UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Mecanismos de formação da LDL eletronegativa (LDL⁻):
efeito da glicoxidação e da lipólise**

Katia Kioko Yuahasi

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Titular Dulcineia S. Parra Abdalla

São Paulo
2005

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010936

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Y94m Yuahasi, Katia Kioko
Mecanismos de formação da LDL eletronegativa (LDL⁻) :
efeito da glicoxidação e da lipólise / Katia Kioko Yuahasi. --
São Paulo, 2005.
100p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Abdalla, Dulcinéia Saes Parra

I. Bioquímica clínica : Medicina 2. Lipídio : Bioquímica
clínica 3. Diabetes mellitus I. T. II. Abdalla, Dulcinéia
Saes Parra, orientador.

616.0756 CDD

Katia Kioko Yuahasi

Mecanismos de formação da LDL eletronegativa (LDL⁻): efeito da glicoxidação e da lipólise

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Titular Dulcineia Saes Parra Abdalla
orientador/presidente

SILVIA BERLANGA M. BARROS
1º. examinador

ANDRÉ ARPARD FALUDI
2º. examinador

São Paulo, 28 JUNHO de 2005.

Aos meus pais, Massuo e Maria, que são base da minha formação, sob todos os aspectos.

E minhas irmãs, Célia, Edna e Regina que sempre me apoiam no meu caminho a ser percorrido.

AGRADECIMENTOS

À prof. Dulcineia S.P. Abdalla pela orientação, paciência e pela oportunidade de ter realizado o mestrado em seu laboratório.

As prof^{as}. Adelaide José Vaz e Kioko Takei que foram muito importantes nos experimentos realizados neste experimento.

Ao prof. Eduardo Purgatto pela colaboração, disponibilidade e pela atenção dedicada que foram importantes nos meus experimentos e pelo empréstimo de equipamentos, e prof. Hélio Steffani pela colaboração e por ter cedido seu laboratório para a realização de alguns experimentos.

À prof. Catarina de Fátima Pereira Teixeira pela doação da enzima fosfolipase A₂ e, prof. Silvia Berlanga, Ana Campa pelo empréstimo de reagentes e equipamentos.

Aos colegas do laboratório, Isabela, Edimar, Elaine, Emerson, Maurício, Renato, Vivian. Laila, Daniela e Simone. E Silene, que sempre estava disposta a ajudar nos problemas do laboratório.

Aos amigos que me ajudaram nos experimentos realizados, em alguma fase deste projeto, Marlito, Rodrigo, Eduard e Isabela. E para todos as pessoas que me ajudaram indiretamente para a finalização deste projeto.

Meus sinceros agradecimentos aos “voluntários doadores de sangue e pacientes” que contribuíram para a realização deste projeto.

À FAPESP pelo apoio financeiro fornecido por meio da bolsa de mestrado.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs = produtos finais de glicação avançada (advanced glycation endproducts)

AGL = ácidos graxos livres

AP-1 = proteína ativadora transcripcional 1

Apo B-100 = apolipoproteína B-100

Apo C = apolipoproteína C

Apo C-II = apolipoproteína C-II

Apo E = apolipoproteína E

BHT = hidroxitolueno butilado

BSTFA = N,O-bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

C_{18:2}-OOH = hidroperóxido de linoleato de colesterol

CEL = N^ε-(carboxietil)lisina

CML = N^ε-(carboximetil)lisina

COX = óxidos de colesterol

CT = colesterol total

3-DG = 3-deoxiglicosona

DM I = Diabetes Mellitus tipo 1

DM II = Diabetes Mellitus tipo 2

DO = densidade óptica

EDTA = Ácido Etilenodiaminatetracético

ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay

ELISA-mAb = ELISA-anticorpo monoclonal

ELISA-misto = ELISA com anticorpos mono e policlonal

ELISA-poli = ELISA-anticorpo policlonal

ERONs = espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

GAGs = glicosaminoglicanos

GO = glioxal

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

Hb = hemoglobina

HEPES = hepes sodium salt (1-Piperazineethane sulfonic acid, 4-(2-hydroxyethyl)-monosodium salt)

HRP = Horseradish peroxidase
ICAM-1 = molécula de adesão intracelular 1
FFI: 2-(2-furoil)-4(5)-furanil-1H-imidasole
ICAM-1 = molécula de adesão intracelular 1
IFG = intolerantes à glicose em jejum
Ig = imunoglobulinas
IGT = Intolerantes à glicose
IDL = lipoproteína de densidade intermediária
IL-1 = interleucina 1 β
IL-6 = interleucina 6
LDL = lipoproteína de baixa densidade
nLDL = LDL nativa
LDL⁻ = LDL eletronegativa
15-LO = 15-lipoxigenase
LOOH = hidroperóxidos lipídicos
LPL = lipoproteína lipase
Lys-PC = lisofosfatidilcolina
MCP-1 = proteína 1 quimiotática para monócitos
MGO = metilglioxal
NADPH oxidase = Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase
NEFA = ácido graxo livre
ox-NEFA = NEFA oxidado
NF- κ B = nuclear factor kappa B
 $\cdot$ NO = óxido nítrico
O₂ $\cdot^-$ = radical superóxido
 $\cdot$ OH = radical hidroxila
PLA₂ = fosfolipase A₂
cPLA₂ = fosfolipase A₂ citosólica
sPLA₂ = fosfolipase A₂ secretória
iPLA₂ = fosfolipase A₂ independente de Ca²⁺
PAF-AH = fator de ativação de plaquetas - acetil hidrolase
PMSF = p-metilsulfonilfluoreto
RAGE = receptor para AGEs

Smase = esfingomielase

TBS = tampão tris salino

TG = trigliceróis

TNF = fator α de necrose tumoral

TRIS = tris-hidroxi-metil-aminometano

VCAM-1 = molécula de adesão vascular 1

VLDL = lipoproteína de densidade muito baixa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - grupos estudados.....	33
Tabela 2 - Reatividade do anticorpo policlonal anti-LDL.....	43

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Possíveis vias de formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs).....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 2. Estrutura química de alguns AGEs.....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 3. Glicação autooxidativa.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 4. Diagrama mostrando vários efeitos da LPL na íntima da artéria.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 5. Mecanismo pró-aterogênico da sPLA₂-II.....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 6. Curva padrão de LDL⁻ para a análise quantitativa das amostras utilizando o anticorpo monoclonal anti-LDL⁻. Cada ponto da curva representa a média de triplicatas.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 7. Curva padrão de LDL⁻ para a análise quantitativa das amostras utilizando o anticorpo policlonal anti-LDL⁻. Cada ponto representa a média de triplicatas.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 8. Curva padrão de LDL⁻ para a análise quantitativa das amostras utilizando o anticorpo policlonal e monoclonal anti-LDL⁻. Cada ponto representa a média de triplicatas.....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 9. Curva padrão de AGEs para a análise quantitativa das amostras utilizando o anticorpo monoclonal anti-AGE. Cada ponto representa a média de duplicatas.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 10. Efeito da glicação da LDL na formação de LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do teste ELISA utilizando o anticorpo monoclonal anti-LDL⁻. Ensaio realizado com LDL total incubada com glicose (200 mM) em PBS, pH 7,4.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 11. Efeito da glicação da LDL na formação de LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do imunoensaio ELISA utilizando o anticorpo policlonal anti-LDL⁻. O ensaio de glicação refere-se à incubação da LDL total com 200 mM de glicose em PBS, pH 7,4.</i>	<i>51</i>
<i>Figura 12. Efeito da glicação da LDL na formação de LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do imunoensaio ELISA misto. O ensaio de glicação refere-se à incubação da LDL total com 200 mM de glicose em PBS, pH 7,4 e gentamicina.....</i>	<i>51</i>

Figura 13. Efeito da glicação *in vivo* na formação de LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do imunoensaio ELISA misto. Dados referem-se à determinação plasmática em pacientes DM I (n=31), C I (n= 6), DM II (n=38), C II (n =6), IG (n=13). Legenda: DM I (diabete Mellitus tipo 1), C I (controle 1), DM II (Diabetes Mellitus tipo 2), C II (controle 2), IGT (intolerante à glicose)..... 52

Figura 14. Concentração de Frutosamina (nmol/mg de proteína). Determinação nas alíquotas de LDL obtidas do ensaio realizado com LDL total incubada com 200 mM glicose em PBS, pH 7,4..... 52

Figura 15. Concentração de AGEs (ugl/mg de proteína). Determinação nas alíquotas de LDL obtidas do ensaio realizado com LDL total incubada com 200 mM glicose em PBS, pH 7,4 representado por 200 mM e o controle, LDL total incubada com PBS pH 7,4 nos tempos 0 (basal) e 7 dias, em temperatura ambiente..... 53

Figura 16. Concentração de AGEs (μg/mL). A concentração de AGE foi determinada através do imunoensaio ELISA competitivo. Dados referem-se à determinação plasmática em pacientes DM I (n=32), C I (n= 9), DM II (n=39), C II (n = 11), IG (n=15). Legenda: DM I (diabete Mellitus tipo 1), C I (controle 1), DM II (Diabetes Mellitus tipo 2), C II (controle 2), IGT (intolerante à glicose)..... 53

Figura 17. Lipoperoxidação da LDL após glicação. A LDL total foi incubada com glicose em PBS, pH 7,4 até 7 dias (referente à fig.10, 11 e 12). (A) Concentração de hidroperóxidos de ésteres de colesterol (CE-OOH, μM/mmol colesterol). (B) Concentração total dos óxidos de colesterol (COX, ng/mg colesterol)..... 54

Figura 18. Determinação bioquímica. (A) triglicérides colesterol total (mg/dL) (B) VLDL (mg/dL) (C) HDL (mg/dL) (D) colesterol total HDL (mg/dL) (E) LDL (mg/dL). Dados referem-se à determinação plasmática em pacientes DM I (n=32), C I (n=9), DM II (n=39), C II (n =11), IGT (n=15). Legenda: DM I (diabete Mellitus tipo 1), C I (controle1), DM II (Diabetes Mellitus tipo 2), C II (controle 2), IGT (intolerante à glicose)..... 55

Figura 19. Determinação bioquímica. (A) Hemoglobina glicada (%) (B) Frutosamina (mg/dL) (C) glicose (mg/dL). Dados referem-se à determinação plasmática em pacientes DM I (n=32), C I (n= 9), DM II (n=39), C II (n =11), IGT (n=15). Legenda: DM I (diabete Mellitus tipo 1), C I (controle 1), DM II (Diabetes Mellitus tipo 2), C II (controle 2), IGT (intolerante à glicose)..... 56

Figura 20. Correlação entre a concentração de LDL⁻ (μg/mL) e glicose (mg/dL) no grupo DM I..... 57

Figura 21. Efeito da PLA₂ sobre a LDL na formação de LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do teste ELISA utilizando o anticorpo

monoclonal anti-LDL⁻. O pool de plasma foi incubado com 50 ng/mL PLA₂, albumina e gentamicina durante 4 horas, a 37°C..... 58

Figura 22. Efeito da PLA₂ sobre a LDL na formação de LDL⁻. Concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do teste ELISA utilizando o anticorpo policlonal anti-LDL⁻. O ensaio de lipólise refere-se à incubação do pool de plasma com 50 ng/mL PLA₂, albumina e gentamicina durante 4 horas, a 37°C. 58

Figura 23. Efeito da PLA₂ sobre a LDL na formação de LDL⁻. Concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do teste ELISA-misto. O ensaio de lipólise refere-se à incubação do pool de plasma com 50 ng/mL PLA₂, albumina e gentamicina durante 4 horas, a 37°C.. 59

Figura 24. Lipoperoxidação da LDL após incubação PLA₂. O plasma foi incubado com PLA₂ em PBS, pH 7,4 até 7 dias (referentes à fig. 22, 23 e 24). (A) Concentração de hidroperóxidos de ésteres de colesterol (CE-OOH, μ mol/mmol colesterol). (B) Concentração total dos óxidos de colesterol (COX, ng/mg colesterol).. 59

Figura 25. Mobilidade eletroforética da LDL após incubação com PLA₂ 60

Figura 26. Efeito da lipólise *in vitro* na formação da LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do teste ELISA com anticorpo monoclonal anti-LDL⁻. Ensaio realizado com pool de plasma incubada com ou sem LPL (1,71 mU), albumina e gentamicina durante 4 horas, a 37°C..... 61

Figura 27. Efeito da lipólise *in vitro* na formação da LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do teste ELISA utilizando o anticorpo policlonal anti-LDL⁻. Ensaios (n=6) realizados com pool de plasma incubado com LPL (1,71 uM), albumina e gentamicina durante 4 horas, a 37°C..... 62

Figura 28. Efeito da lipólise *in vitro* na formação da LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do teste ELISA misto. Ensaios (n=6) realizados com pool de plasma incubado com LPL (1,71 uM), albumina e gentamicina durante 4 horas, a 37°C.. 62

Figura 29. Lipoperoxidação da LDL após incubação LPL. Ensaio realizado com pool de plasma incubada com ou sem LPL (1,71 mU), albumina e gentamicina durante 4 horas, a 37°C. O controle refere-se ao plasma sem LPL. (A) Concentração de hidroperóxidos de ésteres de colesterol (CE-OOH, μ mol/mmol colesterol). (B) Concentração total dos óxidos de colesterol (COX, ng/mg colesterol). Legenda: 0 (basal), 2 h (2 horas) e 4 h (4 horas)..... 63

Figura 30. Efeito da lipólise *in vivo* na formação de LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do teste ELISA utilizando o anticorpo monoclonal anti-LDL⁻. Os dados referem-se à concentração de LDL⁻ presente na LDL total

isolada dos indivíduos saudáveis no jejum (tempo zero) e no estado pós-prandial de 2 (n=4) e 4 horas (n=5)..... 64

Figura 31. Efeito da lipólise *in vivo* na formação de LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do teste ELISA utilizando o anticorpo policlonal anti-LDL⁻. Os dados referem-se à concentração de LDL⁻ presente na LDL total isolada dos indivíduos saudáveis no jejum (tempo zero) no estado pós-prandial de 2 (n = 4) e 4 (n = 5) horas. 64

Figura 32. Efeito da lipólise *in vivo* na formação de LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do teste ELISA misto. As análises de ELISA (item 3.9.5) foram realizadas em triplicata. Os dados referem-se à concentração de LDL⁻ presente na LDL total isolada dos indivíduos saudáveis no jejum (tempo zero) no estado pós-prandial de 2 (n = 4) e 4 (n = 5) horas..... 65

Figura 33. Lipoperoxidação da LDL após a lipólise *in vivo*. Produtos de oxidação da LDL isolada do plasma de indivíduos saudáveis no jejum (tempo zero) e no estado pós-prandial de 2 e 4 horas (referente fig. 17). A) Concentração de hidroperóxidos de ésteres de colesterol (CE-OOH, $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ colesterol). (B) Concentração total dos óxidos de colesterol (COX, ng/mg colesterol)..... 65

Figura 34. Perfil lipídico (mg/dL). Dados referem-se à dosagem sanguínea de indivíduos saudáveis obtidos no jejum (0) e no período pós-prandial 2 e 4 horas, com seus respectivos tempo zero..... 66

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. LDL	11
1.2. DIABETE MELLITUS	13
1.3. GLICAÇÃO	14
1.4. LIPÓLISE	21
1.4.1. LPL (lipoproteína lipase) (EC 3.1.1.34)	21
1.4.2. PLA ₂ (fosfolipase A ₂) (EC 3.1.1.4)	25
1.4.3. Influência da lipólise sobre a LDL	29
2. OBJETIVOS	31
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS	32
3.2. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE DIABÉTICOS E CONTROLE	32
3.3. DADOS DOS INDIVÍDUOS ESTUDADOS	33
3.4. SEPARAÇÃO DA FRAÇÃO LDL POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO	33
3.5. ISOLAMENTO DA FRAÇÃO LDL ⁻	34
3.6. ENSAIO DE LIPÓLISE	35
3.6.1. Efeito da lipólise <i>in vitro</i> pela ação da LPL	35
3.6.2. Efeito da lipólise <i>in vitro</i> pela ação da PLA ₂	35
3.6.3. Efeito do estado pós-prandial (lipólise <i>in vivo</i>)	35
3.7. PREPARAÇÃO DA LDL GLICOXIDADA	36
3.8. TESTES DE AVALIAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO	36
3.8.1. Determinação dos óxidos de colesterol	36
3.8.2. Determinação de hidroperóxidos lipídicos	37
3.9. DETECÇÃO DE LDL ⁻ POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA /ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)	38
3.9.1. Biotinilação do anticorpo monoclonal antiLDL ⁻	38
3.9.2. Método de ELISA-anticorpo monoclonal (ELISA- mAb)	38
3.9.3. Método de ELISA-anticorpo policlonal (ELISA-poli Ac)	41
3.9.4. Método de ELISA com anticorpos mono e policlonal (ELISA-misto)	43
3.9.5. Sensibilidade dos ELISAs	46
3.10. TESTE DE AVALIAÇÃO DA GLICOXIDAÇÃO	46
3.10.1. Preparo do padrão Albumina-AGE	46
3.10.2. Determinação dos AGEs pelo teste ELISA (AGE-ELISA)	47
3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
4. RESULTADOS	50
4.1. EFEITOS DA GLICAÇÃO E OXIDAÇÃO SOBRE A FORMAÇÃO DA LDL	50
4.2. EFEITOS DA FOSFOLIPASE A ₂ E DA LIPOPROTEÍNA LÍPASE SOBRE A FORMAÇÃO DA LDL	57
4.2.1. Fosfolipase A ₂ (PLA ₂)	57
4.2.2. Lipólise <i>in vitro</i> com LPL	60
4.2.3. Lipólise <i>in vivo</i>	63
5. DISCUSSÃO	67
5.1. EFEITOS DA GLICAÇÃO E OXIDAÇÃO SOBRE A FORMAÇÃO DA LDL	67
5.2. EFEITOS DA FOSFOLIPASE A ₂ E DA LIPOPROTEÍNA LÍPASE SOBRE A FORMAÇÃO DA LDL	71
5.2.1. Fosfolipase A ₂ (PLA ₂)	71
5.2.2. Lipólise <i>in vitro</i> com LPL	74
5.2.3. Lipólise <i>in vivo</i>	75

6. CONCLUSÕES.....	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

RESUMO

RESUMO

A fração plasmática da lipoproteína de baixa densidade (LDL) é formada por partículas de diferentes tamanhos, carga e densidade. Baseada na diferença de carga das partículas, a LDL pode ser subfracionada em LDL nativa (nLDL) e LDL eletronegativa (LDL⁻). A LDL⁻ está presente no plasma e possui propriedades aterogênicas e pró-inflamatórias, assim como, possui menor concentração de antioxidantes lipossolúveis, maior concentração de dienos conjugados, alterações conformacionais da apolipoproteína B-100 e menor afinidade para o receptor da LDL em comparação com a nLDL. Concentrações elevadas de LDL⁻ têm sido observadas em pacientes com alto risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, incluindo hipercolesterolemia familiar, diabetes. Considerando-se que os mecanismos envolvidos na formação endógena da LDL⁻ ainda não estão elucidados, neste estudo foi investigado o efeito da glicoxidação e da lipólise sobre a partícula LDL para avaliar a contribuição destes processos para a formação da LDL⁻ *in vitro* e *in vivo*. As modificações químicas da LDL e da imunorreatividade com anticorpo monoclonal anti-LDL⁻ foi analisada antes e depois da incubação do plasma com lipoproteína lipase (LPL) ou fosfolipase A2 (PLA₂), assim como mimetizando-se a lipólise intravascular. Além disso, na lipólise *in vivo* foi monitorado no período pós-prandial em indivíduos normolipidêmicos para investigar a LDL⁻ formada endogenamente. A contribuição da glicoxidação para a geração de LDL⁻ foi avaliada *in vitro* pela incubação da LDL com glicose. O efeito da glicoxidação endógena foi monitorada pela medida, *ex-vivo*, dos produtos de glicação avançada (AGEs) e LDL⁻ no plasma de pacientes diabéticos tipo I (DM I), tipo II (DM II) e indivíduos intolerantes à glicose (IGT). O processo de glicação não enzimática, *in vitro*, resultou no aumento da concentração de LDL⁻. Os indivíduos dos grupos DM I, DM II e IGT apresentaram concentrações plasmáticas elevadas de LDL⁻ em relação aos seus respectivos controles, enquanto observou-se aumento de AGEs apenas nos grupos DM I e DM II. O processo de lipólise *in vitro* mediado pela LPL e PLA₂, induziu aumento significativo da concentração de LDL⁻;

entretanto, somente pela ação da LPL foi associada com modificações oxidativas. Em concordância, o processo de lipólise *in vivo* (pós-prandial) também promoveu aumento significativo da concentração de LDL⁻ associado com modificações oxidativas. Conclusão, nossos dados mostram que, glicoxidação e de lipólise, poderiam contribuir na formação da LDL⁻ *in vivo*.

