

Estes dois testes (colesterol total e triglicérides) foram adaptados para a realização em microplacas de 96 poços. Assim, a 10uL de plasma foi adicionado 1000uL de reagente de cor. Após o período de incubação de 10 minutos a 37°C foi medida a absorbância em 492nm. O mesmo procedimento foi realizado com o padrão (10uL) disponível neste kit comercial.

Para a determinação da fração HDL do colesterol, as amostras foram tratadas com agente precipitante (COLESTEROL HDL, LABTEST) para que os quilomicrons, a VLDL e a LDL fossem quantitativamente precipitados através do ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio. Após centrifugação a 3500 rpm durante 15 minutos, a fração HDL que permaneceu no sobrenadante foi determinada utilizando-se o kit de colesterol total, previamente descrito.

A concentração plasmática de LDL e VLDL foi calculada utilizando a equação de Friedewald: $LDL = CT - (HDL + VLDL)$, onde $VLDL = TG/5$.

3.4 Detecção de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Para dosar o grau de oxidação das amostras plasmáticas foi realizada a dosagem de TBARS (PUHL et al., 1994), formados a partir da peroxidação lipídica na partícula. Foram incubados 50 µl de amostra com 220 µl de reagente de TBARS (ácido tiobarbitúrico 1%, ácido clorídrico 562,5 µmol e ácido tricloroacético 15% para 100 ml de água d.i.). A mistura foi medida utilizando-se o filtro de 540 nm em um leitor de microplacas (GÊNIOS TECAN, ÁUSTRIA). Os resultados são expressos baseando-se em uma curva padrão de malondialdeído (MDA) (MERCK, ALEMANHA).

3.5 Isolamento, Oxidação da LDL e Dosagem do Grau de Oxidação

Ao plasma de um “pool” de pacientes foram adicionados os seguintes preservantes: 2 mM benzamidina, 0,5% de gentamicina, 0,25% cloranfenicol, 0,5 mM PMSF, e 0,1 unidade/mL de aprotinina. A fração de LDL foi obtida e isolada através de ultra centrifugação seqüencial (HAVEL ET. AL., 1955) utilizando-se o rotor 75 Ti (HITACHI CENTRIFUGE), a 100.000 x g e a 4 °C.

Dentro destas características, o processo para isolamento da LDL do plasma, consiste em primeiramente centrifugar este plasma por 20 horas para obtenção da VLDL (densidade = 1,006 g/mL). Esta é retirada e descartada, e então, a densidade do infranadante é acertada em 1,063 g/mL, através da adição de KBr. Em seguida, o plasma é centrifugado novamente por mais 20 horas, e agora obtemos no sobrenadante a LDL, de densidade <1,063 g/mL.

A LDL isolada então é dialisada por 24 horas em solução PBS (pH 7,4) ao abrigo da luz para retirar o Kbr que prejudica posterior oxidação da amostra. Após este processo, a LDL é filtrada em filtro de 0,22 µm de diâmetro (MILLIPORE) e então, para obtenção de concentração de LDL na amostra, as proteínas são quantificadas utilizando-se o Kit BCA (PIERCE) de acordo com as recomendações do fabricante.

Para obtenção da oxLDL através de íons de cobre, a LDL isolada é incubada com CuSO₄ 20 µM, por 18 h a 37 °C, como padronizado em nosso laboratório. Após este período, a oxidação é então bloqueada através da adição de EDTA 1mM ao meio contendo LDL com cobre.

Para determinar o grau de oxidação da oxLDL foi utilizado o procedimento de TBARS conforme metodologia anterior.

3.6 Detecção de Auto-anticorpos IgG e IgM contra a oxLDL

Para dosagem de auto-anticorpos contra oxLDL, foi utilizado o método de ELISA padronizado em nosso laboratório (FERNVIK et. al., 2004). Placas de 96 poços (COSTAR, EUA) foram sensibilizadas com 50 µL, de oxLDL, na concentração de 7,5 µg/mL, em tampão carbonato de sódio, 0,1 M, pH 9,4, durante 18h e a 4 °C. Após 4 ciclos de lavagens com 100µL de PBS, as placas foram bloqueadas com solução de gelatina a 1,0% (GIBCO, EUA), em temperatura ambiente, por 2 h. Em

seqüência, as placas foram novamente lavadas por 4 vezes (100 µL) com PBS e então, foi adicionado aos poços em triplicata 50 µL das amostras dos diferentes grupos, diluídas 1:400 em PBS. Após 2 horas de incubação, as placas foram lavadas mais 4 vezes com 100 µL de PBS-Tween 20 (0,05%) e incubadas com 50 µL de anticorpo de detecção conjugado com peroxidase na concentração de 1:1000 em PBS por 1h em temperatura ambiente. Para a detecção de anticorpos IgG foi utilizado, como conjugado, anticorpo purificado de cabra anti-IgG humana, marcado com peroxidase (KPL, EUA) e para a detecção de anticorpos IgM foi utilizado, como conjugado anticorpo purificado de cabra anti-IgM humana marcado com peroxidase (KPL, EUA). Posteriormente a mais 4 ciclos de lavagem, com PBS-Tween 20 (0,05%), o processo de revelação foi realizado com a adição, em cada poço, de 50 µL da solução de TMB Sure Blue Reserve TM (KPL, EUA). A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de ácido sulfúrico 0,6N de acordo com a recomendação do fabricante. Os resultados foram obtidos por leitura espectrofotométrica a 450 nm em leitor de ELISA (GENIOS TECAN, AUSTRIA). Algumas imprecisões podem ocorrer no método de quantificação dos anticorpos por ELISA e para compensar a variação intra-placa foi utilizado em cada placa, como controle, IgG purificada humana (10 mg/ml - THERMO SCIENTIFIC, USA) na concentração de 1:400 no lugar da amostra. Os títulos de anticorpos foram expressos como Índice de Reatividade (IR) para cada amostra e calculado da seguinte maneira: (Abs da amostra – Abs do Branco)/(Abs do controle de IgG - ABS do Branco).

3.7 Detecção de Auto-anticorpos contra PepD da ApoB (APOBD)

Foram desenvolvidos em nosso laboratório, diversos peptídeos sintéticos baseados na seqüência de aminoácidos da apoB. Estes foram selecionados de acordo com parâmetros conhecidos para a predição de peptídeos imunogênicos (ATHEROSCLEROSIS, 2000).