ABSTRACT

ABSTRACT

The low density lipoprotein (LDL) fraction in blood plasma is formed by particles with different size, charge and density. Based on particle charge differences, LDL fraction may be separated into native (nLDL) and electronegative (LDL⁻) subfractions. LDL⁻ is present in blood plasma and has atherogenic and pro-inflammatory properties, as well as, lower concentrations of lipid soluble antioxidants, higher content of conjugated dienes, conformational alterations of apolipoprotein B-100 and lower affinity by LDL receptor in comparison to nLDL. Increased LDL⁻ concentrations have been found in subjects with high risk for cardiovascular diseases, including those with familiar hypercholesterolemia, diabetes and hyperlipidemia. Considering that the mechanisms involved in the endogenous generation of LDL⁻ are not yet well elucidated, in this study the effect of glucooxidation and lipolysis of LDL particles was investigated in order to evaluate their contribution to *in vitro* e *in vivo* LDL⁻ formation. LDL chemical modifications and its reactivity towards a monoclonal anti-LDL⁻ antibody were analyzed before and after incubation of either plasma or LDL with lipoprotein lipase (LPL) or phospholipase A2 (PLA₂) as an *in vitro* lipolysis biomimetic system. Moreover, *in vivo* lipolysis was monitored at the post-prandial period in normolipidemic subjects to investigate LDL⁻ endogenously formed. The contribution of glucooxidation to LDL⁻ generation was evaluated *in vitro* by incubating LDL with glucose. The effect of endogenous glucooxidation was monitored by ex-vivo measurement of advanced glycation end products (AGES) and LDL⁻ in blood plasma of type I (DM I) and II (DM II) diabetic patients, as well as, in subjects with glucose intolerance (IGT). The *in vitro* non-enzymatic glycation resulted in increased LDL⁻ formation. The DM I, DM II and IGT groups showed higher LDL⁻ concentrations than the respective control groups, while AGEs were increased only in DM I e DM II groups. The *in vitro* lipolysis mediated by LPL and PLA₂ induced a significant increase of LDL⁻; however, only LPL action was also associated to LDL oxidative modification. In accordance, *in vivo* lipolysis (post-prandial) also promoted a significant increase of

LDL⁻ levels associated to LDL oxidative modification. In conclusion, our data show that both, glycoxidation and lipolysis, could contribute to *in vivo* LDL⁻ generation.

1.INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. LDL

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) é constituída por um *core* hidrofóbico, contendo principalmente ésteres de colesterol e triglicérides e colesterol não esterificado, e uma superfície anfipática de fosfolípidos associados com colesterol livre e uma molécula de apolipoproteína B-100 (apo B-100) (63). Os principais fosfolípidos são fosfatidilcolina e esfingomiéline, que constituem 70% e 30% do total, respectivamente. A apoB 100 está irreversivelmente associada com moléculas de fosfatidilcolina (96, 117, 160) e o colesterol interage, preferencialmente, com esfingomiéline (96, 105). A fração LDL do plasma é formada por um conjunto de partículas que variam quanto à densidade (1,019-1,063 g/mL), tamanho, carga e potencial aterogênico (191).

A apo B-100 é uma glicoproteína, que contém 4536 resíduos de aminoácidos com peso molecular 510 kDa (86, 195), sendo importante na manutenção da integridade estrutural e no controle da interação da partícula LDL. A conformação da apoB-100 é determinada pela sua interação com lípidos e ligação com grupos funcionais internos, principalmente cisteína (194). Modificações na estrutura da partícula LDL podem resultar na perda da estabilidade da partícula, o que pode resultar em agregação e posterior fusão das partículas de LDL (124). Além disso, a apoB-100 deve ter a capacidade de se ajustar a mudanças estruturais e de composição, pois no decorrer do processo metabólico lipídico a VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) origina a LDL. A apoB-100 tem estrutura supramolecular, com seqüências orientadas da região N para o C terminal da seguinte forma: $\alpha 1\text{-}\beta 1\text{-}\alpha 2\text{-}\beta 2\text{-}\alpha 3$ (153). Esta estrutura depende principalmente do estado físico dos lípidos do *core* da LDL (39).

A fração total de LDL pode ser subfracionada por meio da cromatografia de troca iônica, baseada na diferença de carga das partículas, nas subfrações LDL nativa (nLDL) e LDL eletronegativa, LDL^- e LDL^{-2} , que representam o *pool* de

partículas com maior eletronegatividade e aumento do conteúdo de produtos oxidados (34). A LDL⁻ é encontrada predominantemente na subfração pequena e densa da LDL dos indivíduos normolipidêmicos, enquanto que em hipercolesterolêmicos ocorre na subfração leve. Por outro lado, em hipertrigliceridêmicos a LDL⁻ está presente nas subfrações densa, intermediária e leve da LDL (143).

A subfração LDL⁻ tem propriedades aterogênicas e inflamatórias porque induz a produção da proteína 1 quimiotática para monócitos (MCP-1) e de interleucina-8, envolvidas no recrutamento de leucócitos (43, 142), sendo ainda citotóxica para células endoteliais (48, 69). Além disso, possui menor concentração de antioxidantes lipossolúveis, maior concentração de dienos conjugados, óxidos de colesterol, alterações conformacionais da apolipoproteína B-100 e menor afinidade para o receptor da LDL (13, 32, 156). Alguns estudos divergem quanto à concentração de ácidos siálicos, tendo sido descrito que a LDL⁻ pode ter concentrações elevadas (48) ou baixas (169).

O aumento do conteúdo de triacilgliceróis, ácidos siálicos, apo E e apo C-III pode estar relacionado à carga negativa da LDL⁻ (48). Além disso, a LDL⁻ apresenta baixas concentrações de aminoácidos sensíveis à oxidação, como lisina, histidina, tirosina e cisteína (156).

Concentrações elevadas de LDL⁻ têm sido observadas em pacientes com alto risco de doença cardiovascular, incluindo hipercolesterolemia familiar (141, 145, 182), hipertrigliceridemia (143), diabetes mellitus (112, 113, 144, 146, 196), pacientes em hemodiálise (204), e também em algumas situações como exercícios físicos intensos (22) e no estado pós-prandial (174). *In vitro*, tem se demonstrado a formação de partículas eletronegativa de LDL pela incubação da LDL na presença de células endoteliais (128) e hemoproteínas (55).

O mecanismo de formação de LDL⁻ não está elucidado e diversos eventos podem contribuir para a formação desta partícula, tais como: (i) maior interação da LDL com a parede arterial (67), (ii) ingestão de oxidantes ou geração de lipoproteínas remanescentes oxidadas no período pós-prandial (137), (iii) oxidação

da LDL no plasma (165), (iv) glicação não enzimática (144) e (v) aumento da concentração de ácidos graxos livres na partícula (22).

1.2. Diabete Mellitus

Diabetes mellitus é uma doença metabólica caracterizada pela hiperglicemia, que resulta da deficiência da secreção e/ou ação da insulina. Pode ser classificada em (i) diabetes tipo I, decorrente de deficiência de secreção de insulina, (ii) diabetes tipo II, decorrente da combinação de resistência à ação de insulina e resposta compensatória inadequada de secreção de insulina, (iii) intolerantes à glicose (IGT) e intolerantes à glicose em jejum (IFG), que possuem concentrações de glicose normal (≥ 100 mg/dL e menor 126 mg/dL) ou teste de tolerância à glicose oral após 2 horas de ≥ 140 mg/dL mas < 200 mg/dL. Pacientes com IGT e/ou IFG são agora referidos como “pré-diabéticos”, indicando o alto risco de desenvolvimento de diabetes (6).

Diversas vias são ativadas pela hiperglicemia, incluindo ativação da proteína quinase C, principalmente a isoforma β , glicação não enzimática e aumento da via poliol e hexosamina (188, 24). As anormalidades metabólicas que caracterizam o diabetes, particularmente a hiperglicemia, o aumento de ácidos graxos livres e a resistência à insulina, induzem mecanismos moleculares que alteram a estrutura e a função dos vasos sanguíneos. Estes incluem o aumento do estresse oxidativo, a alteração na transdução de sinais intracelulares (por exemplo, a ativação da proteína C reativa) e ativação dos RAGEs (receptores dos produtos de glicação avançada), que resultam em (a) diminuição da disponibilidade de $^{\bullet}\text{NO}$ (óxido nítrico), (b) aumento da produção de endotelina levando à vasoconstrição, (c) ativação do NF- κ B e AP-1 e (d) aumento da produção de fatores pró-trombóticos (40).

1.3. Glicação

A glicação não enzimática, ou reação de Maillard (figura 1), é uma modificação pós-translacional que ocorre nas proteínas devido à reação com açúcares redutores. A reação inicia-se por uma condensação espontânea dos açúcares redutores (por exemplo, glicose) e metabólitos intermediários (por exemplo triose fosfato, glioxal e metilglioxal) com o grupo amino livre da lisina, hidroxilisina e arginina (44) levando à formação de uma base de Schiff ou aldimina (instável), temporariamente estabilizada pelo rearranjo de Amadori (isomerização da aldossilamina para 1-amino-1-deoxi-2-cetose), que resulta na formação da frutosamina, que é mais estável (5) e representa a etapa inicial do processo de glicação. A reação é reversível até a formação do composto de Amadori (frutosamina), sendo dependente da concentração do composto de origem e do tempo de incubação (79).

A frutosamina, gerada a partir da glicose, pode passar por uma ciclização para formar uma estrutura de anel furanose hemiacetal ou piranose, o que aumenta sua estabilidade (5). Este pode decompor-se formando produtos mais reativos, tais como, α -oxoaldeídos (α -dicarbonil), particularmente glioxal (GO), metilglioxal (MGO) e 3-deoxiglicosona (3-DG) (170). A 3-DG pode ser formada pelo rearranjo não-oxidativo e hidrólise do produto de Amadori e pela frutose-3-fosfato, intermediário da via do poliol (131). MGO pode ser produzido pela via não-enzimática, a partir da decomposição espontânea do fosfato triose, autooxidação de carboidratos e degradação de glicose e, em menor quantidade, pela reação de Maillard e peroxidação lipídica (111). GO é formado pelas reações de fragmentação oxidativa da base de Schiff (via Namiki), peroxidação lipídica e fragmentação da frutose-fosfato (111).

Além disso, a frutosamina pode passar por uma cascata de reações de desidratação, condensação, fragmentação, oxidação e ciclização que promovem modificações químicas irreversíveis, resultando nos produtos finais de glicação avançada (AGEs/ *advanced glycation endproducts*) (79), incluindo N^ε-(carboximetil)lisina (CML) (56), N^ε-(carboxietil)lisina (CEL) (1) e pirralina (79) (fig.

2). A formação de AGEs, a partir da reação da proteína com açúcar redutor, é dependente da temperatura (41, 108). Observam-se concentrações elevadas de AGEs no processo de envelhecimento (9), no diabetes (100), aterosclerose, insuficiência renal crônica e doença de Alzheimer (158).

A CML (fig. 2) é a principal estrutura AGE encontrada *in vivo* (134), sendo formada por diversas vias, a saber: I) clivagem oxidativa do resíduo frutossil-lisina (97, 202), na região entre C-2 e C-3 do resíduo glicado da lisina, na presença de oxigênio (3); II) diretamente pela autooxidação da glicose ou dos adutos de Amadori pré-formados (186); III) pela modificação com GO, gerado diretamente da autooxidação da glicose catalisada por metais (187); IV) produção de glicolaldeído, gerado pelo sistema da mieloperoxidase (7) e V) a partir dos processos de glicoxidação ou peroxidação lipídica (ácidos graxos insaturados) (119).

A CEL, um homólogo da CML, pode ser formada pela reação não enzimática do MGO com resíduos de lisina (1). Outra possível origem, seria a partir da 3-DG formada pela reação do grupo dicarbonil do açúcar com a proteína seguida pela clivagem carbono-carbono, ou, através da decomposição do açúcar formando MGO (186). A CEL pode ser formada também a partir de triose fosfato pela: i) reação direta do grupo amino com a triose fosfato e posterior eliminação do grupo fosfato, ou, ii) decomposição espontânea, ou catalisada por amina, da triose fosfato para MGO (1).

Figura 1. Possíveis vias de formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs). FFI: 2-(2-furoil)-4(5)-furanil-1H-imidasole; GOLD (dímero glioxal-lisina), MOLD (dímero metil-glioxal-lisina) (14).

Entre os açúcares encontrados *in vivo*, a glicose reage mais lentamente na reação de glicação em comparação com frutose, glicose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato (79). Os monossacarídeos existem em equilíbrio com sua forma enediol, que podem se autooxidar na presença de metais de transição para formar radical enediol (190). Este reduz o oxigênio molecular para gerar radical superóxido (O_2^-), produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e intermediários radiculares, cetoaldeído dicarbonil, que reagem com amino ácidos de proteína formando cetoiminas que participam na formação dos AGEs (4). Este processo é chamado de glicação autooxidativa (figura 3).

Figura 2. Estrutura química de alguns AGEs. FFI: 2-(2-furoil)-4(5)-furanil-1H-imidazol; AFGP: 1-alkil-2-formil-3,4-diglicosil pirrol; GOLD (dímero glicoxal-lisina), MOLD (dímero metil-glicoxal-lisina) (14).

Além dos efeitos diretos dos AGEs, como modificação da atividade do fator de crescimento, estes interagem com receptores específicos para AGEs, denominados RAGE (receptor para AGEs), que são membros da superfamília de receptores de imunoglobulinas (Ig) presentes na superfície celular (153). Os RAGES estão presentes nas células endoteliais, monócitos/macrófagos, linfócitos T, fibroblastos, célula muscular lisa vascular e neurônios (36). Outros receptores que interagem com os AGEs têm sido caracterizados, nos quais incluem-se: (i) receptores *scavenger* da classe B, tais como, o SR-BI (123), CD36 (120), o receptor-1 tipo lectina da LDL oxidada (lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1/LOX-1) (78); (ii) a galetina-3 (200); receptor *scavenger* da classe A (SR-A)(8) e (iii) proteínas ligantes de AGEs, incluindo a p60 homóloga à oligossacariltransferase-48 (OST-48) e a p90 homóloga à 80K-H, que contribuem

para o processamento dos AGEs do compartimento extra e intracelular (89). Os AGEs inibem a captação seletiva de ésteres de colesterol e o efluxo de colesterol pelo receptor SR-BI (123), além de induzirem a expressão dos receptores *scavenger* em culturas de macrófagos (75).

A expressão de RAGEs aumenta em algumas células durante a inflamação e o diabetes (4). A interação AGE-RAGE estimula respostas inflamatórias, incluindo aumento de expressão de moléculas de adesão, como a molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) e molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1), quimiotaxia para monócitos com liberação de fator α de necrose tumoral ($\text{TNF}\alpha$) e interleucina 1β (IL-1) (82), aumento da permeabilidade vascular e da trombogenicidade das células endoteliais (66).

Figura 3. Glicação autoxidativa. A glicose é convertida a cetoaldeído dicarbonil via radical enediol. Este cetoaldeído pode reagir com grupos amino presentes em proteínas e formar AGEs, catalizado por metais de transição (M) e o radical superóxido gerado pode ser convertido para radical hidroxil via reação de Fenton (4).

No caso das lipoproteínas, a formação dos AGEs pode ocorrer nos grupos amino livres dos fosfolipídios e na molécula de apolipoproteína B (apo B 100), localizados na superfície da LDL (25). A glicação ocorre principalmente no resíduo lisina, que possui carga positiva (11), ocorrendo em múltiplos locais na apo-B 100, predominantemente no domínio que compreende os resíduos 1.388 a 1.454. Embora esta região esteja distante do domínio de ligação ao receptor da LDL, tem sido proposto que a modificação deste sítio por AGEs induz uma mudança conformacional suficiente para alterar a interação receptor-ligante (25,185). A glicação *in vitro* de 2-5% dos resíduos de lisina da molécula da ApoB-100, resulta na diminuição de 5-25% da depuração da LDL *in vivo*, sendo esta redução proporcional ao grau de glicação da LDL (164). No caso dos lipídeos, o grupo amino dos fosfolipídeos reage com a glicose formando complexos lipídeo-AGEs, o que promove modificações oxidativas nos ácidos graxos insaturados. Em pacientes diabéticos, os níveis dos complexos lipídeos-AGEs estão mais elevados que os níveis de ApoB100-AGEs (28).

A LDL glicada é mais facilmente oxidada em relação à LDL nativa (87), havendo aumento da carga negativa da partícula modificada, sendo que o nível da peroxidação lipídica depende da concentração de metais de transição, como o ferro, o que demonstra que a glicação contribui para a oxidação da LDL (139). *In vitro*, as proteínas glicadas produzem radicais livres de oxigênio (37, 116, 148). A radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), gerado pela reação de Fenton entre Fe^{2+} e H_2O_2 (produzido pela autooxidação do produto de Amadori), tem um importante papel na formação da CML (118).

A LDL glicoxidada *in vitro* estimula a formação de espécies reativas de oxigênio e inibe mais fortemente a dilatação dependente do endotélio, quando comparada à LDL oxidada. (58). A glicação e a oxidação de proteínas resultam em efeitos similares em vários aspectos, sugerindo uma interação entre estas reações (172). Tem sido observado que a glicação e a peroxidação lipídica *in vitro* ocorrem concomitantes na LDL modificada pela glicose (70). A glicoxidação da LDL resulta em redução da afinidade com o receptor de LDL e, como consequência reduz o

seu catabolismo hepático, aumentando o depósito de ésteres de colesterol em macrófagos e promovendo disfunção endotelial (162, 189).

Estudos de Moro *et al.* (1999) (112) e Schleicher *et al.* (1981) (152) demonstraram concentrações mais elevadas de LDL glicada em pacientes diabéticos, havendo correlação positiva entre os níveis de LDL glicada com as concentrações de glicose, colesterol total e triacilglicerídeos, assim como, correlação negativa com os níveis de HDL. A concentração de LDL glicada também se correlaciona positivamente com o conteúdo de proteínas glicadas no plasma de diabéticos insulino-dependentes (99). Matsui *et al.* (106) demonstraram uma correlação negativa entre a glicação da LDL e o tamanho da partícula da LDL, sugerindo que o tamanho da LDL poderia predizer o nível de glicação.

A subfração da LDL glicada, isolada de pacientes diabéticos do tipo 1 e de indivíduos normais, possui quantidade elevada de triacilglicerídeos, tendo sido demonstrado que a LDL rica em triacilglicerídeos é pouco reconhecida por receptores B/E da LDL (85). Por outro lado, a LDL glicada é degradada mais rapidamente que a LDL nativa, quando incubada com macrófagos humanos (85), promovendo aumento da síntese e acúmulo de ésteres de colesterol proporcional ao grau de glicação da partícula (98). A captação da LDL modificada pelos macrófagos não é regulada pela concentração intracelular de colesterol, resultando na formação das células espumosas (*foam cells*) (130). Zimmermann *et al.* (2001) (201) demonstram que a lipoproteína lipase (LPL) aumenta a ligação, captação e degradação de LDL glicada em macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, sugerindo que a modificação do resíduo lisina não afeta o processo mediado pela LPL.

Em geral, moléculas modificadas por AGEs são reconhecidas e internalizadas por endocitose mediada por receptor de superfície celular, sendo degradadas intracelularmente e subsequente liberando AGEs de baixo peso molecular, no processo conhecido como “segunda geração de AGEs” (180). Modificações da LDL por peptídeos-AGEs, resultantes do catabolismo de proteínas modificadas por AGEs, são mais intensas em diabéticos e pacientes com insuficiência renal (25). Estudos com LDL modificada através da interação

com albumina-AGEs mostram uma indução da captação da lipoproteína por macrófagos em cultura, principalmente para a LDL isolada de diabéticos (49). Por outro lado, níveis elevados de LDL-AGEs em diabéticos causa diminuição da sua depuração pelos receptores B/E em ratos transgênicos para receptores de LDL humana (25, 150). A LDL isolada de primatas não humanos diabéticos tem maior afinidade com proteoglicanos arteriais, comparados com animais não diabéticos, o que poderia facilitar a retenção da LDL na camada íntima arterial e contribuir para a aterogenicidade da LDL de diabéticos (53).

Um dos mecanismos propostos para a formação da LDL⁻ é o processo de glicoxidação, no qual as reações de glicação e oxidação modificam resíduos lisina da apoB e aumentam a produção da LDL⁻ (113). Tem sido demonstrado que o aumento da proporção de LDL⁻ no diabético pode ser relacionado com a reação de glicação (146), pois a proporção de LDL⁻ e LDL glicada diminui depois da otimização do controle glicêmico (144).

1.4. Lipólise

1.4.1. LPL (lipoproteína lipase) (EC 3.1.1.34)

A lipoproteína lipase (LPL) é uma enzima envolvida no metabolismo intravascular das lipoproteínas ricas em triglicérides e suas anormalidades genéticas e funcionais estão diretamente relacionados com patologias vasculares (129). A LPL é sintetizada pelo tecido adiposo, macrófagos e células musculares (50), fixando-se na parede endotelial capilar e, em menor concentração, no endotélio arterial via interação com glicosaminoglicanos (38). A LPL também é expressa em outros locais, incluindo sistema nervoso, coração, fígado, adrenal, macrófagos, rim, pâncreas e pulmão (107).

A função fisiológica da LPL é hidrolisar triglicérides de quilomícrons, VLDL e IDL no endotélio capilar com a liberação de monoglicerídeos, diglicerídeos e

ácidos graxos (129), que são estocados como triglicérides (tecido adiposo), ou, oxidados para produção de energia (músculo) (107). Para exercer sua atividade enzimática a LPL precisa estar na sua forma dimérica (107), na qual é estabilizada pela interação com glicosaminoglicanos (GAGs) presentes na superfície endotelial. Esta associação também permite o ancoramento ao sítio ativo da enzima, o que é necessário para sua atividade, sendo que a dissociação da LPL aos monômeros resulta em perda de sua atividade (129). Esta inativação depende da temperatura, pH e força iônica (54). No entanto, monômeros de LPL estão presentes em concentrações significantes na circulação e no tecido extrahepático, como tecido adiposo e coração (183). Estes monômeros se associam com partículas de remanescentes das lipoproteínas, o que aumenta sua depuração pelo fígado (15), sendo que a forma monomérica interage preferencialmente com a LDL (129). Além da atividade lipolítica, a LPL atua como importante ligação entre a lipoproteína e os proteoglicanos da superfície celular, o receptor de lipoproteína e os componentes da matrix extracelular (62, 104). A interação da LPL com a LDL é principalmente mediada por lípidos (23). Outra propriedade característica desta enzima é a inibição da LPL pelos ácidos graxos (131). A albumina possui maior afinidade com os ácidos graxos em comparação com a LPL, por isso é muito utilizada em ensaios *in vitro* com esta finalidade (17).

Os ácidos graxos livres, formados durante a lipólise dos quilomícrons e VLDL pela ação da LPL, modulam a atividade enzimática e liberam a LPL do espaço endotelial (151). Além disso, estes ácidos graxos liberados pela LPL aumentam a permeabilidade arterial para a entrada de LDL e, conseqüentemente, promovem a retenção desta partícula nos vasos sangüíneos (138). Os ácidos graxos livres são fontes de energia para: (i) a fagocitose pelos macrófagos na presença de baixa concentração de glicose (197), (ii) o aumento da produção de $\text{TNF}\alpha$ pelos monócitos/macrófagos (103), (iii) as mudanças pró-aterogênicas na produção de proteoglicanos pelas células musculares lisas e (iv) indução da síntese de LPL pelos macrófagos (129) (figura 4a).

A LPL pode ter algumas ações potencialmente relevantes para o desenvolvimento da aterosclerose (figura 4b), através de diversos mecanismos,

tais como: (i) aumento de adesão de monócitos no endotélio, possivelmente devido à habilidade da forma dimérica da LPL de se ligar aos proteoglicanos no endotélio e superfície dos monócitos; (ii) aumento da produção de proteoglicanos pelos macrófagos (129) e (iii) efeito proliferativo na célula muscular lisa vascular, o que é independente da presença de lipoproteínas (103).

A. Effect of LPL on lipoprotein and cellular entry into arterial intima

B. Effect of LPL on lipoproteins and cells in the arterial intima

Figura 4. Diagrama mostrando vários efeitos da LPL na íntima da artéria. TG= triglicérides, FFA= ácido graxo livre. (129).

A hidrólise eficiente das lipoproteínas ricas em triglicérides depende da apoproteína presente na superfície, particularmente a apolipoproteína C-II (apoC-II), que é um ativador da LPL. No entanto, a LPL parece interagir diretamente com moléculas de fosfolípidos na ausência de apolipoproteínas (102).

Durante a lipólise, ocorrem modificações secundárias, decorrentes das mudanças estruturais e o rearranjo dos componentes da superfície e do *core* da partícula lipoprotéica, devido à remoção de triglicérides. A estrutura em α -hélice da apoB100 (associada à superfície lipídica) diminui e os domínios em folha β também se alteram por ação da LPL (174).

1.4.2. *PLA₂ (fosfolipase A₂) (EC 3.1.1.4)*

Fosfolipases representam uma superfamília de esterases que hidrolisam a ligação éster dos glicerofosfolípidos. Podem exercer vários efeitos fisiológicos e patológicos, como no metabolismo dos fosfolípidos, na liberação de mediadores em resposta a estímulos de citocinas, proliferação celular (71), no sistema de reparo de danos provocados pela peroxidação lipídica, como importante mecanismo de defesa antibacteriana (89) e controle de vírus (56), remoção de células apoptóticas (41) e exercer vários tipos de toxicidade (34). Estas enzimas variam em relação ao tamanho molecular, sítio e modo de ação na molécula de fosfolípido e na sua regulação (77).

A PLA₂ (fosfatídeo *sn*-2 acil hidrolase) constitui uma superfamília de enzimas que catalisam a hidrólise especificamente na ligação ester *Sn*-2 dos fosfolípidos, gerando quantidades equimolares de ácidos graxos livres e lisofosfolípidos (10, 34). A família das enzimas PLA₂ é classificada através da comparação estrutural, na qual são divididas em três categorias: (i) PLA₂ secretória (sPLA₂), que requer Ca²⁺ em concentrações milimolares para exercer sua atividade; (ii) PLA₂ citosólica (cPLA₂), que requer concentrações micromolares de Ca²⁺ e (iii) PLA₂ independente de Ca²⁺ (iPLA₂), cuja atividade é completamente independente de Ca²⁺ (168).

Estas enzimas contêm várias pontes dissulfeto, as quais conferem rigidez, estabilidade e resistência à desnaturação térmica, alterações de pH e proteção contra a degradação proteolítica (34, 71). O pH ótimo para a atividade da PLA₂ encontra-se na faixa de pH neutro ao básico (34).

Neste estudo, utilizou-se a PLA₂ isolada do veneno da *Bothrops asper*, ou seja, a miotoxina básica PLA₂. Existem 4 isoformas da miotoxina presentes no veneno, que são chamadas de I, II, III e IV e são classificadas como PLA₂s grupo II, embora somente as miotoxinas I e III possuem atividade enzimática (93). A miotoxina III é uma Asp-49 PLA₂ de 122 resíduos e está presente na forma de um dímero (61).

A PLA₂ é expressa constitutivamente em órgãos relacionados com a resposta inflamatória, incluindo pulmão, timo, intestino, fígado e medula óssea (77). Além disso, pode ser encontrada em locais que não estão envolvidos no processo inflamatório, como próstata, cartilagem, placenta e glândula lacrimal (77). Vários tipos celulares podem secretar a sPLA₂, incluindo células mesangiais, células musculares lisas, células endoteliais, plaquetas, neutrófilos, macrófagos e células hepáticas. A produção e secreção desta enzima pelas células inflamatórias e os hepatócitos é induzida pelas citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α (77). A concentração e atividade da PLA₂ é baixa em indivíduos saudáveis, porém aumenta em doenças inflamatórias, como por exemplo na sepsis (178) e pancreatite aguda (29).

A PLA₂ pode ser encontrada na artéria humana normal, principalmente associada com as células musculares lisas, na camada íntima da lesão aterosclerótica inicial (136), sendo que na placa aterosclerótica localiza-se na região rica em macrófagos, no core lipídico acelular do ateroma (136). Além disso, na lesão aterosclerótica isolou-se LDL com concentrações baixas de fosfolípidos comparadas com a LDL plasmática (199), que pode ser resultante da hidrólise de fosfatidilcolina pela ação da PLA₂ (124).

As modificações mediadas pela PLA₂ podem resultar em agregação da partícula (processo reversível), porém não gera fusão (processo irreversível) (125), assim como, a formação de LDL pequena e densa com maior afinidade por

proteoglicanos e GAGs (149). Além disso, observou-se que a lipólise na presença de albumina provoca mudanças conformacionais na apoB 100 e reorganização dos lípidos (64).

Na parede arterial, a sPLA₂-IIA pode exercer efeitos pró-aterogênicos por três mecanismos (figura 4): (1) liberação de concentrações relativamente altas de mediadores lipídicos, como ácidos graxos livres oxidados e lisofosfolípidos, que podem afetar a função e propriedades de células vasculares no local de acúmulo de lipoproteínas (72); (2) modificação da apoB-100 para uma forma mais aterogênica, através do aumento da afinidade de ligação aos proteoglicanos, tornando a LDL mais suscetível a modificações enzimáticas e oxidativas e (3) acúmulo de lipoproteínas na parede arterial pela indução da agregação e fusão da apoB-100 da lipoproteínas ligadas aos proteoglicanos (71).

Figura 5. Mecanismo pró-aterogênico da sPLA₂-II. A Lipoproteína contendo apoB 100 e sPLA₂, através da sua interação com proteoglicanos, pode facilitar a hidrólise enzimática do fosfolípide da lipoproteína. NEFA (ácido graxo livre), NEFA oxidado (ox-NEFA) e lisofosfatidilcolina (Lyso-PC) ligam-se à albumina ou permanecem associados com a lipoproteína. Estes eventos podem induzir agregação ou fusão das lipoproteínas, a qual é favorecida pelos proteoglicanos presentes na íntima. A LDL previamente modificada pela sPLA₂-IIA pode ser posteriormente modificada pela esfingomielase (Smase) e 15-lipoxigenase (15-LO). NEFA, ox-NEFA e lisofosfatidilcolina podem induzir processos celulares pró-inflamatórios, como expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais, migração de monócitos e diferenciação para macrófagos e aumento da secreção de proteoglicanos pelas células musculares. A liberação de citocinas no local pode estimular a síntese e secreção de sPLA₂-IIA (71).

A LDL modificada pela PLA₂ aumenta a fração molar de esfingomielina na monocamada lipídica da superfície da partícula, tornando-a melhor substrato para a ação da Smase, em relação à nLDL (72).

1.4.3. *Influência da lipólise sobre a LDL*

Outra possível via de formação da LDL⁻ seria durante a lipemia pós-prandial, tendo-se observado um aumento dos níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) no plasma e nas lipoproteínas, durante a fase pós-prandial, que podem ser originados da dieta (175). O aumento da LDL⁻, associado com o aumento de hidroperóxidos plasmáticos, durante a fase pós-prandial, tem sido também sugerido como um evento relacionado com a modificação *in vivo* da LDL, decorrente da lipólise (175). Deste modo, a dieta pode ser a fonte direta de hidroperóxidos na lipoproteína, o que facilitaria a peroxidação lipídica nas lipoproteínas contendo LOOH pré-formados, principalmente na presença de catalisadores (metais de transição), que clivam a ligação O-O dos LOOH, gerando radicais alcóxila e peróxila. Adicionalmente, tem sido demonstrado que os hidroperóxidos lipídicos podem ativar a 15-lipoxigenase nas células endoteliais, o que também tem sido implicado na peroxidação da LDL (177).

Estudos *in vitro* indicam que a proporção de LDL⁻ aumenta de forma concentração-dependente com o conteúdo do ácidos graxos não esterificados, o que poderia contribuir para aumentar a carga negativa das lipoproteínas (22). A interação lipídeo-proteína é um fator determinante para a estrutura secundária e a conformação da apo-B 100 na LDL, que é afetada pela introdução e remoção de lipídeos durante o metabolismo de lipoproteínas. Na LDL⁻, a oxidação dos lipídeos provoca a desestabilização da estrutura supramolecular e a apo-B pode mudar de conformação, sendo que o elevado conteúdo de hidroperóxidos lipídicos é suficiente para alterar a interação da interface água-lipídeo na partícula de LDL (174). Resultados obtidos por Parasassi *et al.* (2001) (126), demonstram que a LDL⁻ possui estrutura alterada na superfície lipídica e a apoB-100 desnaturada, na

qual a origem da mudança estrutural foi sugerida ser devido à presença de lipoperóxidos e lisofosfolipídeos.

2.OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Considerando-se que os mecanismos envolvidos na formação endógena da LDL⁻ ainda não estão elucidados e que os processos de glicoxidação e lipólise poderiam contribuir para a formação destas partículas *in vivo*, esse estudo visa investigar os efeitos destes processos sobre a formação da LDL⁻ *in vitro* e *in vivo*, através da caracterização química das modificações da LDL e da imunorreatividade aos anticorpos monoclonais anti-LDL⁻.

2.1. Objetivos específicos

- Verificar o efeito da glicoxidação e da lipólise da LDL, *in vitro*, quanto à modificação da eletronegatividade da partícula e reatividade com anticorpos monoclonais anti-LDL⁻
- Comparar o efeito das modificações promovidas *in vitro* com aquelas detectadas na subfração LDL⁻ isolada de indivíduos diabéticos.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Determinações bioquímicas

Os testes bioquímicos de HDL-colesterol, triacilgliceróis (TG), colesterol total (CT), glicose, frutossamina e Hemoglobina (Hb) glicada foram realizados por meio de kits comerciais da Labtrade® e Bioclin® em indivíduos em jejum (12 horas). A concentração da LDL foi calculada através da equação de Friedewald.

3.2. Obtenção das amostras de diabéticos e controle

Foi utilizado plasma obtido de sangue total colhido com tubos de EDTA (1mg/mL) de pacientes diabéticos, indivíduos intolerantes à glicose (grupo IGT) e controle 1 atendidos nos Instituto de Cardiologia Dante Pazanese e Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Os indivíduos do grupo controle 2 foram triados de uma comunidade adventista de Londrina, com hábitos e estilo de vida saudáveis e não apresentaram fatores de risco e evidências clínicas para doença arterial coronária, a coleta foi realizada no Hospital Universitário de Londrina. Logo após a separação do plasma, adicionou-se uma mistura contendo hidroxitolueno butilado (BHT) (20 mM) e inibidores de protease: aprotinina (2µg/mL), benzamidina (2 mM) e p-metilsulfonilfluoreto (PMSF) (1mM).

Critérios de inclusão

Neste estudo foram inseridos pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo I e II e os indivíduos intolerantes à glicose, segundo os critérios estabelecidos pela *American Diabetes Assosiation*, de ambos os sexos e sem distinção de raça.

Critérios de exclusão

Neste estudo os critérios de exclusão dos pacientes foram: (i) gravidez, (ii) doença psiquiátrica severa limitando a capacidade de compreensão e aceitação para participar com a doação do material, (iii) Diabetes Mellitus secundário a pancreatopatia crônica e (iv) Doença Hepática conhecida ou transaminases superior três vezes o valor normal.

Critérios de Interrupção do Estudo

Os pacientes foram excluídos do estudo: (i) não desejarem mais participar do estudo, e (ii) forem hospitalizados e, neste caso, a causa principal da internação deverá ser informada.

3.3. Dados dos indivíduos estudados

Tabela 1 – grupos estudados

	DM I	C I	DM II	IGT	C II
N.º pessoas	32	9	39	15	11
Idade	17,4±8,9	12±3,5	58,78±9,17	56,5±8,8	59,8±6,2

Legenda: DM I (Diabete Mellitus tipo 1), C I (controle 1), DM II (Diabetes Mellitus tipo 2), C II (controle 2), IGT (intolerante à glicose).