- a. a presença de regiões anfipáticas;
- b. probabilidade da exposição da superfície da molécula em sua configuração terciária;
- c. presença de domínios na molécula que permite a ligação ao MHC;
- d. domínios relacionados com os receptores celulares da LDL;

- e. acessibilidade da tripsina (onde a inabilidade de clivo pela da tripsina sugere que este epítipo escondido somente é acessível em uma molécula apoB degradada);
- f. solubilidade na água (melhor manipulação e imunização);
- g. Estabilidade em soluções biológicas.

Alem disso, o potencial imunogênico dos peptídeos foi baseado na informação física sobre a molécula intacta da apoB, obtida em um banco de dados do específico (EXPASY MOLECULAR BIOLOGY, Server: www.expasy.ch) pela metodologia convencional. Vinte e cinco seqüências de peptídeos foram sintetizadas em fase contínua, cada uma com 18-25 resíduos de aminoácidos e com um grupo de amino na extremidade do C-terminal. Destas, uma chamada de pepD, foi selecionada após apresentar um bom potencial imunogênico para o uso em testes de ELISA. Esse peptídeo corresponde a uma das duas seqüência que constituem a região da ligação da LDL com o receptor de LDL nos macrófagos (BOSCHOV et al.,2000). Sua obtenção é feita junta ao Professor Luiz Juliano do Departamento de Biofísica da UNIFESP, onde é sintetizado em fase sólida, sendo aminado na extremidade C-terminal, usando-se a estratégia química FMOC (projeto concluído FAPESP nº 99/00158-4).

A determinação dos auto-anticorpos contra o pepD foi feita seguindo o mesmo protocolo usado para a determinação de anticorpos contra a oxLDL, entretanto, as placas foram sensibilizadas utilizando 50 µl/poço de pepD (1 µg/ml) em tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,4.

3.8 Estatística

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão. Para comparação dos resultados, primeiramente foi verificado a normalidade dos dados (Kolmogorov-Smirnov). Para avaliar a significância estatística entre dois grupos de dados foi utilizado o teste t (paramétrico) ou Wilcoxon (não paramétricos). Para correlacionar variáveis foram feitas regressões lineares, e apresentado o valor de R^2 e de P. O nível de significância mínimo adotado para este estudo foi de 5% ($p \leq 0,05$). Os processamentos foram realizados utilizando-se o software GraphPad Prism, versão 6.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização Inicial dos Pacientes

A tabela 1 a seguir refere-se às características dos pacientes recrutados para o estudo. Foram recrutados inicialmente 130 pacientes, mas devido a fatores de descontinuação do tratamento (“drop-out”), o estudo foi concluído com 76 pacientes, os quais estão distribuídos em dois grupos: Rosuvastatina e controle. O grupo caso alcançou o número de 40 pacientes (21 masculino e 19 feminino) e o grupo controle, 36 pacientes (16 masculino e 20 feminino). Não houve diferença significativa em relação ao sexo ($P=0,501$). Quanto a idade, o grupo caso teve média em anos de $45 \pm 14,3$ contra $45 \pm 13,7$ do controle, e não houve diferença significativa entre os grupos ($P=0,911$). Foi analisado também o índice de massa corpórea (IMC), onde o grupo caso e o grupo controle tiveram média (Kg/m^2) de $27 \pm 2,6$ e de $28 \pm 4,2$ respectivamente, e também não houve diferença significativa ($P=0,559$).

Tabela 1 – Características iniciais dos pacientes

Variáveis	Rosuvastatina	Controle	P *
Amostra (n)	40	36	
Sexo			0,501
Masculino	21 (52%)	16 (44%)	
Feminino	19 (48%)	20 (56%)	
Idade (anos)	$45 \pm 14,3$	$45 \pm 13,7$	0,991
IMC (Kg/m^2)	$27 \pm 2,6$	$27,1 \pm 4,2$	0,559
Colesterol Total	$251,6 \pm 34$	$256,9 \pm 35,6$	0,512
LDL	$221,0 \pm 45,6$	$224,3 \pm 43,1$	0,761
Triglicérides	$146,5 \pm 65,1$	$122,9 \pm 51,5$	0,086
HDL	$56,8 \pm 7,0$	$57,2 \pm 9,5$	0,817

Amostra, Idade, Gênero, Sexo, IMC e Perfil Lipídico dos pacientes recrutados no estudo. Questões de interferência, como tabagismo, diabetes mellitus ou uso anterior de hipolipemiantes foram evitadas nos critérios de exclusão do estudo (materiais e métodos). Os resultados são expostos em %, média e desvio padrão. Para as variáveis categóricas, foi executado teste exato de Fischer. IMC = índice de massa corpórea. LDL = lipoproteína de baixa densidade. HDL = lipoproteína de alta densidade.

Quanto ao perfil lipídico, nenhuma das variáveis mostrou diferença significativa inter-grupos com exceção de triglicérides, que ficou próximo de $P < 0,05$.

4.2 Perfil Lipídico

A tabela 2 mostra o perfil plasmático de lipídios durante o intervalo de estudo de ambos os grupos. Em 180 dias, não houve redução ou elevação significativa das variáveis de perfil lipídico resultantes dos dois tratamentos.

Tabela 2 – Perfil lipídico dos pacientes

<i>lipídio (mg/dL)</i>	<i>Pré</i>		<i>90 dias</i>			<i>180 dias</i>		
	<i>Média</i>	<i>D. P.</i>	<i>Média</i>	<i>D. P.</i>	<i>P₁</i>	<i>Média</i>	<i>D. P.</i>	<i>P₂</i>
CT								
Rosuvastat.	251,6	34,0	250,4	34,5	0,872	245,4	41,2	0,486
Controle	256,9	35,6	257,2	37,2	0,975	243,6	39,8	0,191
LDL								
Rosuvastat.	224,2	39,2	221,0	45,6	0,751	216,1	51,8	0,454
Controle	224,3	43,1	225,3	43,0	0,915	211,8	41,5	0,285
TG								
Rosuvastat.	146,5	65,1	140,5	63,1	0,686	142,1	64,1	0,771
Controle	122,9	51,5	126,3	50,3	0,782	117,6	36,0	0,676
HDL								
Rosuvastat.	56,8	7,0	57,4	7,6	0,706	56,7	9,7	0,944
Controle	57,2	9,5	57,1	6,9	0,941	55,2	7,7	0,412

Análise de colesterol total (CT), VLDL, LDL, HDL e triglicérides. O Valor P foi determinado nos intervalos: 0 a 90 dias e 90 a 180 dias. O perfil lipídico foi executado nos dois grupos: Rosuvastatina (n=40) e controle (n=36). Demais informações conforme materiais e métodos.