3.4. Separação da fração LDL por ultracentrifugação

Um pool de sangue foi coletado de indivíduos sadios utilizando-se tubos de coleta contendo EDTA (1mg/mL) ou heparina; após centrifugação do sangue, foi adicionado ao plasma uma mistura contendo BHT (20 mM) e inibidores de protease: aprotinina (2µg/mL), benzamidina (2 mM) e p-metilsulfonilfluoreto (PMSF) (1mM). A LDL (d =1.019-1.063 g/dL) foi separada do plasma pelo método de ultracentrifugação seqüencial (4°C, 59.000 rpm) (Havel *et al.*, 1955), utilizando-

se a ultracentrífuga Sorvall® Ultra Pro®8 e o rotor de angulo fixo T-1270. Resumidamente, um pool de plasma foi ultracentrifugado a 59.000 rpm, durante 4 horas, à 4°C. Após este tempo, descartou-se a fração VLDL, a qual flota no topo do tubo, ajustando-se a densidade do infranadante para 1.063 g/ml com KBr. Esta solução foi novamente ultracentrifugada a 59000 rpm, durante 4 horas à 4°C, isolando-se a LDL que flutuou no topo do tubo. Essa fração foi dessalinizada através do processo de diálise com tampão de diálise (NaCl, EDTA Na₂, NaN₃, Tris, pH 7,4) à 4°C e protegida da luz. A concentração de proteína da amostra foi determinada pelo método de Lowry (95) utilizando a albumina bovina como padrão.

3.5. ISOLAMENTO DA FRAÇÃO LDL⁻

A LDL⁻ foi isolada da fração total de LDL pela cromatografia preparativa, conforme procedimento descrito por Hodis *et al.* (1994) com algumas modificações, utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, software CLASS-LC 10) e detector SPD-MIOA. A amostra foi filtrada em filtro 0,22 µm (Millipore) e injetada (1 mL) na coluna de troca aniônica (PXR- 500 Hamilton Califórnia, USA), utilizando-se fase móvel constituída por um gradiente formado por tampão TRIS 20 mM, pH 7,8 (bomba A) e tampão TRIS 20 mM/ NaCl 1 M, pH 7,8 (bomba B). Inicialmente, a coluna foi equilibrada com tampão Tris (20 mM) pH 7,8, 1mL/min, durante 5 minutos, iniciando-se a eluição com um gradiente de NaCl em tampão Tris com um tempo total de corrida cromatográfica de 40 minutos. O eluente foi monitorado em 280 nm, sendo que o tempo de retenção da LDL nativa foi de 5 minutos e da LDL⁻ igual a 15 minutos. As amostras foram dialisadas com tampão de diálise e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (95).

3.6. ENSAIO DE LIPÓLISE

3.6.1. *Efeito da lipólise in vitro pela ação da LPL*

O ensaio do efeito da lipólise foi realizado, mimetizando-se a lipólise intravascular, utilizando-se um pool de plasma obtido no período pós-prandial e lipoproteína lipase (LPL) (179). O plasma foi incubado com LPL (1,71 U), albumina 4% em tampão contendo 200 mmol/L Tris-HCl, 3,3 mmol/L CaCl_2 , 130 mmol/L NaCl e 66,7 mg/L sódio-heparina, pH 8,2 durante 0, 2 e 4 horas a 37°C e agitação constante. O plasma sem adição de LPL foi incubado, representando o controle da reação. Cada reação foi bloqueada adicionando-se NaCl a frio para uma concentração final de 1 mol/L e a amostra foi colocada no gelo imediatamente. Após a adição dos inibidores de protease e antioxidante, as alíquotas foram armazenados a -70°C até as análises serem realizadas. De cada alíquota retirada do plasma isolou-se a fração LDL pelo processo de ultracentrifugação seqüencial, conforme descrito acima.

3.6.2. *Efeito da lipólise in vitro pela ação da PLA_2*

Foi também realizado um ensaio utilizando-se a enzima fosfolipase A_2 (PLA_2), isolada do veneno de cobra *Bothrops asper* (PLA_2 – miotoxina III) com atividade miotóxica. O pool de plasma foi incubado com PLA_2 (50 ng/mL), albumina 4% em tampão 100 mM HEPES, 5 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl, 140 mM NaCl, pH 7,4 durante 0, 2 e 4 horas. O controle foi realizado com as mesmas condições anteriores, exceto a presença de PLA_2 . A reação foi bloqueada com EDTA (concentração final 10 mM) e gelo, adicionando-se às alíquotas o coquetel de inibidores e antioxidante, sendo mantidas a -70°C até a realização das análises.

3.6.3. *Efeito do estado pós-prandial (lipólise in vivo)*

Os indivíduos voluntários que participaram desta etapa do trabalho, eram todos normolipidêmicos. Para avaliar a lipemia pós-prandial *in vivo*, foram realizadas coletas de sangue de indivíduos sadios no estado de jejum e no estado pós-prandial, ou seja, 2 (n=4) ou 4 (n=5) horas após a refeição. O sangue colhido com EDTA ou heparina foi separado rapidamente do plasma por centrifugação e adicionado de inibidores de protease e antioxidante. Em seguida, isolou-se a LDL pelo método de ultracentrifugação e as frações isoladas foram dessalinizadas e armazenadas a -70°C até as análises serem realizadas.

3.7. PREPARAÇÃO DA LDL GLICOXIDADA

A LDL recém isolada foi dialisada previamente com tampão Tris/NaCl 0,1mM pH 7,4 para remover o antioxidante BHT presente na amostra. Para a modificação glicoxidativa da LDL, alíquotas de LDL total (1mg/mL) foram incubadas com glicose 200 mM em tampão fosfato 0,2 M (pH 7,4) e gentamicina, para evitar crescimento bacteriano, à temperatura ambiente por uma semana. Como controle, a LDL foi incubada em tampão fosfato 0,2 M (pH 7,4) e gentamicina. A reação foi bloqueada por diálise contra 0,15 M NaCl e 0,25 mM EDTA, pH 7,4 a 4°C (139). As alíquotas, adicionadas de inibidores de protease e antioxidante, foram armazenadas a -70°C para posterior análise.

3.8. TESTES DE AVALIAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO

3.8.1. Determinação dos óxidos de colesterol

A determinação dos óxidos de colesterol (COX) foi realizada por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (CG-FID). Utilizou-se uma alíquota de 500 μ L de LDL. Os lipídeos foram extraídos com clorofórmio:metanol (2:1, v/v) contendo 0,01% BHT e 100 μ L de 5 α -colestano (10

µg/mL), adicionado a cada amostra como padrão interno. O extrato lipídico foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e o resíduo redissolvido em 1.0 mL de tolueno: acetato de etila (1:1, v/v). A fração lipídica neutra (triglicerídeos, colesterol e óxidos de colesterol) e a fração lipídica polar (fosfolipídeos) foram isoladas por extração de fase sólida (colunas Diol, Bakerbond) com tolueno: acetato de etila (1/1,v/v) seguido de metanol. A fração lipídica neutra foi saponificada (hidrólise dos lipídeos) e metilada com diazometano/éter (conversão dos ácidos carboxílicos em metil ésteres). A amostra foi transferida para o vial do autoinjeter e os lipídeos foram derivatizados com timetilsilil (TMS), usando-se dimetilformamida e Bis (timetilsilil) trifluoracetamida (BSTFA) (1:1). O vial foi selado, purgado com nitrogênio, aquecido a 80°C por 30 minutos e injetado no cromatógrafo a gás (CG 6890-Plus Hewlett-Packard) ligado com uma coluna DB-5 (30 m x 0,32 mm x 0.25 µm, J & W Scientific, Folsom, USA), utilizando-se *split ratio* de 1:10. O gás hélio foi usado como gás carreador num fluxo de 1 mL/ min. As temperaturas inicial e de injeção foram de 260°C e 290°C, respectivamente. O programa de temperatura compreendeu aumentos de 3°C/min até a temperatura final de 290°C. Análise quantitativa do cromatograma foi executada a partir do padrão interno, e os padrões de óxidos de colesterol (Steraloids, Inc.): 7 α -hidroxicolesterol (7 alfa), 7 β -hidroxicolesterol (7 beta), colesterol β -epóxido (beta epóxido), colestanoltriol (triol), e 7-cetocolesterol (7 K), 25-hidroxicolesterol (25-OH) e 5 α -colestano (padrão interno).

3.8.2. Determinação de hidroperóxidos lipídicos

Os hidroperóxidos na LDL e no plasma foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por quimiluminescência (CLAE-CL, Perkin-Elmer). O padrão de hidroperóxido, CH_{18:2}-OOH (linoleato de colesterol), foi sintetizado de acordo com Yamamoto *et al.* (1994) (193). Como solução de derivatização foi utilizada uma mistura de metanol e tampão bórax pH 10 contendo 1,5 mg de microperoxidase e 177,2 mg de isoluminol, a um fluxo de 1 mL/min. A coluna utilizada foi a Supelco LC18DB (25 cm, 5µ, 4,6mm, 120A), com

a respectiva pré-coluna, tendo como fase móvel uma solução de metanol/t-butanol 2:1 (v/v) com um fluxo de 1 mL/min, para a separação de CH_{18:2}-OOH. Para a extração dos hidroperóxidos lipídicos da LDL, realizada conforme descrito por Furazawa *et al.* (1999) (58), a uma alíquota de LDL (250 µL) adicionou-se 4 mL de acetonitrila contendo 5g/L de BHT e agitou-se no vortex por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 4 mL de hexano, tratado previamente com chelex por 12 horas, com agitação no vortex durante 2 minutos e posterior centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi filtrado (0,22 µm), evaporado em N₂ e ressuspenso em 100µL de fase móvel; em seguida, injetou-se uma alíquota de 50 µL da amostra no cromatógrafo. O tempo de retenção do CH_{18:2}-OOH foi de 11,2 minutos.

3.9. DETECÇÃO DE LDL⁻ POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA /Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

3.9.1. Biotinilação do anticorpo monoclonal antiLDL⁻

O anticorpo monoclonal anti-LDL⁻ (IgG anti-LDL⁻ Mab3D1036, produzido no laboratório) foi dialisado com tampão borato de sódio 0,1M, pH 8,8, durante 12 horas. A seguir, foi adicionado 1 mg de biotina (éster de D-biotinoil-ε-ácido aminocaproic-N-hidroxysuccinimida) dissolvida em 100 µL dimetilsulfóxido (DMSO) ao anticorpo anti-LDL⁻ em temperatura ambiente, durante 4 horas, na proporção de 250 µg biotina/mg anticorpo. Depois foi adicionado 1M NH₄Cl por 10 minutos. Finalmente, o anticorpo foi dialisado em PBS pH 7,4 para remover o excesso do reagente.

3.9.2. Método de ELISA-anticorpo monoclonal (ELISA- mAb)

3.9.2.1. Protocolo

Placas de imunoensaio de 96 poços (EIA/RIA, Nunc, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas com 50 μ L de anticorpo monoclonal anti-LDL⁻ (IgG anti-LDL⁻ Mab3D1036) na concentração 1 μ g/poço, diluído com tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,4, e conservadas durante 12 horas à 4°C em câmara úmida. Após este período, o excesso de anticorpo foi desprezado, e as placas foram lavadas em 4 ciclos com tampão de lavagem (TBS-Tween 0,05%) e bloqueadas por 2 horas com caseína a 0,02% em tampão TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4). Posteriormente, após a lavagem da placa, 50 μ L de amostras previamente diluídas em caseína 0,002% com TBS-Tween 0,005% foram distribuídas na placa e incubada à 37°C por duas horas, em triplicata. A seguir, a placa foi lavada conforme descrito acima, adicionou-se 50 μ L de anticorpo monoclonal anti-LDL⁻ (IgG anti-LDL⁻ Mab3D1036) biotinilado (1:1000), que anteriormente foi diluído com caseína 0,002% com TBS-Tween 0,005% com incubação de 2 horas. Após a lavagem, adicionou-se 50 μ L de streptavidina marcada com peroxidase (Stressgen Biotechnologies Corp.), diluída com caseína 0,002% com TBS-Tween 0,005% (1:1000) e incubou durante 2 horas. Lavou-se a placa e adicionou a mistura de isoluminol e H₂O₂ (0,25 μ L/mL isoluminol). A leitura da quimiluminescência produzida foi realizada imediatamente, utilizando-se uma leitora de placas de ELISA para quimiluminescência (LumiCount, Packard Meriden, USA). A análise quantitativa foi realizada utilizando-se curvas padrão de LDL⁻ em cada placa, em triplicata.

3.9.2.2. Esquema do protocolo:

3.9.2.3. Curva

Para a análise quantitativa de LDL⁻ foi feita uma curva com diferentes concentrações de LDL⁻ e o anticorpo monoclonal anti-LDL⁻ (ELISA-mAb), como mostrado na figura 6. Na figura 6A, mostra-se que a curva é linear até ~ 14 ug/ml de LDL⁻ e a figura 6B mostra a equação da reta de regressão utilizada para o cálculo da sensibilidade analítica.

Figura 6. Curva padrão de LDL⁻ para a análise quantitativa das amostras utilizando o anticorpo monoclonal anti-LDL⁻. Cada ponto da curva representa a média de triplicatas.

3.9.3. Método de ELISA-anticorpo policlonal (ELISA-poli Ac)

3.9.3.1. Protocolo

Esses ensaios foram realizados com um anticorpo policlonal, obtido após imunização de coelhos New Zealand com LDL⁻ isolada do plasma humano. Placas de imunoensaio de 96 poços (Nunc, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas com 50 μ L de amostra (LDL) diluído com tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,4, e conservadas à 37°C, durante 2 horas em câmara úmida. Após este período, o excesso de amostra foi removido e as placas foram lavadas em 4 ciclos com tampão de lavagem (PBS-Tween 0,01%) e bloqueadas por 1 hora com leite desnatado em tampão PBS (pH 7,4). Posteriormente, após a lavagem da placa, 50 μ L do anticorpo policlonal anti-LDL⁻ (15 μ g/mL, previamente diluídas em PBS, pH 7,4) foram distribuídas na placa, que foi incubada à 37°C por duas horas. A seguir, a placa foi lavada conforme descrito acima, adicionou-se 50 μ L de anticorpo monoclonal anti-rabbit (monoclonal anti-rabbit IgG1 peroxidase conjugate) (1:5000 em PBS) e incubou-se por 1 hora, a 37 °C . Após a lavagem, adicionou-se 50 μ L de OPD (orto-fenilenodiamina) e, a seguir, a placa foi bloqueada com H₂SO₄ 4N. A leitura da placa foi realizada utilizando-se uma leitora de placas de ELISA (SpectraCount, Packard Meriden, USA) a 490 nm. A análise quantitativa foi realizada utilizando-se curvas padrão de LDL⁻ em cada placa, em triplicata.

3.9.3.2. Esquema do protocolo:

3.9.3.3. Curva

A figura 7 mostra os resultados do teste ELISA com o anticorpo policlonal (ELISA-poli Ac). Nesse caso, o anticorpo policlonal reconhece mais de um epítipo, o que aumenta a sensibilidade do ensaio, mas pode diminuir sua especificidade, considerando-se que esse anticorpo policlonal anti-LDL⁻ tem uma reatividade cruzada com a LDL nativa. Para minimizar essa inespecificidade, realizou-se repetidas adsorções do anticorpo com nLDL (LDL nativa), o que diminuiu a inespecificidade desse anticorpo policlonal. Na tabela 2 observa-se que, após as adsorções, a reatividade contra a nLDL foi 16% (em média), o que é bastante satisfatório.

Figura 7. Curva padrão de LDL⁻ para a análise quantitativa das amostras utilizando o anticorpo policlonal anti-LDL⁻. Cada ponto representa a média de triplicatas.

Tabela 2. Reatividade do anticorpo policlonal anti-LDL⁻.

	LDL ⁻				nLDL			
	DO			M	DO			M
20 ug/mL	1.085	1.247	0.948	1.166	0,157	0,162	0,165	0,1613
5 ug/mL	0.878	0.991	0.972	0.947	0,162	0,178	0,17	0,17

A absorbância (DO) das amostras de LDL⁻ e nLDL (LDL nativa) no teste ELISA-poli foi determinada em 490 nm. Na concentração igual a 20 ug/mL observou-se 14% de reatividade do anticorpo policlonal para a nLDL versus a LDL⁻ e na concentração de 5 ug/mL verificou-se 18% de reatividade para a nLDL versus a LDL⁻. M = média das triplicatas.

3.9.4. Método de ELISA com anticorpos mono e policlonal (ELISA-misto)

3.9.4.1. Protocolo

Placas de imunoensaio de 96 poços (EIA/RIA, Nunc, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas com 50 uL de anticorpo policlonal (30 ug/mL) diluído com tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,4, e conservadas à 37°C, durante 2 horas em câmara úmida. Após este período, o excesso de anticorpo foi removido

e as placas foram lavadas em 4 ciclos com tampão de lavagem (TBS-Tween 0,05%) e bloqueadas por 1 hora com albumina humana em tampão TBS (pH 7,4). Posteriormente, após a lavagem da placa, 50 µL de amostras previamente de diluídas em TBS foram distribuídos na placa e incubados à 37°C por 90 minutos, em triplicata. A seguir, a placa foi lavada conforme descrito acima, adicionando-se posteriormente 50 µL de anticorpo monoclonal anti-LDL⁻ (IgG anti-LDL⁻ Mab3D1036) biotilado (diluído 1:1000 em TBS) com incubação de 90 minutos. Após a lavagem, adicionou-se 50 µL de streptavidina marcada com peroxidase (Stressgen Biotechnologies Corp.), diluída com TBS (1:1000) e incubou-se durante 1 hora. Após a lavagem da placa, adicionou-se a mistura de isoluminol e H₂O₂ (0,25 µL/mL isoluminol). A leitura da quimiluminescência produzida foi realizada imediatamente, utilizando-se uma leitora de placas de ELISA para quimiluminescência (LumiCount, Packard Meriden, USA). A análise quantitativa foi realizada utilizando-se curvas padrão de LDL⁻ em cada placa, em triplicata.

3.9.4.2. Esquema do protocolo:

3.9.4.3. Curva

A figura 8 mostra os resultados do teste ELISA com o anticorpo policlonal (**ELISA-misto**). Nesse caso, o anticorpo policlonal reconhece mais de um epítopo, o que aumenta a sensibilidade do ensaio, mas a especificidade ocorre devido ao anticorpo monoclonal biotinilado usado como segundo anticorpo.

Figura 8. Curva padrão de LDL para a análise quantitativa das amostras utilizando o anticorpo policlonal e monoclonal anti-LDL. Cada ponto representa a média de triplicatas.

3.9.5. Sensibilidade dos ELISAs

A sensibilidade analítica dos três testes ELISA, determinada pelo *slope* da curva de regressão, foi igual a 169,83 (figura 1B) para o mAb, de 0,0081 para o anticorpo policlonal (figura 2) e 22,28 (figura). O limite de detecção, calculado pela equação $xL = x_{bl} + k s_{bl}$ (onde: x_{bl} = média das medidas do branco; $k=2$, correspondente à probabilidade de 95%; s_{bl} = desvio padrão das medidas do branco), foi de 2,1 ug/ml (925 cpm) para o ELISA-mAb, de 1,9 ug/ml (D.O.=0,467) para o ELISA-poli Ac e 8,52 ug/ml (114 cpm) para o ELISA-misto. Portanto, o limite de detecção dos dois ensaios é semelhante para ELISA-mAb e ELISA-poli Ac, embora o anticorpo policlonal possa reconhecer diversos epítomos, o que o torna uma ferramenta mais adequada para os estudos de glicação e lipólise. Embora o limite de detecção do ELISA-misto seja maior, este ensaio pode ser mais específico pelo fato de utilizar o anticorpo policlonal como captura de antígenos e o anticorpo monoclonal como segundo anticorpo.