Então, para podermos fazer uma análise mais específica, filtramos os resultados por sexo, idade e IMC, para verificar se obtínhamos outras diferenças dentro destes sub-grupos.

Tabela 3 – Perfil lipídico ajustado por sexo.

<i>lipídio (mg/dL)</i>	<i>Pré</i>		<i>90 dias</i>		<i>Valor P₂</i>	<i>180 dias</i>		<i>Valor P₃</i>
	<i>Média</i>	<i>D. P.</i>	<i>Média</i>	<i>D. P.</i>		<i>Média</i>	<i>D. P.</i>	
CT - Rosuvastatina								
Homem	238,9	26,2	248,2	37,3	0,374	244,4	37,4	0,605
Mulher	265,7	36,6	252,4	32,7	0,252	246,3	45,4	0,166
Valor P ₁	0,011							
CT - Controle								
Homem	266,1	35,6	264,1	41,3	0,892	237,2	37,2	0,056
Mulher	250,4	35,0	252,6	34,4	0,838	249,9	43,1	0,976
Valor P ₁	0,196							
LDL - Rosuvastatina								
Homem	212,9	30,9	222,1	48,4	0,481	216,9	50,4	0,770
Mulher	236,6	44,2	220,0	44,2	0,263	215,4	54,6	0,206
Valor P ₁	0,055							
LDL - Controle								
Homem	234,3	42,7	235,6	48,6	0,939	207,0	37,8	0,104
Mulher	217,1	43,0	218,5	38,5	0,911	216,7	46,1	0,981
Valor P ₁	0,244							
TG - Rosuvastatina								
Homem	144,4	61,3	140,7	69,1	0,862	134,5	71,4	0,659
Mulher	148,9	70,7	140,3	58,9	0,693	148,7	58,4	0,993
Valor P ₁	0,832							
TG - Controle								
Homem	119,5	62,5	134,1	54,8	0,511	107,0	29,1	0,545
Mulher	125,3	43,5	121,0	47,7	0,762	128,2	40,3	0,854
Valor P ₁	0,745							
HDL- Rosuvastatina								
Homem	54,9	6,4	54,3	5,7	0,750	54,9	11,8	0,994
Mulher	58,9	7,1	60,4	8,0	0,540	58,2	7,4	0,773
Valor P ₁	0,072							
HDL - Controle								
Homem	55,7	7,3	55,4	5,9	0,890	51,6	5,5	0,132
Mulher	58,3	10,9	58,2	7,4	0,976	58,9	8,0	0,883
Valor P ₁	0,421							

Análise de colesterol total (CT), VLDL, LDL, HDL e triglicérides (TG) ajustado por sexo. O Valor P1 foi determinado nos intervalos: 0 a 90 dias e 90 a 180 dias. Demais informações conforme legenda da tabela 1/2 e/ou materiais e métodos.

A tabela 3 mostra os resultados novamente filtrados por sexo. Interessante observarmos que dentro das variáveis colesterol total e LDL, temos uma aparente diferença de efeito do tratamento entre homens e mulheres. Mulheres tiveram maiores reduções no grupo caso e homens no grupo controle. Interessante que os valores de LDL e HDL diferem-se no momento basal quanto ao sexo no grupo que foi tratado com Rosuvastatina.

Tabela 4 – Perfil lipídico ajustado por idade.

<i>lipídio (mg/dL)</i>	<i>Pré</i>		<i>90 dias</i>		<i>Valor P₂</i>	<i>180 dias</i>		<i>Valor P₃</i>
	<i>Média</i>	<i>D. P.</i>	<i>Média</i>	<i>D. P.</i>				
CT - Rosuvastatina								
≥ 45 (n= 22)	262,0	41,4	268,1	34,3	0,711	255,7	41,5	0,725
< 45 (n=18)	248,4	35,5	237,6	42,1	0,566	231,0	46,8	0,398
Valor P ₁	0,444							
CT - Controle								
≥ 45 (n= 19)	267,4	19,3	268,5	34,8	0,929	246,6	34,1	0,110
< 45 (n= 17)	240,5	40,4	247,2	29,0	0,689	238,9	35,6	0,931
Valor P ₁	0,076							
LDL - Rosuvastatina								
≥ 45 (n= 22)	236,1	48,8	241,5	43,5	0,785	229,2	50,9	0,750
< 45 (n=18)	211,1	36,3	202,5	52,1	0,691	195,6	60,1	0,522
Valor P ₁	0,219							
LDL - Controle								
≥ 45 (n= 19)	230,7	28,7	234,5	40,8	0,811	213,5	31,7	0,220
< 45 (n= 17)	206,7	42,3	217,5	30,1	0,541	207,6	35,2	0,962
Valor P ₁	0,163							
TG - Rosuvastatina								
≥ 45 (n= 22)	155,5	80,5	150,1	59,0	0,859	150,6	60,3	0,871
< 45 (n=18)	105,5	23,9	128,5	62,2	0,316	132,1	78,5	0,346
Valor P ₁	0,089							
TG - Controle								
≥ 45 (n= 19)	127,0	46,4	121,2	39,9	0,766	115,4	27,5	0,503
< 45 (n= 17)	105,8	34,5	127,5	45,1	0,267	115,7	37,9	0,568
Valor P ₁	0,277							
HDL - Rosuvastatina								
≥ 45 (n= 22)	57,1	8,2	56,6	6,5	0,891	54,2	8,2	0,416
< 45 (n=18)	58,4	7,4	60,7	8,7	0,539	56,2	8,2	0,584
Valor P ₁	0,718							
HDL - Controle								
≥ 45 (n= 19)	62,1	13,9	58,3	10,3	0,490	56,2	9,2	0,276
< 45 (n= 17)	55,0	6,1	55,3	4,6	0,908	54,5	7,5	0,882
Valor P ₁	0,163							

Análise de colesterol total (CT), VLDL, LDL, HDL e triglicérides (TG) ajustado por idade. O Valor P foi determinado nos intervalos: 0 a 90 dias e 90 a 180 dias. Demais informações conforme legenda da tabela 1 e/ou materiais e métodos.

O mesmo padrão de resposta aos tratamento também foi observado filtrando os dados por idade. Pacientes com menos de 45 anos tiveram maiores reduções de colesterol total e LDL no grupo caso e pacientes com mais de 45 anos tiveram maior redução no grupo controle. Os pacientes com idade maior que 45 anos tinham maior nível de triglicérides no momento basal, especialmente no grupo que foi tratado com Rosuvastatina.

Tabela 5 – Perfil lipídico ajustado por IMC.

lipídio (mg/dL)	Pré		90 dias		Valor P ₂	180 dias		Valor P ₃
	Média	D. P.	Média	D. P.		Média	D. P.	
CT - Rosuvastatina								
≥ 25 (n= 22)	263,3	38,5	266,7	38,0	0,818	261,8	34,4	0,910
< 25 (n=18)	238,5	35,4	225,7	30,8	0,517	199,2	37,5	0,108
Valor P ₁	0,195							
CT - Controle								
≥ 25 (n= 19)	261,6	26,7	256,4	30,8	0,637	239,1	28,3	0,039
< 25 (n= 17)	235,1	44,5	264,1	42,5	0,322	253,9	49,0	0,543
Valor P ₁	0,128							
LDL - Rosuvastatina								
≥ 25 (n= 22)	231,1	42,6	237,4	51,2	0,728	234,6	47,4	0,841
< 25 (n=18)	210,2	49,1	192,7	33,8	0,489	160,4	41,8	0,107
Valor P ₁	0,348							
LDL - Controle								
≥ 25 (n= 19)	226,1	32,5	222,4	32,8	0,767	207,2	24,0	0,093
< 25 (n= 17)	200,3	45,5	237,8	46,8	0,235	220,3	52,5	0,538
Valor P ₁	0,188							
TG - Rosuvastatina								
≥ 25 (n= 22)	131,7	73,6	141,1	67,4	0,726	151,7	72,6	0,475
< 25 (n=18)	136,2	47,6	138,7	42,7	0,923	118,0	46,0	0,537
Valor P ₁	0,892							
TG - Controle								
≥ 25 (n= 19)	126,1	42,8	116,3	35,1	0,516	117,5	31,3	0,548
< 25 (n= 17)	91,4	26,2	146,2	53,8	0,075	110,2	36,6	0,378
Valor P ₁	0,111							
HDL - Rosuvastatina								
≥ 25 (n= 22)	58,5	6,9	57,5	7,6	0,717	55,1	8,9	0,273
< 25 (n=18)	55,6	9,5	60,7	8,0	0,336	54,7	5,5	0,865
Valor P ₁	0,443							
HDL - Controle								
≥ 25 (n= 19)	60,8	12,3	57,3	9,3	0,408	55,3	9,2	0,195
< 25 (n= 17)	53,0	5,1	55,5	3,4	0,387	55,6	5,3	0,459
Valor P ₁	0,196							

Análise de colesterol total (CT), VLDL, LDL, HDL e triglicérides (TG) ajustado por IMC. O Valor P foi determinado nos intervalos: 0 a 90 dias e 90 a 180 dias. Demais informações conforme legenda da tabela 1 e/ou materiais e métodos. IMC = Índice de Massa Corpórea.

Por último, filtrando os dados por IMC, também encontramos o mesmo padrão de resposta. Pacientes com IMC menor do que 25 tiveram maiores reduções de colesterol total e LDL no grupo caso e pacientes com IMC maior do que 25 tiveram maior redução no grupo controle.

4.3 Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

Com o intuito de obter indícios sobre alterações no perfil de oxidação da LDL decorrentes do tratamento, fizemos análise das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico para detectar a presença de malondialdeído (MDA), o qual é produto e marcador de oxidação da LDL (PUHL, 1994).

Figura 7 – O tratamento controle diminuiu a presença de MDA em 180 dias.

Os níveis de MDA foram determinados por método de TBARS nos dois grupos: Rosuvastatina (n=40) e controle (n=36). A análise foi feita em plasma nos diferentes tempos de checagem. Para cada indivíduo o valor médio foi determinado de triplicatas. Os valores acima são expressos em média e erro padrão. MDA = malondialdeído. * = ($P \leq 0,05$).

Não houve alteração significativa quanto a presença de MDA decorrente do tratamento com Rosuvastatina. Entretanto, houve redução significativa de MDA em 180 dias no grupo controle ($P = 0,0301$).

4.4 Auto-anticorpos IgG contra a oxLDL

Detectamos a presença de anticorpos IgG contra a oxLDL, a fim de avaliarmos-os como marcadores no acompanhamento dos tratamentos.

Figura 8 – Tratamento com Rosuvastatina não afetou anticorpos IgG contra a oxLDL.

Os níveis de auto-anticorpos IgG anti-oxLDL foram determinados por ELISA nos dois grupos: Rosuvastatina (n=40) e controle (n=36). A análise foi feita em plasma nos diferentes tempos de checagem. Para cada indivíduo o valor médio foi determinado de triplicatas. Os valores acima são expressos em média e erro padrão. IR = índice de reatividade.

Não houve diferença significativa nos níveis de anticorpos contra a oxLDL decorrente dos tratamentos.

A fim de avaliarmos se o tratamento com Rosuvastatina respondia diferentemente com relação ao sexo na análise de anticorpos IgG anti-oxLDL, filtramos e ajustamos os dados anteriores entre homens e mulheres.

Figura 9 – Resposta de anticorpos IgG anti-oxLDL decorrente do tratamento com Rosuvastatina é semelhante entre homens e mulheres.

Análise de anticorpos IgG anti-oxLDL ajustado por sexo. Métodos conforme figura anterior e/ou materiais e métodos. Rosuvastatina n=40 (h=21/m=19) e Controle n=32 (h=16/m=20). Para cada indivíduo o valor médio foi determinado de triplicatas. Os valores acima são expressos em média e erro padrão. IR = índice de reatividade.

Não foram constatadas diferenças significativas, entre os níveis de IgG anti-oxLDL, decorrentes dos dois tratamentos.

4.5 Auto-anticorpos IgM contra a oxLDL

Detectamos também a presença de anticorpos IgM contra a oxLDL, a fim de avaliarmos-os como marcadores no acompanhamento dos tratamentos.

Figura 10 – Tratamento com Rosuvastatina diminuiu anticorpos IgM anti-oxLDL.

Os níveis de auto-anticorpos IgM anti-oxLDL foram determinados por ELISA nos dois grupos: caso/Rosuvastatina (n=40) e controle (n=36). A análise foi feita em plasma nos diferentes tempos de checagem. Para cada indivíduo o valor médio foi determinado de triplicatas. Os valores acima são expressos em média e erro padrão. IR = índice de reatividade. * = ($P \leq 0,05$).