3.10. TESTE DE AVALIAÇÃO DA GLICOXIDAÇÃO

3.10.1. Preparo do padrão Albumina-AGE

O padrão albumina-AGE foi preparado de acordo com Ikeda *et al.* (75), incubando-se 50 mg/mL de albumina bovina com 45 mM ácido glioxálico e 150 mM NaCNBH₃ em 10 mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4, à 37°C durante 3 dias. Após a incubação, essa preparação foi dialisada com PBS. A extensão da formação da albumina-AGE foi determinada através do método colorimétrico de Ninidrina (50), verificando-se uma modificação de 23% nos resíduos de aminoácidos da albumina.

3.10.2. Determinação dos AGEs pelo teste ELISA (AGE-ELISA)

3.10.2.1. Protocolo

A concentração de AGEs foi determinada pelo ensaio ELISA competitivo de acordo com Buongiorno *et al.* (2003) (30), com algumas modificações. Esses ensaios foram realizados com o anticorpo monoclonal comercial anti-AGE (advanced glycation end products) (Clone 6D12 MP Biomedicals®). Placas de imunoensaio de 96 poços (Nunc, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas com 50 µL de padrão albumina-AGE (50 µg/mL) diluído com tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,4 e conservadas à 4°C, durante 12 horas. Após este período, o excesso de amostra foi removido e as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS-Tween 0,05%) e bloqueadas por 2 horas com 200 µL de leite desnatado em tampão PBS (pH 7,4). Separadamente, em microtubos, foram adicionados 25 µL da amostra ou padrão com 25 µL do anticorpo monoclonal anti-AGE (diluição 1:5000), incubando-se a 37°C durante 5 minutos; após a incubação, adicionou-se 50 µL dessa preparação em cada poço da microplaca, que foi incubada à 37°C por duas horas. A seguir, a placa foi lavada 5 vezes, conforme descrito acima, adicionou-se 50 µL de anticorpo monoclonal anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com peroxidase (monoclonal anti-mouse IgG1 peroxidase conjugate; 1:10000 em PBS) e incubou-se por 1 hora, a 37°C. Após a lavagem, adicionou-se 50 µL de OPD (orto-fenilenodiamina) e após 30 minutos a placa foi bloqueada com H₂SO₄ 4N. A leitura da placa foi realizada

utilizando-se uma leitora de placas de ELISA (SpectraCount, Packard Meriden, USA) a 490 nm. A análise quantitativa foi realizada utilizando-se curvas padrão de albumina-AGE em cada placa, em duplicata. Os resultados foram expressos como %B/Bo, calculado como $[\text{DO da amostra}/\text{DO total (sem competidor)}] \times 100$.

3.10.2.2. Esquema do protocolo:

3.10.2.3. Curva

Para a análise quantitativa de LDL⁻ glicada foi feita uma curva com diferentes concentrações de AGEs-albumina e o anticorpo monoclonal anti-AGE (**AGE-ELISA**), como mostrado na figura 9. A albumina foi utilizada como uma proteína carreadora para o antígeno AGE.

Figura 9. Curva padrão de AGEs para a análise quantitativa das amostras utilizando o anticorpo monoclonal anti-AGE. Cada ponto representa a média de duplicatas.

3.11. Análise estatística

Os resultados estão demonstrados como média $\pm$ erro padrão. A significância das diferenças entre os ensaios de lipólise *in vitro*, *in vivo* e a glicação *in vitro* foi analisada empregando-se o modelo de análise de variância com medidas repetidas para estudar as associações de interesse. Foi utilizado o teste "t" de Student não pareado para comparação das médias entre os dois grupos analisados (pacientes e controles). Para testar as correlações entre as variáveis foi utilizado o coeficiente de Pearson, através do programa SigmaStat 1.0.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos da glicação e oxidação sobre a formação da LDL

Nas figuras 10, 11 e 12 são apresentados os resultados da glicação da LDL, avaliando-se a formação de LDL⁻ com o teste ELISA-mAb, Elisa-poli Ac e ELISA-misto, respectivamente. Observa-se que a glicação da LDL com 200 mM de glicose durante 1 semana resultou em aumento estatisticamente significativo na concentração de LDL⁻, avaliado pelo ensaio de ELISA poli e misto; no entanto, utilizando-se somente o anticorpo monoclonal no ensaio imunoenzimático esta diferença não foi detectada (figura 10).

Figura 10. Efeito da glicação da LDL na formação de LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do teste ELISA utilizando o anticorpo monoclonal anti-LDL⁻. Ensaio realizado com LDL total incubada com glicose (200 mM) em PBS, pH 7,4, representado no gráfico como 200 mM, e LDL total incubada apenas com PBS, pH 7,4 representado como controle, os experimentos (n=6) foram realizados durante 7 dias à temperatura ambiente. Legenda: 0 (basal), 7 dias (1 semana). O teste de ELISA (item 3.9.3) foi feito em triplicata para cada amostra. Dados representam a média ($\pm$) erro padrão. (n=6).

Figura 11. Efeito da glicação da LDL na formação de LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do imunoensaio ELISA utilizando o anticorpo policlonal anti-LDL⁻. O ensaio de glicação refere-se à incubação da LDL total com 200 mM de glicose em PBS, pH 7,4 e gentamicina e o controle, na qual não continha glicose. Legenda: 0 (basal), 7 dias (1 semana). O teste de ELISA (item 3.9.4) foi feito em triplicata para cada amostra. Dados representam a média ($\pm$) erro padrão (n=6) * $p < 0,05$ versus controle.

Figura 12. Efeito da glicação da LDL na formação de LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do imunoensaio ELISA misto. O ensaio de glicação refere-se à incubação da LDL total com 200 mM de glicose em PBS, pH 7,4 e gentamicina e o controle, na qual não continha glicose. Legenda: 0 (basal), 7 dias (1 semana). O teste de ELISA (item 3.9.5) foi feito em triplicata para cada amostra. Dados representam a média ($\pm$) erro padrão (n=6). * $p < 0,05$ versus controle.

Como demonstrado na figura 13, as concentrações de LDL⁻ nos grupos de diabéticos e intolerantes à glicose estão significativamente elevados comparadas com seus respectivos grupos controle.

Figura 13. Efeito da glicação *in vivo* na formação de LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do imunoensaio ELISA misto. Dados referem-se à determinação plasmática em pacientes DM I (n=31), C I (n=6), DM II (n=38), C II (n=6), IG (n=13). Legenda: DM I (diabetes Mellitus tipo 1), C I (controle 1), DM II (Diabetes Mellitus tipo 2), C II (controle 2), IGT (intolerante à glicose). O teste de ELISA (item 3.9.5) foi feito em triplicata para cada amostra. Dados representam a média ($\pm$) erro padrão. * $p < 0,05$ versus controle.

A Figura 14 mostra as concentrações de frutossamina nos ensaios de glicação da LDL *in vitro*. Em relação à concentração de AGEs, no ensaio *in vitro* não houve aumento significativo após a incubação com a glicose (figura 15).

Figura 14. Concentração de Frutossamina (nmol/mg de proteína). Determinação nas alíquotas de LDL obtidas do ensaio realizado com LDL total incubada com 200 mM glicose em PBS, pH 7,4 representado por 200 mM e o controle, LDL total incubada com PBS pH 7,4 nos tempos 0 (basal) e 7 dias, em temperatura ambiente. Dados representam a média ($\pm$) erro padrão (n=6).

Figura 15. Concentração de AGEs (ug/mg de proteína). Determinação nas alíquotas de LDL obtidas do ensaio realizado com LDL total incubada com 200 mM glicose em PBS, pH 7,4 representado por 200 mM e o controle, LDL total incubada com PBS pH 7,4 nos tempos 0 (basal) e 7 dias, em temperatura ambiente. Dados representam a média ($\pm$) erro padrão (n=6).

Houve aumento da concentração de AGEs nos pacientes DM I e II em relação aos grupos controles (figura 16), sem aumento significativo no grupo IGT.

Figura 16. Concentração de AGEs (μ g/mL). A concentração de AGE foi determinada através do imunoensaio ELISA competitivo. Dados referem-se à determinação plasmática em pacientes DM I (n=32), C I (n= 9), DM II (n=39), C II (n = 11), IG (n=15). Legenda: DM I (diabetes Mellitus tipo 1), C I (controle 1), DM II (Diabetes Mellitus tipo 2), C II (controle 2), IGT (intolerante à glicose). O teste de ELISA (item 3.10.3) foi feito em duplicata para cada amostra. Dados representam a média ($\pm$) erro padrão. * p< 0,05 versus controle.

Após 7 dias de incubação com a glicose, observou-se um aumento significativo das concentrações de hidroperóxidos de ésteres de colesterol e aumento de 2 vezes nas concentrações de COX (figura 17).

Figura 17. Lipoperoxidação da LDL após glicação. A LDL total foi incubada com glicose em PBS, pH 7,4 até 7 dias (referente à fig.10, 11 e 12). (A) Concentração de hidroperóxidos de ésteres de colesterol (CE-OOH, $\mu\text{M}/\text{mmol}$ colesterol). (B) Concentração total dos óxidos de colesterol (COX, ng/mg colesterol). Dados representam a média ($\pm$) erro padrão ($n=6$). * $p<0,05$ versus basal. Legenda: 0 (basal), 7 dias (1 semana).

Os perfil lipídico dos grupos estudados não demonstrou diferenças significativas, com exceção do aumento significativo da concentração de VLDL-colesterol do grupo DM II em comparação com seu grupo controle (figura 18).

Figura 18. Determinação bioquímica. (A) triglicérides colesterol total (mg/dL) (B) VLDL-C (mg/dL) (C) HDL-C (mg/dL) (D) colesterol total (mg/dL) (E) LDL-C (mg/dL). Dados referem-se à determinação plasmática em pacientes DM I (n=32), C I (n=9), DM II (n=39), C II (n=11), IGT (n=15). Legenda: DM I (diabetes Mellitus tipo 1), C I (controle1), DM II (Diabetes Mellitus tipo 2), C II (controle 2), IGT (intolerante à glicose). Dados representam a média ($\pm$) erro padrão. * $p < 0,05$ versus controle.

Em relação às concentrações de glicose, hemoglobina glicada (Hb glicada) e frutamina, os grupos DM II e IGT apresentaram concentrações significativamente elevadas, comparadas com o grupo controle 2 (C II) (figura 19).

Figura 19. Determinação bioquímica. (A) Hemoglobina glicada (%) (B) Frutosamina (mg/dL) (C) glicose (mg/dL). Dados referem-se à determinação plasmática em pacientes DM I (n=32), C I (n=9), DM II (n=39), C II (n=11), IGT (n=15). Legenda: DM I (diabetes Mellitus tipo 1), C I (controle 1), DM II (Diabetes Mellitus tipo 2), C II (controle 2), IGT (intolerante à glicose). Dados representam a média ($\pm$) erro padrão. * $p < 0,05$ versus controle.

A concentração de LDL- correlacionou-se com a concentração de glicose plasmática no grupo DM I (figura 20).

Figura 20. Correlação entre a concentração de LDL⁻ (μg/mL) e glicose (mg/dL) no grupo DM I. $r=0,480$, $p < 0,05$.

4.2. Efeitos da fosfolipase A₂ e da lipoproteína lípase sobre a formação da LDL

4.2.1. Fosfolipase A₂ (PLA₂)

No ensaio de incubação do plasma com a enzima PLA₂ houve aumento significativo da concentração de LDL⁻, em comparação com o grupo controle (figura 23), avaliado pelo teste ELISA misto; no entanto, não houve alteração pelo teste de ELISA-poli (figura 22) e o teste ELISA-mono (figura 21).

A concentração de LOOH (figura 24a) e COX (figura 24b) não teve aumentos significativos. Em relação à eletroforese de gel de agarose, ocorreu um pequeno aumento da mobilidade eletroforética da LDL isolada do sistema de incubação com PLA₂ (figura 25, linhas 1, 2 e 3) em relação ao tempo zero.

Figura 21. Efeito da PLA₂ sobre a LDL na formação de LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do teste ELISA utilizando o anticorpo monoclonal anti-LDL⁻. O pool de plasma foi incubado com 50 ng/mL PLA₂, albumina e gentamicina durante 4 horas, a 37°C, com posterior isolamento da LDL. A análise de ELISA (item 3.9.3) foi realizado em triplicata. Legenda: 0 (basal), 2 h (2 horas) e 4 h (4 horas). Dados representam a média (±) erro padrão (n=6).

Figura 22. Efeito da PLA₂ sobre a LDL na formação de LDL⁻. Concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do teste ELISA utilizando o anticorpo policlonal anti-LDL⁻. O ensaio de lipólise refere-se à incubação do pool de plasma com 50 ng/mL PLA₂, albumina e gentamicina durante 4 horas, a 37°C e posterior isolamento da LDL. A análise de ELISA (item 3.9.4) foi realizada em triplicata. Dados representam a média (±) erro padrão (n=6).

Figura 23. Efeito da PLA₂ sobre a LDL na formação de LDL⁻. Concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do teste ELISA-misto. O ensaio de lipólise refere-se à incubação do pool de plasma com 50 ng/mL PLA₂, albumina e gentamicina durante 4 horas, a 37°C e posterior isolamento da LDL. A análise de ELISA (item 3.9.5) foi realizada em triplicata. Dados representam a média (±) erro padrão (n=6). * p<0,05 versus grupo controle.

Figura 24. Lipoperoxidação da LDL após incubação PLA₂. O plasma foi incubado com PLA₂ em PBS, pH 7,4 até 7 dias (referentes à fig. 22, 23 e 24). (A) Concentração de hidroperóxidos de ésteres de colesterol (CE-OOH, μmol/mmol colesterol). (B) Concentração total dos óxidos de colesterol (COX, ng/mg colesterol). Legenda: 0 (basal), 2 h (2 horas) e 4 h (4 horas). Dados representam a média (±) erro padrão (n=6).

Figura 25. Mobilidade eletroforética da LDL após incubação com PLA₂. As amostras (8μg), isoladas da incubação do plasma com ou sem PLA₂ (50 ng/mL) + albumina por até 4 horas, foram aplicadas no gel de agarose (Paragon Lipo Gels®). nLDL = LDL nativa.

4.2.2. Lipólise *in vitro* com LPL

No ensaio *in vitro* foi adicionado heparina para estabilizar a enzima LPL (17). O plasma, além de ser fonte de LDL, é importante como fonte de apoC-II (co-fator para atividade enzimática). O pH 8,5 foi utilizado devido à atividade máxima da enzima nesse pH (18).

Os ensaios de lipólise *in vitro*, realizados pela incubação do plasma de indivíduos normolipidêmicos com LPL, demonstraram um aumento de LDL⁻ (figura 26/ELISA-mAb) ao longo do tempo, determinado pelo teste ELISA com o anticorpo monoclonal. No entanto; nas figuras 27 e 28 demonstra-se que a determinação de LDL⁻ pelo teste ELISA de captura com o anticorpo policlonal anti-LDL⁻ não indicou aumento da formação de LDL⁻, em decorrência da ação da LPL, provavelmente porque esse anticorpo não reconhece os epítomos expostos pela ação da LPL sobre a LDL.

Em relação à lipoperoxidação, foi observado aumento na concentração de LOOH em relação à reação controle, no entanto não se observou diferença significativa na concentração de COX nas partículas LDL (figura 29).

Figura 26. Efeito da lipólise *in vitro* na formação da LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do teste ELISA com anticorpo monoclonal anti-LDL⁻. Ensaio realizado com pool de plasma incubada com ou sem LPL (1,71 U), albumina e gentamicina durante 4 horas, a 37°C. O controle refere-se ao plasma sem LPL, o teste de ELISA (item 3.9.3) foi realizado em triplicata de cada amostra. Legenda: 0 (basal), 2 h (2 horas) e 4 h (4 horas). Dados representam a média ($\pm$) erro padrão (n=6). * $p < 0,05$ versus basal.

Figura 27. Efeito da lipólise *in vitro* na formação da LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do teste ELISA utilizando o anticorpo policlonal anti-LDL⁻. Ensaios (n=6) realizados com pool de plasma incubado com LPL (1,71 U), albumina e gentamicina durante 4 horas, a 37°C. O controle refere-se ao plasma incubado sem LPL. As análises de ELISA (item 3.9.4) foram realizadas em triplicata. Legenda: 0 (basal), 2 h (2 horas) e 4 h (4 horas). Dados representam a média ($\pm$) erro padrão (n= 6).

Figura 28. Efeito da lipólise *in vitro* na formação da LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do teste ELISA misto. Ensaios (n=6) realizados com pool de plasma incubado com LPL (1,71 U), albumina e gentamicina durante 4 horas, a 37°C. O controle refere-se ao plasma incubado sem LPL. As análises de ELISA (item 3.9.5) foram realizadas em triplicata. Legenda: 0 (basal), 2 h (2 horas) e 4 h (4 horas). Dados representam a média ($\pm$) erro padrão (n=6).

Figura 29. Lipoperoxidação da LDL após incubação LPL. Ensaio realizado com pool de plasma incubada com ou sem LPL (1,71 U), albumina e gentamicina durante 4 horas, a 37°C. O controle refere-se ao plasma sem LPL. (A) Concentração de hidroperóxidos de ésteres de colesterol (CE-OOH, $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ colesterol). (B) Concentração total dos óxidos de colesterol (COX, ng/mg colesterol). Legenda: 0 (basal), 2 h (2 horas) e 4 h (4 horas). Dados representam a média ($\pm$) erro padrão ($n=6$). * $p<0,05$ versus grupo controle.

4.2.3. Lipólise *in vivo*

Os ensaios de lipólise *in vivo* foram realizados para avaliar se durante a lipemia pós-prandial ocorreria a formação de LDL^- . Para isso, isolou-se LDL^- total do plasma de indivíduos normolipidêmicos no estado pós-prandial. As amostras foram obtidas nos tempos 0 (jejum), 2 e 4 horas após o almoço (dieta não controlada). Como mostrado nas figuras 30 (ELISA-mAb anti- LDL^-), 31 (ELISA-poli anti- LDL^-), observamos aumento significativo da concentração de LDL^- no período pós-prandial. No entanto, utilizando o ELISA-misto não foi observado aumento significativo (figura 32), que poderia ser decorrente da menor sensibilidade do imunoensaio.

Em nossos estudos de lipólise observamos aumento significativo dos hidroperóxidos dos ésteres de colesterol (CE-OOH) na LDL^- total isolada no período pós-prandial (figura 33A) sem aumento significativo nos COX totais (figuras 33B).

Figura 30. Efeito da lipólise *in vivo* na formação de LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do teste ELISA utilizando o anticorpo monoclonal anti-LDL⁻. Os dados referem-se à concentração de LDL⁻ presente na LDL total isolada dos indivíduos saudáveis no jejum (tempo zero) e no estado pós-prandial de 2 (n=4) e 4 horas (n=5). Os ensaios de ELISA (item 3.9.3) foram realizados em triplicata. Dados representam a média ($\pm$) erro padrão. * $p < 0,05$ versus basal.

Figura 31. Efeito da lipólise *in vivo* na formação de LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do teste ELISA utilizando o anticorpo policlonal anti-LDL⁻. Os dados referem-se à concentração de LDL⁻ presente na LDL total isolada dos indivíduos saudáveis no jejum (tempo zero) no estado pós-prandial de 2 (n = 4) e 4 (n = 5) horas. Os ensaios de ELISA (item 3.9.4) foram realizados em triplicata. Dados representam a média ($\pm$) erro padrão. * $p < 0,05$ versus basal.

Figura 32. Efeito da lipólise *in vivo* na formação de LDL⁻. A concentração de LDL⁻ (ug/mL) foi determinada através do teste ELISA misto. As análises de ELISA (item 3.9.5) foram realizadas em triplicata. Os dados referem-se à concentração de LDL⁻ presente na LDL total isolada dos indivíduos saudáveis no jejum (tempo zero) no estado pós-prandial de 2 (n = 4) e 4 (n = 5) horas. Os ensaios de ELISA foram realizados em triplicata. Dados representam a média ($\pm$) erro padrão.

Figura 33. Lipoperoxidação da LDL após a lipólise *in vivo*. Produtos de oxidação da LDL isolada do plasma de indivíduos saudáveis no jejum (tempo zero) e no estado pós-prandial de 2 e 4 horas (referente fig. 17). A) Concentração de hidroperóxidos de ésteres de colesterol (CE-OOH, μ mol/mmol colesterol). (B) Concentração total dos óxidos de colesterol (COX, ng/mg colesterol). Dados representam a média ($\pm$) erro padrão. * $p < 0,05$ versus basal.

O perfil lipídico mostra o aumento de TG (figura 34), decorrente da lipemia pós-prandial, também observado em outros estudos (177).

Figura 34. Perfil lipídico (mg/dL). Dados referem-se à determinação sangüínea de indivíduos saudáveis obtidos no jejum (0) e no período pós-prandial 2 (n=4) e 4 (n=5) horas, com seus respectivos tempo zero. Dados representam a média ($\pm$) erro padrão. * $p < 0,05$ versus basal.

5.DISSCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1. Efeitos da glicação e oxidação sobre a formação da LDL

Nos diabéticos, devido às concentrações elevadas de glicose, há um favorecimento da glicação das proteínas circulantes, inclusive da LDL (74). Para mimetizar a glicação não enzimática que ocorre *in vivo*, a LDL, isolada do plasma humano por ultracentrifugação, foi incubada com glicose 200 mM em tampão fosfato, pelo fato do íon fosfato favorecer a glicação de proteínas e aumentar a proporção de cadeia aberta, forma reativa do açúcar redutor em solução aquosa (30), e promover a enolização do açúcar (171). A concentração de 200 mM de glicose foi escolhida, apesar de não representar as concentrações fisiológicas, devido aos estudos de Bucala *et al.* (1994) (25) e Makita *et al.* (1992) (101) demonstrarem a formação de AGEs na LDL, tornando a partícula imunoquimicamente semelhante e com concentrações de AGEs comparáveis aos das partículas de LDL isoladas de diabéticos.

Observa-se que a glicação da LDL com 200 mM de glicose durante 1 semana resultou em aumento estatisticamente significativo na concentração de LDL⁻, avaliado pelo ensaio de ELISA poli e misto (figura 11 e 12, respectivamente). Uma diferença com estudos anteriores (25, 115) é que, em nosso protocolo, a incubação da LDL com glicose foi realizada à temperatura ambiente, ao invés de 37°C, para que a glicação ocorresse lentamente e que uma autooxidação acentuada fosse prevenida, o que poderia fragmentar a apoB e desestruturar a partícula da LDL, o que não ocorre com a LDL minimamente modificada *in vivo*. Este fator pode ter atenuado a glicação porque, como descrito anteriormente, o processo de glicação é fortemente dependente da temperatura (15, 162), da concentração da glicose e do tempo de incubação (160). Esses experimentos indicam que a oxidação teve uma contribuição para o aumento de LDL⁻ observado através do aumento da peroxidação lipídica, como indicado pelo aumento significativo de hidroperóxidos de éster de colesterol (figura 17).

As concentrações de LDL⁻ nos grupos de diabéticos e intolerantes à glicose (figura 13) estão significativamente elevadas comparadas com seus respectivos grupos controle. Desta forma, confirmam-se os resultados *in vitro* indicativos de que o processo de glicoxidação pode favorecer a formação da LDL⁻, na presença de concentrações elevadas de glicose. Considerando-se que no modelo *in vitro* é difícil mimetizar o microambiente sangüíneo com todas suas alterações metabólicas presentes no diabético.

Estes resultados estão em concordância com estudos de Sánchez-Quesada *et al.* (1996) (146) e Moro *et al.*, (1998) (113), que demonstraram maior proporção de LDL⁻ em diabéticos com concentrações elevadas de frutamina e Hb glicada, neste estudo também demonstrou-se o mesmo perfil citado em diabéticos (figuras 13 e 19). No DM I há uma correlação positiva entre as concentrações de LDL⁻ e glicose (figura 20), este resultado sugere que a hiperglicemia pode influenciar a formação de LDL⁻, que está de acordo com Sánchez-quesada *et al* (1996) (146) que demonstrou que o controle glicêmico no diabético insulino-dependente é acompanhada pela diminuição da concentração de LDL⁻, sugerindo que a glicação pode participar na formação da LDL⁻. No diabético não-insulino-dependente, proporções mais elevadas de LDL⁻ têm sido demonstradas no estado de glicemia elevada; porém a suscetibilidade da LDL à oxidação permanece após a otimização do controle glicêmico, indicando que a oxidação também poderia estar favorecendo a formação de LDL⁻ (144) e favorece a glicação *in vivo*.

Um outra fonte de AGEs na circulação seria a ingestão de glicotoxinas (produtos de glicação reativos) presentes na alimentação, que passam pelo processo digestivo e são transportados na circulação, incluindo produtos não reativos como CML, pirralina ou glicotoxinas, como o 3-DG e MGO (88). Esses produtos poderiam reagir com a LDL circulante (25) e, considerando-se que a glicação pode influenciar a formação de LDL⁻, estas glicotoxinas poderiam contribuir com este aumento e também pelo aumento da concentração de AGE no plasma (figura 16).

A interação entre AGEs e seus receptores (RAGEs) resulta na ativação da NADPH oxidase, gerando espécies reativas de oxigênio (184), o que contribuiria para a conversão da LDL nativa em LDL eletronegativa (73). Este processo poderia ocorrer nos diabéticos levando à formação de LDL⁻.

Frutosamina é o nome trivial da 1-amino-1-desoxifrutose, também denominada isoglucosamina (5), que tem sido usada para avaliar a concentração de LDL glicada em pacientes diabéticos (147). No ensaio de glicação *in vitro* determinamos a concentração de frutosamina na LDL incubada com glicose, mas no final de 7 dias houve redução de 20% da frutosamina em relação ao basal, enquanto que na LDL incubada somente com PBS a redução foi de 5,5% (figura 14), no entanto não foi significativo. Embora a concentração da frutosamina tenha diminuído (Figura 14), não significa que a LDL não esteja glicada, mas que possivelmente existam grupos intermediários de frutosamina ligados à LDL que não foram detectados pelo ensaio de frutosamina utilizado. Isso pode ser devido também ao não reconhecimento dos epítomos (diferentes AGEs) presentes na partícula pelo anticorpo monoclonal anti-AGE.

O anticorpo monoclonal anti-AGE, utilizado no ensaio de ELISA competitivo, não reconhece estruturas intermediárias, como bases de Schiff e composto de Amadori, ou, AGEs como pentosidina e pirrolina, conforme descrito pelo fabricante. Estudos de Ikeda *et al.* (1996) (75) demonstraram que o aduto CML é o principal epítipo reconhecido por este anticorpo. No ensaio *in vitro* não houve aumento da concentração de AGE após a incubação com a glicose (figura 15); isso pode ter decorrido do não reconhecimento dos epítomos presentes na partícula pelo anticorpo monoclonal anti-AGE. Conforme descrito anteriormente, o tempo e a temperatura de incubação podem ter sido fatores limitantes para a glicação (4, 197).

Observou-se aumento das concentrações de AGEs nos pacientes DM I e II, em relação aos respectivos grupos controle (figura 16), sem aumento significativo no grupo de indivíduos IGT. Neste caso, deve-se levar em consideração que a determinação de AGEs nos grupos estudados foi realizada no plasma, no qual a glicação não enzimática ocorre nas proteínas circulantes, incluindo as

lipoproteínas plasmáticas. A glicação pode ocorrer nos fragmentos Fab e Fc das imunoglobulinas, albumina, hemoglobina, fibrinogênio, plaquetas e outras proteínas circulantes do plasma; além disso, pode ocorrer glicação na LDL, HDL e VLDL, o que promove diminuição de suas respectivas funções (36). Nossos resultados estão de acordo com a literatura, que demonstra aumento de AGEs na circulação de diabéticos (79, 93, 79).

A interação entre AGEs e endotélio induz estresse oxidativo, havendo ativação do fator de transcrição (NF- κ B), que promove o aumento da expressão de VCAM-1 (153). Esta superexpressão resulta no aumento da adesividade de monócitos ao endotélio e a ativação do NF- κ B aumenta a permeabilidade vascular (153). Estes eventos poderiam contribuir para a aterogenese observada nos diabéticos. Além disso, a LDL glicada possui maior capacidade de interação com os proteoglicanos, o que resulta no aumento do tempo de circulação sanguínea dessas partículas (53).

Na glicação *in vitro* observou-se um aumento significativo das concentrações de hidroperóxidos de ésteres de colesterol (figura 17). Estudos anteriores demonstraram aumento na oxidação lipídica da LDL na presença de glicose (60, 115), devido à oxidação estar envolvida na glicação a partir da formação da base de Schiff, pois o produto de Amadori pode se autooxidar e gerar radical superóxido (116), além da autooxidação de glicose formar radical hidroxil (70), o que pode propiciar a peroxidação lipídica da LDL. A formação de AGEs também é observada na porção lipídica da LDL, os quais são formados de modo dependente do tempo e da concentração de glicose (28). Uma vez formado o complexo AGE-lipídeo, este favorece a oxidação dos ácidos graxos (28), demonstrado aqui pelo aumento de hidroperóxidos lipídicos na LDL incubada com glicose. O aumento dos hidroperóxidos na reação controle ocorreu devido à autooxidação dos ácidos graxos à temperatura ambiente (135).

O aumento significativo da concentração de VLDL-colesterol do grupo DM II em comparação com seu grupo controle (figura 18), pode ser decorrente da diminuição do catabolismo da VLDL, uma vez que a VLDL glicada apresenta menor grau de degradação pelos fibroblastos (192). Embora, no diabetes ocorra

alteração no metabolismo lipídico, neste caso os pacientes estavam tomando medicamentos, incluindo as estatinas, que podem normalizar o metabolismo lipídico como demonstra este resultado.

A concentração de frutossamina (figura 19) serve como índice retrospectivo da glicemia, variando de uma a três semanas, decorrente da meia-vida da albumina (14-20 dias) (5). No modelo *in vitro* (figura 14), a concentração de frutossamina pode ter diminuído devido ao consumo de glicose no meio reacional, ao contrário do que acontece com o diabético em que se observa hiperglicemia contínua, o que favoreceria a glicação.

A hemoglobina glicada que é considerada um bom parâmetro de avaliação do controle glicêmico do diabético, é usada para monitorar a concentração média de glicose das 6 a 8 semanas anteriores (36), no grupo DM II e IGT estão elevados (figura 19). No entanto, alguns estudos demonstram que a enzima frutossamina 3-kinase está envolvida no processo de desglicação nos eritrócitos humanos, através da fosforilação de frutossaminas ligadas às proteínas (47, 166). A glicação na hemoglobina ocorre principalmente nos resíduos de valina gerando frutosevalina, que tem menor afinidade para a frutossamina 3-kinase que a frutoselisina, o que explicaria o aumento de hemoglobina glicada nos diabéticos (166). Sabendo-se da existência deste mecanismo de desglicação, pode-se supor que a hemoglobina glicada não reflete apenas a concentração de glicose sangüínea, mas também a atividade desta enzima presente nos eritrócitos (46).

5.2. Efeitos da fosfolipase A₂ e da lipoproteína lipase sobre a formação da LDL

5.2.1. Fosfolipase A₂ (PLA₂)

Na partícula de LDL, a hidrólise pela PLA₂ ocorrerá na monocamada superficial (fosfolípides), o que pode ocasionar mudanças conformacionais dos

lípidos e da apoB100 inserida nessa monocamada, que acarretarão no reconhecimento de novos epítomos pelos anticorpos anti-LDL⁻. Em nossos experimentos adicionou-se albumina no meio reacional dos ensaios de lipólise devido às suas propriedades de seqüestro dos ácidos graxos liberados e lisofosfatidilcolina, pois em concentrações fisiológicas de albumina os ácidos graxos e lisofosfolípidos são transferidos da LDL para a albumina (124). Sem a albumina ocorreria o acúmulo destes produtos na LDL, o que poderia aumentar sua carga negativa (84), mas não refletiria a situação fisiológica.

No ensaio de incubação do plasma com a enzima PLA₂, houve aumento significativo da concentração de LDL⁻, em comparação com o grupo controle (figura 23), avaliado pelo teste ELISA misto. No entanto, não houve alteração pelo teste de ELISA-poli (figura 22), no qual o antígeno (amostra/LDL total) foi adsorvido na placa (ensaio de fase sólida), o que poderia ter diminuído o número de epítomos reconhecidos pelo anticorpo policlonal, visto que no ELISA-misto a amostra/LDL é incubada em solução (livre de impedimentos para o reconhecimento dos epítomos da LDL). O fato de não ter sido detectado aumento de LDL⁻ no teste de ELISA com o anticorpo monoclonal anti-LDL⁻ (figura 21), poderia ser explicado considerando-se que o anticorpo monoclonal poderia reconhecer um epítomo específico que durante a ação da PLA₂ não se alteraria. A liberação de AGL e lisofosfolípídeo altera a estrutura e composição da lipoproteína, aumentando a quantidade de colesterol livre na superfície (77). O aumento de esfingomielina também resulta em diminuição da fluidez na superfície da lipoproteína (64). Alterações da organização estrutural da apo-B 100 na superfície da partícula de LDL podem resultar no aumento da sua carga negativa e na exposição/formação de epítomos específicos da proteína modificada (84). Desta forma, estes eventos poderiam favorecer a formação da LDL⁻, ou, expor epítomos que poderiam ser reconhecidos pelo anticorpo policlonal anti-LDL⁻. O aumento da LDL⁻ pela ação da PLA₂ também foi demonstrado por Asatryan *et al.* (2004) (12) e Benitez *et al.* (2004) (19), que demonstraram que a LDL com concentrações elevadas de ácidos graxos e lisofosfatidilcolina induz a liberação de citocinas inflamatórias dependente da concentração destes lípidos (19).

Após a ação da PLA₂, a concentração de colesterol livre aumenta na superfície da LDL (77), juntamente com um aumento relativo de esfingomielina (PLA₂ não hidrolisa este fosfolípide), o que resultaria na diminuição da fluidez na monocamada lipídica da superfície da partícula de LDL (64). Esta diminuição da fluidez poderia dificultar a peroxidação lipídica, o que explicaria apenas um discreto aumento da oxidação da LDL. No entanto, a ação da PLA₂ sobre a LDL também promove mudanças conformacionais na apoB (153), tais como, aumento das estruturas de folha β , diminuição das estruturas α -helicoidais e aumento de *random coil* (12), o que é similar ao que ocorre na estrutura da apoB-100 da LDL⁻ (126). Uma diferença marcante entre os nossos resultados e aqueles descritos por Asatryan *et al.* (2004) (12) é que os autores demonstraram a formação de LDL⁻ após o tratamento com PLA₂, sem evidência de peroxidação lipídica. Este resultado também foi demonstrado por Benitez *et al.* (2004) (19), onde a modificação oxidativa foi avaliada pela determinação de dienos conjugados e malondialdeído (CLAE). No entanto, no trabalho de Asatryan *et al.* (2004) (12) a lipoperoxidação foi avaliado através de ensaios colorimétricos como o ensaio com azul de leucometileno para análise de peróxidos lipídicos e TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) para análise de aldeídos reativos. No nosso estudo, a peroxidação lipídica foi avaliada através da determinação dos hidroperóxidos dos ésteres de colesterol presentes na LDL, utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por quimioluminescência (figura 24a), que é um método mais sensível e específico para a determinação de hidroperóxidos lipídicos. Adicionalmente, determinaram-se os óxidos de colesterol da LDL, através da cromatografia gasosa acoplada à detecção de ionização de chama (figura 24b), que também é um método bastante sensível e específico para indicar a formação dos produtos de oxidação do colesterol. Além da maior formação de produtos da lipoperoxidação, ocorreu um pequeno aumento da mobilidade eletroforética da LDL isolada do sistema de incubação com PLA₂ (figura 25, linhas 1, 2 e 3) em relação ao tempo zero. Este resultado foi também observado no estudo de Asatryan *et al.* (2004) (12), onde a hidrólise dos fosfolípides produziu mudanças conformacionais na apoB-100, que

poderiam expor diferentes resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos da apoB100, promovendo o aumento da mobilidade eletroforética. Um aumento mais discreto da mobilidade eletroforética também ocorreu nas amostras não incubadas com PLA₂ (figura 25, controle: linhas 3, 4 e 5), indicando a contribuição das modificações oxidativas para o aumento da carga negativa da LDL.

A LDL enriquecida de ácidos graxos livres e modificada pela PLA₂ com concentrações elevadas de lisofosfatidilcolina resulta em diminuição gradual da afinidade de ligação ao receptor de LDL em paralelo com o aumento do conteúdo destes lípidos, que leva à diminuição da depuração de LDL da circulação e pode resultar em modificações oxidativas (20).

5.2.2. *Lipólise in vitro com LPL*

Durante a lipólise, ocorrem modificações secundárias decorrentes das mudanças estruturais e o rearranjo dos componentes da superfície e do core da partícula lipoprotéica devido à remoção de triglicérides. A estrutura em α -hélice da apoB100 (associada à superfície lipídica) diminui e os domínios em folha β também se alteram por ação da LPL (174).

Nos ensaios de lipólise *in vitro* observou-se aumento de LDL⁻ (figura 26/ELISA-mAb) ao longo do tempo de incubação, determinado pelo teste de ELISA com o anticorpo monoclonal. Estudos têm demonstrados que, devido à ação de remoção de triglicérides na lipoproteína pela LPL, ocorrem mudanças conformacionais (174) na lipoproteína, que poderiam resultar na formação de LDL⁻. Além disso, estudos de Benitez *et al.* (2002) (22) demonstraram aumento de LDL⁻ na lipólise *in vitro*, de forma dependente da concentração de ácidos graxos livres (AGL). Esses autores sugerem que a presença de AGLs na LDL contribuiria para a formação de LDL⁻ e que há maior concentração de AGLs na LDL⁻, em comparação com a LDL nativa isolada do plasma humano (22). Adicionalmente, a origem deste aumento poderia estar associada com a alta atividade da PAF-AH (acetil hidrolase do fator de ativação de plaquetas), que é uma serina lipase

responsável pela hidrólise da ligação éster *sn*-2 do PAF, liberando lisofosfatidilcolina e ácidos graxos não esterificados, incluindo ácidos graxos oxidados, que são conhecidos mediadores inflamatórios (21). No entanto, a PAF-AH exerce efeitos antiaterogênicos devido à sua capacidade de se ligar a lipoproteínas, protegendo-as da oxidação (121). Diabéticos e/ou dislipidêmicos têm concentrações elevadas de PAF-AH (90, 156), com distribuição alterada entre a HDL e LDL, havendo aumento de PAF-AH associada com a HDL e uma diminuição em relação à LDL (90).