O tratamento com Rosuvastatina mostrou redução significativa dos níveis de anticorpos IgM contra a oxLDL em 90 dias ($P = 0,01$), de 90 a 180 dias ($P = 0,05$) e de 0 a 180 dias ($p = 0,0008$). O tratamento controle não mostrou alteração significativa dos títulos de anticorpos em nenhum ponto de checagem deste estudo.

A fim de avaliarmos se o tratamento com Rosuvastatina respondia diferentemente com relação ao sexo na análise de anticorpos IgM anti-oxLDL, filtramos e ajustamos os dados anteriores entre homens e mulheres.

Figura 11 – Os níveis de IgM anti-oxLDL em mulheres respondem primeiramente e ao tratamento com Rosuvastatina.

Análise de anticorpos IgM anti-oxLDL ajustado por sexo. Métodos conforme figura anterior e/ou materiais e métodos. Rosuvastatina n=40 (h=21/m=19) e Controle n=32 (h=16/m=20). Para cada indivíduo o valor médio foi determinado de triplicatas. Os valores acima são expressos em média e erro padrão. IR = índice de reatividade. * = (P ≤ 0,05).

Os níveis de IgM anti-oxLDL mantém o mesmo padrão de resposta decorrente do tratamento com Rosuvastatina, quando analisado entre homens e mulheres. Entre 0 a 90 dias de tratamento com Rosuvastatina, os níveis de IgM anti-oxLDL, foram reduzidos significativamente apenas entre as mulheres (P=0,0091). Entre 0 e 180 dias de tratamento com Rosuvastatina, homens e mulheres tiveram redução significativa, P = 0,0003 e P = 0,0008, respectivamente.

4.6 Auto-anticorpos contra APOB-D.

Por fim, detectamos os títulos de anticorpos IgG contra o peptídeo D da apolipoproteína B (ApoB-D), a fim de avaliarmos-lo como marcador no acompanhamento dos tratamentos.

Figura 12 – Tratamento com Rosuvastatina diminuiu anticorpos contra APOB-D.

Os níveis de auto-anticorpos IgG contra a APOB-D foram determinados por ELISA nos dois grupos: Rosuvastatina (n=40) e controle (n=36). A análise foi feita em plasma nos diferentes tempos de checagem. Para cada indivíduo o valor médio foi determinado de triplicatas. Os valores acima são expressos em média e erro padrão. IR = índice de reatividade. * = ($P \leq 0,05$).

O tratamento com Rosuvastatina mostrou redução significativa dos níveis de anticorpos IgG contra o pepD em 90 dias ($P = 0,0067$) e de 0 a 180 dias ($p = 0,0007$). O tratamento controle não mostrou alteração significativa dos títulos de anticorpos em nenhum ponto de checagem deste estudo.

A fim de avaliarmos se o tratamento com Rosuvastatina respondia diferentemente com relação ao sexo na análise de anticorpos IgG anti-ApoBD, filtramos e ajustamos os dados anteriores entre homens e mulheres.

Figura 13 – Em ambos os sexos, os níveis de IgG anti-ApoBD respondem igual ao tratamento com Rosuvastatina.

Análise de anticorpos IgG anti-ApoBD ajustado por sexo. Métodos conforme figura anterior e/ou materiais e métodos. Rosuvastatina n=40 (h=21/m=19) e Controle n=32 (h=16/m=20). Para cada indivíduo o valor médio foi determinado de triplicatas. Os valores acima são expressos em média e erro padrão. IR = índice de reatividade. * = (P ≤ 0,05).

Os níveis de IgG anti-ApoBD mantém o mesmo padrão de resposta decorrente do tratamento com Rosuvastatina, quando analisado entre homens e mulheres. Entre 0 a 90 dias de tratamento com Rosuvastatina, os níveis de IgG anti-ApoBD entre homens e mulheres tiveram redução significativa, P = 0,0230 e P = 0,004, respectivamente. Entre 0 e 180 dias de tratamento com Rosuvastatina, homens e mulheres tiveram redução significativa, P = 0,0055 e P = 0,0013, respectivamente.

4.7 Correlações entre os anticorpos

Com o intuito de observar a possibilidade de correlacionar no acompanhamento dos tratamentos os títulos de IgG e IgM contra a oxLDL, fizemos regressão linear para ver como se comportavam os níveis de IgM em função de IgG.

Figura 14 – Ausência de correlação entre auto-anticorpos IgG e IgM anti-oxLDL.

Correlação entre auto-anticorpos IgG e IgM. Esta análise foi feita considerando todos os resultados obtidos das detecções por ELISA. IR= índice de reatividade. Os níveis de IgG e IgM contra a oxLDL foi determinado em plasma conforme materiais e métodos. O valor P foi determinado por correlação de Pearson. R^2 = coeficiente de determinação.

Quando analisamos a possibilidade de correlacionar os dados de IgG e IgM contra a oxLDL, verificamos que os títulos destes não são correlacionáveis.

A partir destes dados, fomos constatar a paridade de correlação dos anticorpos IgG contra a oxLDL e contra a APOBD.

Figura 15 – Os níveis de anticorpos IgG contra a oxLDL e contra a APOBD são altamente correlacionados.

Correlação entre auto-anticorpos IgG contra a oxLDL e contra a apoBD. Esta análise foi feita considerando todos os resultados obtidos das detecções por ELISA. IR= índice de reatividade. Os níveis de IgG e IgM contra a oxLDL foi determinado em plasma conforme materiais e métodos. O valor P foi determinado por correlação de Pearson. R^2 = coeficiente de determinação.

Os níveis plasmáticos de IgG anti-oxLDL e anti-ApoBD são diretamente correlacionáveis ($P<0,0001$).

4.8 Correlação entre LDL e anticorpos

Verificamos a correlação entre os níveis de LDL, fator de risco preditivo a aterosclerose, e os níveis dos anticorpos do estudo.

Figura 16 – LDL se correlaciona inversamente com IgG anti-oxLDL nos pacientes tratados com Rosuvastatina.

Correlação entre LDL e anticorpos IgG anti-oxLDL. As figuras mostram a correlação destas variáveis nos dois tratamentos. Os resultados obtidos das detecções por ELISA e as de Perfil Lipídico (materiais e métodos). IR= índice de reatividade. O valor P foi determinado por correlação de Pearson. R^2 = coeficiente de determinação.

A LDL se correlaciona de forma inversa com anticorpos IgG anti-oxLDL apenas no grupo tratado com Rosuvastatina ($P=0,028$). No grupo controle não encontramos correlação destas variáveis.

A partir destes dados, fomos verificar se havia correlação da LDL com anticorpos IgM anti-oxLDL, igualmente aos anticorpos da classe IgG.