Por outro lado, a LPL incubada com VLDL resulta na formação de ligantes do PPAR α , limitando a resposta inflamatória (203). Também foi demonstrado que a LPL age na LDL⁻ gerando ligantes do PPAR α , diminuindo a expressão de VCAM 1 e suprimindo a resposta ao NF κ B e AP-1, o que limitaria a resposta inflamatória da LDL⁻ (202). Esses mecanismos contribuiriam para minimizar o efeito da formação de LDL⁻, limitando os efeitos pró-inflamatórios provocados por esta partícula eletronegativa.

5.2.3. *Lipólise in vivo*

Nos ensaios de lipólise *in vivo* observamos aumento significativo da concentração de LDL⁻ no período pós-prandial (figura 30:ELISA-mAb anti-LDL⁻ e figura 31: ELISA-poli anti-LDL⁻), associado ao aumento de LOOH na partícula de LDL (figura 33). Estes resultados estão de acordo com estudos de Ursini *et al.* (2002) (176) que tem demonstrado aumentos da concentração de LDL⁻ associado ao aumento de hidroperóxidos plasmáticos, após a ingestão de uma refeição rica em lípidos, associando a aumento da lipoperoxidação, ou a ingestão de lípidos oxidados, à formação de LDL⁻ *in vivo*. Estes eventos foram prevenidos pelo consumo de vinho, que contém antioxidantes polifenólicos (174). Nesses estudos de lipólise observamos aumento significativo dos hidroperóxidos dos ésteres de colesterol (CE-OOH) na LDL total isolada no período pós-prandial (figura 33A) e na lipólise *in vitro* pela ação da LPL (figura 29A), sem aumento significativo dos

óxidos de colesterol (figuras 33B e 29B). Isso poderia ser decorrente da remoção de triglicérides pela LPL, no *core* da lipoproteína, o que facilitaria a oxidação dos ésteres de colesterol. O aumento da concentração dos hidroperóxidos lipídicos altera profundamente o empacotamento lipídico, modificando a interação lipídio-H₂O e permitindo a penetração de H₂O na partícula, que influencia a estrutura secundária da apoB (126).

Ursini et al (2002) (176) demonstra que o aumento de hidroperóxidos lipídicos plasmáticos associado à LDL⁻, podem ser originados de uma refeição que contém lípidos previamente oxidados. Os hidroperóxidos lipídicos, derivados da dieta, podem se incorporar aos quilomicrons e posteriormente serem transferidos para a LDL na circulação (190), ou, serem formados na circulação devido ao aporte de lípidos insaturados a partir da alimentação, na fase pós-prandial. Estes peróxidos lipídicos incorporados/formados na LDL podem facilitar a peroxidação lipídica principalmente na presença de catalisadores como metais de transição e ERONs (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio) geradas pelas células vasculares (177) causando aumento de LDL⁻ (175).

O estado pós-prandial, caracterizado pela elevação de triglicérides e glicose, é uma situação inflamatória que resulta no recrutamento e ativação de neutrófilos, aumentos de IL-8 e de hidroperóxidos, que podem contribuir para a disfunção endotelial temporária (180); além disso, há redução da atividade da paraoxonase, que é uma enzima associada com a HDL que hidroliza fosfolípidos oxidados e inibe a oxidação da LDL (166). Após uma dieta rica em lípidos, as células endoteliais são expostas prolongamente aos lípidos derivados da dieta e às espécies reativa de oxigênio e nitrogênio liberados pelos leucócitos, o que resulta em estresse oxidativo (67). As condições de hipertriglicemia e hiperglicemia prolongadas, como ocorre no diabetes, poderiam favorecer a formação da LDL⁻, deste modo contribuindo pela elevação observada nestes pacientes (figura 13).

Por outro lado, muitas vitaminas e minerais podem proteger o endotélio vascular, ou, manter a integridade do endotélio (67). Os tocoferóis, carotenóides e a ubiquinona são antioxidantes lipofílicos e o ascorbato é um antioxidante

hidrofílicos encontrados *in vivo* (120). O α -tocoferol, principal antioxidante presente nas lipoproteínas, exerce ação protetora devido à sua habilidade de proteger a peroxidação lipídica na LDL. Além disso, exerce propriedades antiinflamatórias, tais como, a inibição da produção de quimiocinas, citocinas inflamatórias e a adesão de plaquetas pelas células endoteliais ativadas. O α -tocoferol é um potente antioxidante que utiliza a vitamina C para regenerar sua capacidade antioxidante (126). Estudos mostram que estes dois antioxidantes previnem os efeitos adversos provocados pelo estresse oxidativo e a disfunção endotelial induzida por dieta rica em lípidos (131); no entanto, a ingestão dos antioxidantes imediatamente antes de uma refeição isolada não confere proteção, havendo a necessidade de um tempo maior entre a ingestão dos antioxidantes e a dieta rica em gordura para se observar o efeito protetor (32). Assim, os antioxidantes ingeridos na refeição não teriam efeito protetor na formação da LDL⁻.

O teste ELISA-mAb tem a vantagem de ser altamente específico. Por outro lado, o anticorpo monoclonal reconhece um único epítopo, o que diminui a sensibilidade do ensaio. Adicionalmente, se este epítopo presente na LDL⁻ tiver sua conformação alterada, em decorrência da glicação ou da lipólise, o anticorpo monoclonal pode não reconhecer a partícula de LDL⁻ ou diminuir sua afinidade de ligação com o epítopo. Para aumentar a sensibilidade do ensaio com o mAb utilizou-se o sistema conjugado biotina-mAb + streptavidina-HRP + isoluminol + H₂O₂, no qual uma molécula de biotina se liga a 4 moléculas de streptavidina, amplificando o sinal; adicionalmente a utilização do luminol e a detecção por quimiluminescência também aumenta consideravelmente a sensibilidade do ensaio. O anticorpo policlonal pode reconhecer diversos epítopos, o que o torna uma ferramenta importante para os estudos de glicação e lipólise. E o ensaio de ELISA-misto foi realizado com a finalidade de capturar mais quantitativamente pelo anticorpo policlonal e ao adicionar o anticorpo monoclonal, selecionar especificamente os antígenos aderidos ao anticorpo policlonal. A expressão de epítopos na apoB é modulada pela composição lipídica e/ou tamanho e densidade da lipoproteína (89, 109, 172, 82) e, portanto, qualquer modificação na LDL pode ocasionar alteração no reconhecimento desses pelo anticorpo.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. O processo de glicação não enzimática *in vitro*, nas condições avaliadas, promoveu aumento significativo da concentração de LDL⁻, determinada através do teste ELISA-misto e ELISA-poli com os anticorpos monoclonal e policlonal anti-LDL⁻, respectivamente.
2. A ação da PLA₂ sobre a LDL promoveu aumento da formação de LDL⁻, sem modificações oxidativas significantes.
3. A lipólise *in vitro* pela ação da enzima LPL e a lipólise *in vivo* (pós-prandial), nas condições avaliadas, promoveram aumento significativo da concentração de LDL⁻ e modificações oxidativas da LDL.
4. Nos pacientes com Diabetes Mellitus e nos indivíduos intolerantes à glicose houve aumento significativo da concentração de LDL⁻, determinada pelo teste ELISA misto. Apenas nos pacientes com Diabetes Mellitus observou-se aumento significativo da concentração de AGEs.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHMED, M.U.; FRYE, E.B.; DEGENHARDT, T.D.; THORPE, S.R.; BAYNES, J.W. N^ε-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem. J.* 324: 565-570, 1997.
2. AHMED, M.U.; DUNN, J.A.; WALLA, M.D.; THORPE, S.R.; BAYNES, J.W. Oxidative degradation of glucose adducts to protein. Formation of 3-(N epsilon-lysino)-lactic acid from model compounds and glycated proteins. *J. Biol. Chem.* 263: 8816 – 8821, 1988.
3. AHMED, M.U.; THORPE, S.R.; BAYNES, J.W. Identification of N^ε-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J. Biol. Chem.* 261: 4889-4894, 1986.
4. AHMED N. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 67:3-21, 2005.
5. ARMBRUSTER D.A. Fructosamine: structure, analysis, and clinical usefulness. *Clin. Chem.* 33(12): 2153-63, 1987
6. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diab. Care* 20: 1183-1197, 2005.
7. ANDERSON M.M; REQUENA J.R; CROWLEY J.R; THORPE S.R; HEINECKE J.W. The myeloperoxidase system of human phagocytes generates Nepsilon-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. *J. Clin. Invest.* 104(1): 103-13, 1999.
8. ARAKI, N.; HIGASHI, T.; MORI, T.; SHIBAYAMA, R.; KAWABE, Y.; KODAMA, T.; TAKARASHI, K.; SHICHIRI, M.; HORIUCHI, S. Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Eur. J. Biochem.* 230: 408-415, 1995
9. ARAKI, N; UENO, N; CHAKRABARTI, B; MORINO, Y; HORIUCHI, S. Immunochemical evidence for the presence of advanced glycation end

- products in human lens proteins and its positive correlation with aging. *J. Biol. Chem.* 267:10211-4, 1992
10. ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A₂ – a structural review. *Toxicom* 34(8): 827-841, 1996.
 11. ARONSON, D.; RAYFIELD, E.J. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanism. *Cardiovascular Diabetology* 1: 1-10, 2002.
 12. ASATRYAN, L.; HAMILTON, R.T.; ISAS, M.J.; HWANG, J.; KAYED, R.; SEVANIAN, A. LDL phospholipid hydrolysis produces modified electronegative particles with an unfolded apoB100 protein. *J. Lipid Res.* 46(1): 115-2, 2005.
 13. AVOGARRO, P.; CAZZOLATO, G.; BITTOLO-BOM, G. Some questions concerning a small, more electronegative LDL circulating in human plasma. *Atherosclerosis*. 91(1-2):163-71, 1991
 14. BASTA, G.; SCHMIDT, A. M.; DE CATERINA, R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiov. Vasc.* 63: 582-592, 2004.
 15. BHATWADEKAR, D.A.; GHOLE, V.S. Rapid method for the preparation of an AGE-BSA standard calibrator using thermal glycation. *J. Clin. Lab. Anal.* 19: 11-15, 2005.
 16. BEISIEGEL, U. New aspects on the role of plasma lipases in lipoprotein catabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 124:1-8, 1996.
 17. BENGTSSON-OLIVECRONA, G.; OLIVECRONA, T. Phospholipase activity of milk lipoprotein lipase. *Methods Enz.* 197: 345-356, 1991.
 18. BENGTSSON-OLIVECRONA, G.; OLIVECRONA, T. On the pH dependency of lipase activity. *Biochim. Biophys. Acta* 712: 196-199, 1987.
 19. BENÍTEZ, S.; CAMACHO, M.; ARCELUS, R.; VILA, L.; BANCELLS, C.; ORDÓNEZ-LLANOS, J.; SÁNCHEZ-QUESADA, J.L. Increased lysophosphatidylcholine and non-esterified fatty acids content in LDL induces chemokine release in endothelial cells. Relationship with electronegative LDL. *Atherosclerosis* 177: 299-305, 2004a.
 20. BENÍTEZ, S.; VILLEGAS, V.; BANCELLS, C.; JORBA, O.; GONZÁLEZ-SASTRE, F.; ORDÓNEZ-LLANOS, J.; SÁNCHEZ-QUESADA, J.L. Impaired

- binding affinity of electronegative low-density lipoprotein (LDL) to receptor is related to nonesterified fatty acids and lysophosphatidylcholine content. *Biochemistry* 43: 15863-15872, 2004b.
21. BENÍTEZ, S.; SANCHEZ-QUESADA, J.L.; RIBAS, V.; JORBA, O.; BLANCO-VACA, F.; GONZALEZ-SASTRE, F.; ORDONEZ-LLANOS, J. Platelet-activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative low-density lipoprotein subfraction. *Circulation* 108:92-6, 2003
 22. BENÍTEZ, S.; SÁNCHEZ-QUESADA, J.L.; LUCERO, L.; ARCELUS, R.; RIBAS, V.; JORBA, O.; CASTELLVÍ, A.; ALONSO, E.; BLANCO-VACA, F.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J. Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids. *Atherosclerosis* 160: 223-232, 2002.
 23. BOREN, J.; LOOKENE, A.; MAKOVEICHUK, E.; XIANG, S.; GUSTAFSSON, M.; LIU, H.; TALMUD, P.; OLIVECRONA, G.. Binding of low density lipoproteins to lipoprotein lipase is dependent on lipids but not on apolipoprotein B. *J. Biol. Chem.* 276:26916-22, 2001.
 24. BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813-20, 2001
 25. BUCALA, R.; MITCHELL, R.; ARNOLD, K.; INNERARITY, T.; VLASSARA, H. Identification of the major site of apolipoprotein B modification by advanced glycosylation end products blocking uptake by the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 270(18): 10828-10832, 1995.
 26. BUCALA, R.; MAKITA, Z.; VEGA, G.; GRUNDY., KOSCHINSKY, T., CERAMI, A., VLASSARA, H. Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 9441-9445, 1994.
 27. BUCALA, R.; MAKITA, Z.; VEGA, G.; GRUNDY., KOSCHINSKY, T.; CERAMI, A.; VLASSARA, H. Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 9441-9445, 1994.

28. BUCALA, R.; MAKITA, Z.; KOSCHINSKY, T.; CERAMI, A.; VLASSARA, H. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 6434-6438, 1993.
29. BUCHLER, M.; MALFERTHEINER, P.; SCHADLICH, H.; NEVALAINEN, T.J.; FRIESS, H.; BEGER, H.G. Role of phospholipase A2 in human acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 97(6):1521-6, 1989
30. BUONGIORNO, A.M.; SAGRATELLA, E.; MORELLI, S.; BJERRUM, O.J.; MAROCCIA, E.; MORANO, S.; FALLUCA, F.; DI MARIO, U.; SENSI, M. Two polyclonal antisera detect different AGE epitopes in human plasma samples. *Immun. Letters*. 85: 243-249, 2003.
31. BURTON, H.S.; McWEENEY, D.J.; PANDI, P.N. Non-enzymatic browning: browning of phenols and its inhibition by sulphur dioxide. *Nature* 197: 266-268, 1963.
32. CARROL, M.F.; SCHADE, D.S. Timing of antioxidant vitamin ingestion alters postprandial proatherogenic serum markers. *Circ.* 108: 24-31, 2003.
33. CAZZOLATO, G.; AVOGARO, P.; BITTOLO-BON, G. Characterization of a more electronegatively charged LDL subfraction by ion exchange HPLC. *Free Rad. Biol. Chem.* 11: 247-253, 1991.
34. CHANG, J.; MUSSER, J.H.; MCGREGOR, H. Phospholipase A₂: function and pharmacological regulation. *Bioch. Pharm.* 56(15): 2429-2436, 1987.
35. CHANG, Y. H.; ABDALLA, D.S.P.; SEVANIAN, A. Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidation of low density lipoprotein. *Free Rad. Biol. Med.* 23: 202-214, 1997.
36. CHAPPEY, O.; DOSQUET, C.; WAUTIER, M.P.; WAUTIER, J.L. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur. J. Clin. Invest.* 27:97-108, 1997
37. CHELLAN, P.; NAGARAJ, R.H. Early glycation products produce pentosidine cross-links on native proteins – novel mechanism of pentosidine formation and propagation of glycation. *J. Biol. Chem.* 276 (6): 3895-3903, 2001.

38. CHENG, C.F.; OOSTA, G.M.; BENSADOUN, A.; ROSENBERG, R.D. Binding of lipoprotein lipase to endothelial cells in culture. *J. Biol. Chem.* 256: 12893 - 12898, 1981
39. CORONADO-GRAY, A.; VAN ANTWERPEN, R. The physical state of the LDL core influences the conformation of apolipoprotein B-100 on the lipoprotein surface. *FEBS Lett.* 533:21-4, 2003
40. CREAGER, M.A.; LUSCHER, T.F.; COSENTINO, F.; BECKMAN, J.A. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation* 108:1527-32, 2003.
41. CUMMINGS, B.S.; MCHOWAT, J.; SCHELLMANN, R.G. Phospholipase A₂s in cell injury and death. *J. Pharm. Exper. Ther.* 294 (3): 793-799, 2000.
42. DAWNAY, A.B.; MILLAR, D.J. Glycation and advanced glycation end-product formation with icodextrin and dextrose. *Perit. Dial. Int.* 17:52-8, 1997
43. De CASTELLARNAU, C.; SÁNCHEZ-QUESADA, J.L.; BENÍTEZ, S.; ROSA, R.; CAVEDA, L.; VILA, L.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J. Electronegative LDL from normolipemic subjects induces IL-8 and monocyte chemotactic protein secretion by human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:2281-2281, 2000.
44. DEGROOT, J. The AGE of the matrix: c
45. hemistry, consequence and cure. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4:301-5, 2004.
46. DELPIÉRE, G.; COLLARD, F.; FORTPIED, J.; VAN SCHAFTINGEN, E. Fructosamine 3-kinase is involved in an intracellular deglycation pathway in human erythrocytes. *Biochem. J.* 365: 801-808, 2002.
47. DELPIERRE, G.; VANSTAPEL, F.; STROOBANT, V.; VAN SCHAFFINGEN, S. Conversion of a synthetic fructosamine into its 3-phospho derivate in human erythrocytes. *Biochem. J.* 352: 835-839, 2000.
48. DEMUTH, K.; MYARA, I.; CHAPPEY, B.; VEDIE, B.; PECH-AMSELLEM, M.A.; HABERLAND, M.E.; MOATTI, N. A cytotoxic electronegative LDL subfraction is present in human plasma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16: 773-783, 1996.
49. DOBRIAN, A.; LAZAR, V.; TIRZIU, D.; SIMIONESCU, M. Increased macrophage uptake of irreversibly glycated albumin modified-low density

- lipoproteins of normal and diabetic subjects is mediated by non-saturable mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 1317:5-14, 1996.
50. DOI, E.; SHIBATA, D.; MATOBA, T. Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Anal. Biochem.* 118: 172-184, 1981.
 51. DUGI, K.A.; DICHEK, H.L.; TALLEY, G.D.; BREWER, B.; SANTAMARINA-FOJO, S. Human lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site is essential for interaction with lipid substrates. *J. Biol. Chem.* 267(35): 25086-25091, 1992.
 52. DYER, D.G.; BLACKLEDGE, J.A.; THORPE, S.R.; BAYNES, J.W. Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 266 (18): 11654-11660, 1991.
 53. EDWARDS, I. J., WAGNER, J. D., LITWAK, K.N., RUDEL, L.L., CEFALU, W.T. Glycation of plasma low density lipoproteins increases interaction with arterial proteoglycans. *Diabetes Research and Clinical Practice* 46: 9-18, 1999.
 54. ECKEL R.H Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N. Engl. J. Med.* 320:1060-8, 1989.
 55. FABJAN, J.S.; AUKA, P.M.; SCHAUR, R.J.; SEVANIAN, A. Hypochlorite induces the formation of LDL-, a potentially atherogenic low density lipoprotein subspecies. *FEBS letters* 499: 69-72, 2001.
 56. FENARD, D.; LAMBEAU, G.; VALENTIN, E.; LEFEBVRE, JC.; LAZDUNSKI, M.; DOGLIO, A. Secreted phospholipases A2, a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. *J. Clin. Invest.* 104: 611-618, 1999.
 57. FU, M.; REQUENA, J.R.; JENKINS, A.J.; LYONS, T.J.; BAYNES, J.W.; THORPE, S.R. The advanced glycation end product, N ϵ -(carboxymethyl) lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J. Biol. Chem.* 271(17), 9982-9986, 1996.
 58. FURUSAWA, N.; OZAKI, A.; NAKAMURA, M.; MORITA, Y.; OKAZAKI, K. Simple and rapid extraction of total egg lipids for determining organochlorine pesticides in the egg. *J. Chrom. A* 830 (2): 473-476, 1999.