Figura 17 – LDL não se correlaciona com anticorpos IgM anti-oxLDL.

Correlação entre LDL e anticorpos IgM anti-oxLDL. As figuras mostram a correlação destas variáveis nos dois tratamentos. Os resultados obtidos das detecções por ELISA e as de Perfil Lipídico (materiais e métodos). IR= índice de reatividade. O valor P foi determinado por correlação de Pearson. R^2 = coeficiente de determinação.

Diferentemente dos anticorpos IgG anti-oxLDL, não houve correlação da LDL com anticorpos IgM anti-oxLDL em nenhum dos grupos do estudo.

Para finalizar, verificamos se havia correlação da LDL com anticorpos IgG anti-ApoBD, igualmente aos anticorpos da mesma classe IgG anti-oxLDL.

Figura 18 – Os anticorpos IgG contra a oxLDL e contra o pepD são altamente correlacionados.

Correlação entre LDL e anticorpos IgG anti-ApoBD. As figuras mostram a correlação destas variáveis nos dois tratamentos. Os resultados obtidos das detecções por ELISA e as de Perfil Lipídico (materiais e métodos). IR= índice de reatividade. O valor P foi determinado por correlação de Pearson. R^2 = coeficiente de determinação.

De forma semelhante a correlação de LDL com anticorpos IgG anti-oxLDL, os anticorpos IgG anti-ApoBD são correlacionados de forma inversa com a LDL apenas no grupo tratado com Rosuvastatina. Apesar da semelhança entre as correlações, a intensidade de correlação entre LDL e anticorpos IgG anti-ApoBD foi maior ($P=0,003$).

5 DISCUSSÃO

Nesta dissertação, nós estudamos o efeito de um fármaco para redução de colesterol, a Rosuvastatina. O propósito deste é reduzir o colesterol e assim diminuir a probabilidade do paciente sofrer um evento agudo cardiovascular, tal como um infarto coronariano ou um acidente vascular cerebral. Grande número de estudos são executados analisando o poder da família das estatinas em conseguir realizar este propósito. O valor preditivo e qualitativo de um estudo sobre o potencial benéfico do fármaco irá depender dos parâmetros utilizados no estudo. Os parâmetros mais utilizados são perfil lipídico (colesterol total, triglicérides, LDL e HDL) e marcadores inflamatórios (PCR e citocinas). A lógica destes parâmetros, em principal os inflamatórios, é que o evento aterosclerótico, que é um evento inflamatório local (injúria do endotélio, reparo, etc.), pode ser mensurado pela presença de citocinas circulantes e PCR e que estes marcadores irão ter um valor preditivo de futuros eventos cardiovasculares. A maioria dos estudos envolvendo uma grande quantidade de indivíduos mostra que, como esperado, alguns indivíduos irão responder ao fármaco e diminuir seus níveis de colesterol circulante enquanto outros não irão responder ou terão uma baixa resposta ao fármaco. Em termos de marcadores inflamatórios a situação é a mesma.

Com isto em mente, esta dissertação foi desenvolvida para tentar responder a seguinte questão:

É possível em um estágio inicial definir indivíduos que irão responder ao fármaco, não apenas em relação a diminuição de colesterol, mas também em relação a outros componentes associados a eventos cardiovasculares, que podem ter relevância mais profunda na progressão aterosclerótica?

Anticorpos contra a oxLDL podem, funcionalmente, ser associados ao processo aterosclerótico. A presença de oxLDL circulante foi detectada por anticorpos monoclonais (Gidlund, 1996) e depois a presença do fragmento peptídico, apoBD, em camundongos transgênicos TCP.

Os anticorpos contra a oxLDL e apoBD podem ser um parâmetro preditivo de resposta ao fármaco? Baseado neste direcionamento, discutiremos os resultados obtidos até o momento.

Analisando a resposta do perfil lipídico aos estágios iniciais dos tratamentos (180 dias), apesar das diminuições nas médias de colesterol total e de LDL em ambos grupos do estudo, não houve alterações que fossem consideradas significativas, quanto a estes marcadores. Entretanto quando avaliamos, o efeito dos

tratamentos em diferentes perfis dentro dos grupos, como sexo, idade e IMC, constatamos que existem também diferentes perfis basais e de respostas ao fármaco para estes marcadores.

Apesar da diferença de resposta aos tratamentos não mostrarem alterações significativas ($P < 0,05$) no acompanhamento de perfil lipídico ajustado por estes diferentes perfis populacionais (sexo, idade e IMC) dentro dos grupos de estudo, serão discutidos os indícios de como estes perfis são influenciados de forma diferente pelos dois tratamentos.

Com base nas médias e porcentagem de rejeição da hipótese nula (valor P), os valores preditivos de eficácia de tratamento para redução de colesterol, como colesterol total e LDL, as mulheres foram mais influenciadas pelo tratamento farmacológico. Enquanto que os homens, responderam melhor ao tratamento controle. Quando avaliamos a resposta dos tratamentos entre indivíduos de faixas etárias diferentes, também encontramos diferentes perfis de resposta. Indivíduos de maior faixa etária (≤ 45 anos) foram mais influenciados pelo tratamento controle, enquanto indivíduos de idade menor do que 45 anos, aparentam melhores resultados com o tratamento farmacológico. E, dentro deste raciocínio, surpreendentemente, indivíduos com índice de massa corpórea (IMC) maior ou igual a 25, foram mais influenciados pelo tratamento controle, enquanto que pacientes com IMC menor do que 25 tiveram melhores resultados decorrentes do tratamento farmacológico.

Resumindo, e reforçando a idéia de que alguns indivíduos respondem ao tratamento farmacológico com base em um marcador e outros indivíduos não respondem ou tem baixa resposta, o conjunto destes dados exemplifica como diferentes perfis populacionais podem ter diferentes padrões de resposta.

Buscando indícios de alterações oxidativas na LDL decorrentes dos tratamentos, realizamos o teste de TBARS para detectar a presença de MDA circulante nos indivíduos. Em contrapartida as citações de alguns autores (CAMPO, 2007; FONSECA, 2005) referentes a efeitos anti-oxidantes resultantes do tratamento com Rosuvastatina, não houve alteração significativa dos níveis de MDA decorrentes do tratamento farmacológico. Entretanto, no tratamento controle houve, em 180 dias, reduções significativas dos níveis circulantes de MDA. O que talvez possa ser resultado ou compreendido através de componentes com poder anti-oxidante derivados da dieta.

Adiante, quando avaliamos o valor preditivo dos anticorpos contra a oxLDL e contra o fragmento peptídico D da apoB (apoBD) na eficácia para acompanhamento de pacientes tratados com Rosuvastatina, tivemos bons e expectantes resultados. Neste estudo estes marcadores responderam de forma específica e mais eficientemente ao tratamento farmacológico.

Para demonstrar esta afirmação, retomemos os dados obtidos. Apesar dos níveis circulantes dos anticorpos IgG contra a oxLDL não sofrerem alterações significativas decorrentes dos tratamentos, a análise de anticorpos IgM contra a oxLDL e IgG contra a apoBD, mostraram alterações bastante significativas apenas nos grupos tratados com Rosuvastatina. Anticorpos IgM anti-oxLDL e também anticorpos IgG anti-apoBD foram os marcadores mais específicos da resposta ao tratamento farmacológico.

Encontramos redução significativa dos níveis circulantes destes dois anticorpos já em 90 dias de tratamento com Rosuvastatina e essa redução se manteve constante em 180 dias. Interessante nesta etapa das análises, é verificar que apesar de encontrarmos correlação diretamente proporcional entre os níveis circulantes de IgG anti-oxLDL e de IgG anti-apoBD (figura 15), quando analisamos estes no acompanhamento dos tratamentos, encontramos um padrão de resposta totalmente diferente. Desta forma, o anticorpo IgG anti-apoBD mostrou qualidades e sensibilidade superior no acompanhamento do tratamento farmacológico.

A partir da verificação de que os anticorpos IgM anti-oxLDL e IgG anti-apoBD tem padrão de resposta semelhante ao tratamento farmacológico, correlacionamos os dados de IgG e IgM anti-oxLDL, para ver se havia correlação entre as duas classes de anticorpos. Os resultados nos mostram que, para oxLDL, não podemos comparar resultados obtidos da classe IgG com a classe IgM.

Outro ponto interessante e importante para avaliarmos o valor preditivo destes anticorpos quanto a eficácia no acompanhamento da resposta ao tratamento com Rosuvastatina, é a semelhança e constância do padrão de resposta, mesmo em indivíduos de sexos opostos.

Por último, verificamos correlação da LDL, alvo principal do tratamento com Rosuvastatina, e principal fator de composição dos grupos (hipercolesterolêmicos e $LDL \geq 160\text{mg/dL}$), com os níveis dos anticorpos contra a oxLDL e contra a apoBD. Encontramos correlação inversamente proporcional da LDL apenas com os anticorpos de classe IgG (anti-oxLDL e anti-apoBD). O que pode abrir futuro campo

de estudo e discussão sobre o impacto positivo ou negativo decorrente do tratamento com Rosuvastatina.

Finalizando, para estabelecimento da hipótese de que estes marcadores têm valor preditivo para este tipo de acompanhamento, e se esse impacto é positivo ou negativo, será necessária futuras investigações e comparações dos dados destes marcadores com outros marcadores e variáveis decorrentes de processos inflamatórios e oxidativos, ambos bem estabelecidos dentro do processo aterosclerótico.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, estudamos a eficácia de anticorpos anti-oxLDL e anti-apoBD no acompanhamento do tratamento com Rosuvastatina em pacientes hipercolesterolêmicos.

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

1. Em 180 dias de tratamento não encontramos alterações significativas no perfil lipídico decorrentes de ambos tratamentos: Rosuvastatina e controle;
2. O tratamento controle resultou em redução significativa dos níveis circulantes de MDA;
3. Anticorpos IgM anti-oxLDL e IgG anti-apoBD foram sensíveis como marcadores e mostraram reduções significativas apenas nos pacientes tratados com Rosuvastatina;
4. Os anticorpos acima são precocemente sensíveis (90 dias) ao tratamento com Rosuvastatina;
5. Os níveis de anticorpos das classes IgM e IgG contra a oxLDL não são correlacionáveis;
6. Existe correlação diretamente proporcional entre anticorpos IgG anti-oxLDL e anti-apoBD;
7. Os níveis de LDL se correlacionam de forma inversamente proporcional aos níveis de anticorpos IgG anti-oxLDL e IgG anti-apoBD.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ANTONOPOLOUS, A. S. et al. Statins as anti-Inflammatory agents in atherogenesis: molecular mechanisms and lessons from the recent clinical trials. **Curr. Pharm. Des.**, v. 18, n. 11, p. 1519-1530, 2012.
- BERLINER, J. A.; LEITINGER, N.; TSIMIKAS, S. The role of oxidized phospholipids in atherosclerosis. **J. Lipid Res.**, p. 207-212, 2009.
- BLAKE, G. J.; RIDKER, P. M. Are statins anti-inflammatory? **Curr. Control Trials Cardiovasc.**, v. 1, n. 3, p. 161-165, 2000.
- BONNIE, K. et al. The influence of pravastatin and atorvastatin on markers of oxidative stress in hypercholesterolemic humans. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 51, n. 17, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. **Vigilância em saúde: dados e indicadores selecionados**. Brasília, 2006. n. 4.
- 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.
- CAMPO, V. L.; CARVALHO I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 425-430, 2007.
- CHOU, M. Y. et al. Oxidation-specific epitopes are important targets of innate immunity. **J. Intern. Med.**, v. 263, p. 479-488, 2008.
- DAMASCENO, N. R. et al. Soy protein isolate induces the oxidizability of LDL and the generation of oxidized LDL autoantibodies in rabbits with diet-induced atherosclerosis. **J. Nutr.**, v. 130, n. 11, p. 2641-2647, 2000.
- DAMASCENO, N. R. et al. 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.
- DAVIGNON, J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. **J. Am. Heart Assoc.**, v. 109, p. 39-43, 2004.
- DEPARTAMENTO DE ATEROSCLEROSE DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 88, 2007. Supl. I.

· De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ERKKILÄ, T. A.; NÄRVÄNEN, O.; LEHTO, S.; UUSITUPA, M. I. J.; YLÄHERTTUALA, S. Autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein and cardiolipin in patients with coronary heart disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, p. 204-209, 2000.

FONSECA, F. A. H. Farmacocinética das estatinas. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 85, 2005. Supl. V.

GIDLUND, M. et al. 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.

GIELEN, S. et al. Risk factor management: antiatherogenic therapies. **Eur. J. Cardiovasc Prev. Rehabil.**, v. 16, n. 2, p. S29-S36, 2009.

GLASS, C. K.; WITZTUM, J. L. Atherosclerosis: the road ahead. **Cell**, v. 104, p. 503-516, 2003.

GOTTLIEB, M. G. V.; BONARDI, G.; MORIGUCHI, E. H. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. **Sci. Med.**, Porto Alegre: PUCRS, 2005. v. 15, n. 3

GOTTO, A. M. Antioxidants, statins, and atherosclerosis. **J. Am. Coll Cardiol.** v. 41, n. 7, p. 1205-1210, 2003.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease, **N. Engl. J. Med.**, v. 352, p. 1685-1695, 2005.

HASSALL, D. G. Three probe flow cytometry of a human foam-cell forming macrophage. **Cytometry**, v. 13, n.4, p. 381-388, 1994.

HEVONOJA, T.; PENTIKAINEN, M. O.; HYVONEN, M. T.; KOVANEN, P. T.; ALAKORPELA, M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1488, n. 3, p. 189-210, 2000.

HOLTZMAN, J. L. **Atherosclerosis and oxidant stress: a new perspective.** Minnesota: Springer, 2008. 289 p.

HULTHE, J. et al. 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.

JIALAL, I. et al. Effect of Hydroxymethyl Glutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitor Therapy on High Sensitive C-Reactive Protein Levels. **Am. Heart Assoc. Circul.**, v. 103, p. 1933-1935, 2001.

JESSUP, W. et al. Oxidized lipoproteins and macrophages. **Vascul. Pharmacol.**; v. 38, n. 4, p. 239-248, 2002.

KINLAY, S. Potential vascular benefits of statins. **Am. J. Med.**, v. 118, n. 12A, p. 625-675, 2005.

KONES, R. Rosuvastatin, inflammation, C-reactive protein, JUPITER, and primary prevention of cardiovascular disease – a perspective. **Drug Des., Devel. Ther.**, v. 4, p. 383–413, 2010.

LACZIK, R. et al. Assessment of IgG antibodies to oxidized LDL in patients with acute coronary syndrome. **Lupus**, v. 20, p. 730–735, 2011.

LEVE, F. **Participação da GTPASE RHO na dinâmica do complexo juncional apical e do citoesqueleto da actina na progressão do câncer colorretal**. 2011. 103 f. Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, 2011.

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

LIBBY, P.; RIDKER P. M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **J. Am. Heart Assoc. Circul.**, v. 105, p. 1135-1143, 2002.

McTAGGART, F. Comparative pharmacology of rosuvastatin. **Atheroscl.**, v. 4, supl. I, n. 1, p. 9-14, 2003.

MEDEIROS, A. M. B. et al. Antibodies against Oxldl and acute coronary syndrome. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 95, n.1, p. 371–382, 2010.

MINAME, M. H. Are statins beneficial in heart failure? **Arq. Bras. de Cardiol.**, n. 5, p. 904-914, 2007.

MOZAFFARIAN, D. et al. Beyond established and novel risk factors – Lifestyle risk factors for cardiovascular disease. **Circulation**, v. 117, p. 3031-3018, 2008.

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.

NODE, K. et al. Short-term statin therapy improves cardiac function and symptoms in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. **Am. Heart Assoc. Circul.**, v. 108, p. 839-843, 2003.

NOHRIA, A. et al. Statins inhibit Rho kinase activity in patients with atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 205, n. 2, p. 517-521, 2009.

PERK, J. Risk factor management: a practice guide. **Eur. J. Cardiovasc Prev. Rehabil.** v. 16, s. 2, p. 24-28, 2009.

PUHL, H.; WAEG, G. Esterbauer H. Methods to determine oxidation of low-density lipoproteins. **Meth. Enzym.**, v. 233, p. 425-441, 1994.

REQUENA, J. R. et al. Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein. **Biochem. J.**, v. 322, pt. 1, p. 317-325, 1997.

RODRIGUEZ, A. L. et al. Statins, inflammation and deep vein thrombosis: a systematic review. **J. Thromb. Thrombolysis**, v. 33, n. 4, p. 371-382, 2012.

ROSS, R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, n. 24, p. 115-126, 1999.

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 lesion of atherosclerosis. **Science**, v. 29, n. 93, p. 1332-1339, 1973.

RUNDEK, T.; NAINI, A.; SACCO, R. Atorvastatin decreases the coenzyme Q10 level in the blood of patients at risk for cardiovascular disease and stroke. **Arch. Neurol.**, v. 61, p. 889-892, 2004.

SÁ, M. P. B. O. et al. Proteína C-reativa de alta sensibilidade em pacientes com infarto agudo do miocárdio na emergência cardiológica. **Rev. Brás. Clín. Méd.**, v. 7, p. 219-224, 2009.

SCHULTE, S.; SUKHOVA, G. K.; LIBBY, P. Genetically programmed bases in TH1 and Th2 immune responses modulate atherogenesis. **Am. J. Pathol.**, v. 172, n. 6, p. 1500-1508, 2008.

SHAW, P. et al. 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.

SHISHEHBOR, M.H.; BRENNAN M.L.; RONNIER J. XIAOMING, A. Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. **J. Am. Heart Assoc.**, p. 426-431, 2003.

SJOBERG, B. G.; SU, J.; DAHLBOM, I.; GRONLUND, H.; WIKSTROM, M.; FROSTEGARD, J. Low levels of IgM antibodies against phosphorylcholine - a potential risk marker for ischemic stroke in men, **Atherosclerosis**, v. 203, n. 2, p. 528-532, 2009.

TIWARI, A. An overview of statin-associated proteinuria. **Drug Discov. Today**, v. 11, n. 9-10, p. 458-464, 2006.

U. S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. **NIH Publication**, n. 02-5215, 2002.

WILSON, A. M. et al. The novel role of C-reactive protein in cardiovascular disease: risk marker or pathogen. **Int. J. Cardiol.**, v. 106, p. 291-297, 2006.

WINTHER, M. P. et al. Nuclear factor KappaB signaling in atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 25, n. 5, p. 904-914, 2005.

WITZTUM, J. L.; STEINBERG, D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. **Am. Soc. Clin. Invest.**, v. 88, p. 1785-1792, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORRVING, B. **Global atlas on cardiovascular disease prevention and control**. Geneva: World Health Organization, 2011. 2000 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevention of cardiovascular disease: guidelines for assessment and management of total cardiovascular risk**. Geneva, 2007. 232 p.

ZAREV, S. et al. Extent of copper LDL oxidation depends on oxidation time and copper/LDL ratio: chemical characterization. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 1, n. 420, p. 68-78, 2003.