59. GALLE, J., SCHNEIDER, R., WINNER, B., LEHMANN-BODEM, C., SCHINZEL, R., MÜNCH, G., CONZELMANN, E., WANNER, C. Glyc-oxidized LDL impair endothelial function more potently than oxidized LDL: role of enhanced oxidative stress. *Atherosclerosis* 138: 65-77, 1998.
60. GALLEGO-NICASIO, J.; LOPEZ-RODRIGUEZ, G.; MARTINEZ, R.; TARANCON, M.J.; FRAILE, M.V.; CARMONA, P. Structural changes of low density lipoproteins with Cu²⁺ and glucose induced oxidation. *Biopolymers* 72:514-20, 2003
61. GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from Bothrops snake venoms. *Toxicon* 33:1405-24, 1995.
62. GOLDBERG, I.J. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis *J. Lipid. Res.* 37(4):693-707, 1996
63. GOTTO Jr., A.M.; POWNALL, H.J.; HAVEL, R.J. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods enzymol.* 128: 3, 1986.
64. GORSHKOVA, I.N.; MENSCHIKOWSKI, M.; JAROSS, W.; Alterations in the physicochemical characteristics of low and high density lipoproteins after lipolysis with phospholipase A₂. A spin label study. *Biochim. Biophys. Acta.* 1300: 103-113, 1996.
65. HAYASE, F.; NAGARAJ, R.H.; MIYATA, S.; NJOROGI, F.G.; MONNIER, V.M.; Aging of proteins: immunological detection of a glucose-derived pyrrole formed during maillard reaction in vivo. *J. Biol. Chem.* 264: 3758–3764, 1989.
66. HEIDLAND, A.; SEBEKOVA, K.; SCHINZEL, R. Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease. *Am J Kidney Dis.* 38(4 Suppl 1):S100-6, 2001.
67. HENNING, B.; TOBOREK, M.; McCLAIN, C.J. High-energy diets, fatty acids and endothelial cell function: implications for atherosclerosis. *J. Am. Coll. Nutr.* 20 (2): 97-105, 2001.
68. HENRIKSEN, T; MAHONEY, EM; STEINBERG, D. Enhanced Macrophage Degradation of Low Density Lipoprotein Previously Incubated with Cultured Endothelial Cells: Recognition by Receptors for Acetylated Low Density Lipoproteins *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 6499-6503, 1981

69. HODIS, H.N.; KRAMSCH, D.M.; AVOGARO, P.; BITTOLO-BON, G.; CAZZOLATO, G.; HWANG, J.; PETERSON, H.; SEVANIAN, A. Biochemical and cytotoxic characteristics of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL⁻). *J. Lipid. Res.* 35: 669-677, 1994.
70. HUNT, J.V.; SMITH, C.C.T.; WOLFF, S.M. Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes Care* 39: 1440-1424, 1990.
71. HURT-CAMEJO, E.; CAMEJO G.; PEILOT, H.; OORNI, K.; KOVANEN, P. Phospholipase A2 in vascular disease. *Circ. Res.* 89: 298-304, 2001
72. HURT-CAMEJO, E.; CAMEJO, G. Potential involvement of type II phospholipase A2 in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 132:1-8, 1997
73. HWANG, J.; ING, M.H.; SALAZAR, A.; LASSÈGUE, B.; GRIENDLING, K.; NAVAB, M.; SEVANIAN, A.; HSIAI, T.K. Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation. *Circ. Res.* 93:1225-1232, 2003.
74. IMANAGA, Y.; SAKATA, N.; TAKEBAYASHI, S.; MATSUNAGA, A.; SASAKI, J.; ARAKAWA, K.; NAGAI, R.; HORIUCHI, S.; ITABE, H.; TAKANO, T. In vivo and in vitro evidence for the glycooxidation of low density lipoprotein in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 150: 343-355, 2000.
75. IKEDA, K.; HIGASHI, T.; SANO, H.; JINNOUCHI, Y.; YHOSHIDA, M.; ARAKI, T.; UEDA, S.; HORIUCHI, S. N^ε-(carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the maillard reaction. *Biochem.* 35: 8075-8083, 1996.
76. IWASHIMA, Y.; ETO, M.; HATA, A.; KAKU, K.; HORIUCHI, S.; USHIKUBI, F.; SANO, H. Advanced glycation end products-induced gene expression of scanveger receptor in cultured human monocyte-derived macrophagess. *Biochem. Biophysic. Res. Commun.* 277: 368-380, 2000.
77. JAROSS, W.; ECKEY, R.; MENSCHIKOWSKI, M. Biological effects of secretory phospholipase A₂ group IIA on lipoprotein and in atherogenesis. *Eur. J. Clin. Invest.* 32: 383-393, 2002.

78. JONO, T.; MIYAZAKI, A.; NAGAI, R.; SAWAMURA, T.; KITAMURA, T.; HORIUCHI, S. Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) serves as an endothelial receptor for advanced glycation end products (AGE). *FEBS Letters* 511: 170-174, 2002.
79. KALOUSOVA, M. SKRHA, J.; ZIMA, T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol. Res.* 51: 597-604, 2002.
80. KANAUCHI, M.; TSUJIMOTO, N.; HASHIMOTO, T. Advanced glycation end products in nondiabetic patients with coronary artery disease. *Diabetes Care* 24: 1620-1623, 2001.
81. KIKUCHI, S.; SHINPO, K.; TAKEUCHI, M.; YAMAGISHI, S.; MAKITA, Z.; SASAKI, N.; TASHIRO, K. Glycation – a sweet tempter for neuronal death. *Brain Res. Rev.* 41: 306-323, 2003.
82. KINOSHITA, M.; KRUL, E.S.; SCHONFELD, G. Modification of the core lipids of low density lipoproteins produces selective alterations in the expression of apoB-100 epitopes. *J. Lipid Res.* 31: 701-708, 1990.
83. KIRSTEIN M, BRETT J, RADOFF S, OGAWA S, STERN D, VLASSARA H Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor: role in vascular disease of diabetes and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:9010-4, 1990.
84. KLEIMMAN, Y.; KRUL, E.; BUMES, M.; ARONSON, W.; PILEGER, B.; SCHONFELD, G. Lipolysis of LDL with phospholipase A2 alters the expression of selected apo B-100 epitopes and the interaction of LDL with cells. *J. Lipid. Res.* 29: 729-743, 1988.
85. KLEIN, R.L., LAIMINS, M., LOPES-VIRELLA, M.F. Isolation, characterization, and metabolism of the glycated and nonglycated subfractions of low-density lipoproteins isolated from type I diabetic patients and nondiabetic subjects. *Diabetes* 44: 1093-1098, 1995.
86. KNOTT, T.J.; PEASE, R.J.; POWELL, L.M.; WALLIS, S.C.; RALL, S.C.; Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. *Nature* 323:734-8, 1986

87. KOBAYASHI, K., WATANABE, J., UMEDA, F., NAWATA, H. Glycation accelerates the oxidation of low density lipoprotein by copper ions. *Endocrine J.* 42 (4): 461-465, 1995.
88. KOSCHINSKY, T.; H.E, C.J.; MITSUHASHI, T.; BUCALA, R.; LIU, C.; BUENTING, C.; HEITMANN, K.; VLASSARA, H. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94(12):6474-9, 1997.
89. KRUL, E.S.; KLEINMAN, Y.; KINOSHITA, M.; PFLEGER, B.; OIDA, K.; LAW, A.; SCOTT, J.; PEASE, R.; SCHONFELD, G. Regional specificities of monoclonal anti-human apolipoprotein B antibodies. *J. Lipid Res.* 29: 937-947, 1988.
90. KUJIRAOKA, T.; IWASAKI, T.; ISHIHARA, M.; ITO, M.; NAGANO, M.; KAWAGUCHI, A.; TAKAHASHI, S.; ISHI, J.; TSUJI, M.; EGASHIRA, T.; STEPANOVA, I.P.; MILLER, N.E; HATTORI, H. Altered distribution of plasma PAF-AH between HDLs and other lipoproteins in hyperlipidemia and diabetes mellitus. *J. Lipid Res.* 44: 2006-2014, 2003.
91. LAINE, V.J.O.; GRASS, D.S.; NEVALAINEN, T.J. Protection by group II phospholipase A2 against *Staphylococcus aureus*. *J. Immun.* 162: 7402-7408, 1999.
92. LI, Y.M.; MITSUHASHI, T.; WOJCIECHOWICZ, D.; SHIMIZU, N.; LI, J.; STITT, A.; HE, C.; BANERJEE, D.; VLASSARA, H. Molecular identify and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 11047-11052, 1996.
93. LIEUW-A-FA, M.L.M.; VAN HINSBERGH, V.W.M.; TEERLINK, T.; BARTO, R.; TWISK, J.; STEHOUWER, C.D.A.; SCHALKWIJK, C.G.. Increased levels of N^ε-(carboxymethyl) lysine and N^ε-(carboxyethyl) lysine in type 1 diabetic patients with impaired renal function: correlation with markers of endothelial dysfunction. *Nephrol. Dial. Transplant.* 19(3): 631-636, 2004.
94. LIZANO, S.; LOMONTE, B.; FOX, J.W.; GUTIERREZ, J.M. Biochemical characterization and pharmacological properties of a phospholipase A2

- myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Bothrops asper*. *Biochem J* 326 (Pt 3):853-9, 1997
95. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.I.; RANDALL, A.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
 96. LUND-KATZ, S.; LABODA, H.M.; McLEAN, L.R.; PHILLIPS, C. Influence of molecular packing and phospholipid type on rates of cholesterol exchange. *Biochemistry* 27: 3416-3423, 1988.
 97. LYONS, T.J. Glycation and oxidation: a role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 71: 26B-31B, 1993
 98. LYONS, T.J.; KLEIN, R.L.; BAYNES, J.W.; STEVENSON, H.C.; LOPES-VIRELLA, M.F. Stimulation of cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages by low-density lipoproteins from type I (insulin-dependent) diabetic patients: the influence of non-enzymatic glycosylation of low-density lipoproteins. *Diabetologia* 30: 916-923, 1987.
 99. LYONS, T.J.; BAYNES, J.W.; PATRICK, J.S.; COLWELL, J.A.; LOPES-VIRELLA, M.F. Glycosylation of low density lipoprotein in patients with type I (insulin-dependent) diabetes: correlation with other parameters of glycaemic control. *Diabetologia* 29: 685-689, 1986.
 100. MAKINO, H.; SHIKATA, K.; HIRONAKA, K.; KUSHIRO, M.; YAMASAKI, Y.; SUGIMOTO, H.; OTA, Z.; ARAKI, N.; HORIUCHI, S. Ultrastructure of nonenzymatically glycosylated mesangial matrix in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 48:517-26, 1995
 101. MAKITA, Z.; VLASSARA, H.; CERAMI, A.; BUCALA, R. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *J. Biol. Chem.* 267: 5133-5138, 1992.
 102. MAKOVEICHUK, E.; LOOKENE, A.; OLIVECRONA, G. Mild oxidation of lipoproteins increases their affinity for surfaces covered by heparan sulfate and lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Res Commun.* 252(3):703-10, 1998
 103. MAMPUT, J.C.; REINER, G. Differentiation of human monocytes to monocyte-derived macrophages is associated with increased lipoprotein lipase-induced tumor necrosis factor-alpha expression and production: a process

- involving cell surface proteoglycans and protein kinase C. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 1405-1411, 1999.
104. MANN, W.A.; MEYER, N.; BERG, D.; GRETEN, H.; BEISIEGEL, U. Lipoprotein lipase compensates for the defective function of apo E variants in vitro by interacting with proteoglycans and lipoprotein receptors. *Atherosclerosis* 145:61-9, 1999
 105. MATJUS, P.; SLOTTE, J.P. Does cholesterol discriminate between sphingomyelin and phosphatidylcholine in mixed monolayers containing both phospholipids? *Chem. Phys. Lipids* 81: 69-80, 1996.
 106. MATSUI, H.; OKUMURA, K.; TOKI, Y.; HAYAKAWA, T. Low-density lipoprotein particle size as an independent predictor of glycosylated low-density lipoprotein level. *Diabetes Care*, 22 (7): 1220-1221, 1999.
 107. MERKEL, M.; ECKEL, R.H; GOLDBERG, I.J. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* 43:1997-2006, 2002
 108. MILLAR, D.J.; HOLMES, C.; FAICT, D.; DAWNAY, A. Comparison of in vitro AGE formation between standard PD fluid and a novel bicarbonate/lactate formulation. *Adv Perit Dial* 14:191-4, 1998
 109. MILNE, R.W.; BLANCHETTE, L.; THEOLIS, R.; WEECH, P.K.; MARCEL, Y.L. Monoclonal antibodies distinguish between lipid-dependent and reversible conformational states of human apolipoprotein B. *Mol. Immunol.* 24: 435-447, 1987.
 110. MIYAMOTO, S.; DUPAS, C.; MUROTA, K.; TERAOKA, J. Phospholipids hydroperoxides are detoxified by phospholipase A₂ and GSH peroxidase in rat gastric mucosa. *Lipids* 38(6): 641, 2003.
 111. MIYATA, T.; INAGI, R.; ASAHI, K.; YAMADA, Y.; HORIE, K.; SAKAI, H.; UCHIDA, K.; KUROKAWA, K. Generation of protein carbonyls by glycoxidation and lipoxidation reactions with autoxidation products of ascorbic acid and polyunsaturated fatty acids. *FEBS Lett* 437:24-8, 1998
 112. MORO, E.; ALESSANDRINI, P.; ZAMBON, C.; PIANETTI, S.; PAIS, M.; CAZZOLATO, G.; BON, G.B. Is glycation of low density lipoprotein in patients

- with type 2 diabetes mellitus a LDL pre-oxidative condition? *Diabetic. Medicine* 16: 663-669, 1999.
113. MORO, E.; ZAMBON, C.; PIANETT, S.; CAZZOLATO, G.; PAIS, M.; BOM, G.B. Electronegative low density lipoprotein subform (LDL⁻) is increased in type 2 (non-insulin-dependent) microalbuminuric diabetic patients and is closely associated with LDL susceptibility to oxidation. *Acta Diabetol.* 35: 161-164, 1998.
 114. MORTENSEN, H.B.; CHRISTOPHERSEN, C. Comments on "Kinetic behaviour of the glucose-hemoglobin labile adduct in normal and diabetic erythrocytes". *Clin. Chim. Acta* 134: 317-326, 1983.
 115. MOWRI, H.O.; FREI, B.; KEANEY, Jr. Glucose enhancement of LDL oxidation is strictly metal ion dependent. *Free Radic. Biol. Med.* 29:814-24, 2000
 116. MULLARKEY, C.J.; EDELSTEIN, D.; BROWNLEE, M. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173(3): 932-939, 1990.
 117. MURPHY, H.C.; ALA-KORPELA, M.; WHITE, J.J.; RAOOF, A J.D.; BELL, J.D.; BARNARD, M.L.; BURNS, S.P.; LLES, R.A. Evidence for distinct behavior of phosphatidylcholine and sphingomyelin at the low density lipoprotein surface. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234: 733-737, 1997.
 118. NAGAI, R.; IKEDA, K.; HIGASHI, T.; SANO, H.; JINNOUCHI, Y.; ARAKI, T.; HORIUCHI, S. Hydroxyl radical mediates N^ε - (carboxymethyl)lysine formation from Amadori product. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234: 167-172, 1997.
 119. NERLICH, A.G.; SCHLEICHER, E.. N^ε-(carboxymethyl)lysine in atherosclerotic vascular lesions as a marker for local oxidative stress. *Atherosclerosis* 144: 41-47, 1999.
 120. NIKI, E.; NOGUUCHI, N. Dynamics of antioxidant action of vitamin E. *Acc. Chem. Res.* 37 (1): 45-51, 2004.
 121. NOTO, H.; HARA, M.; KARASAWA, K.; ISO-O, N.; SATOH, H.; TOGO, M.; HASHIMOTO, Y.; YAMADA, Y.; KOSADA, T.; KAWAMURA, M.; KIMURA, S.;

- TSUKAMOTO, K. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase binds to all the murine lipoproteins, conferring protection against oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 829-835, 2003.
122. OHGAMI, N.; NAGAI, R.; IKEMOTO, M.; ARAI, H.; MIYAZAKI, A.; HAKAMATA, H.; HORIUCHI, S.; NAKAYAMA, H.; CD36 serves as a receptor for advanced glycation endproducts (AGE). *J. Diabetes and its complication*, 16: 56-59, 2002.
 123. OHGAMI, N.; NAGAI, R.; MIYAZAKI, A.; IKEMOTO, M.; ARAI, H.; HORIUCHI, S.; NAKAYAMA, H. Scavenger receptor class B type I – mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* 276 (16): 13348-13355, 2001.
 124. ÖÖRNI, K.; PENTIKAINEN, M.O. KORPELA-ALA, M. KOVANEN, P.T. Agregation, fusion, and vesicle formation of modified low density particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions. *J. Lip. Res.* 41: 1703-1714, 2000.
 125. ÖÖRNI, K.; HAKALA, J.K.; ANNILA, A.; ALA-KORPELA, M.; KOVANEN, P.T. Sphingomyelinase induces aggregation and fusion, but phospholipase A2 only aggregation, of low density lipoprotein (LDL) particles. Two distinct mechanisms leading to increased binding strength of LDL to human aortic. proteoglycans. *J Biol Chem.* 273(44):29127-34, 1998.
 126. PACKER, J.E.; SLATER, T.F.; WILLSON, R.L. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 278: 737-738, 1979.
 127. PARASASSI, T.; BITTOLO-BON, G.; BRUNELLI, R.; CAZZOLATO, G.; KRASNOWSKA, E.K.; MEL, G.; SEVANIAN, A.; URSINI, F. Loss of apoB-100 secondary structure and conformation in hydroperoxide rich, electronegative LDL⁻. *Free Rad. Biol. Chem.* 31(1): 82-89, 2001.
 128. PECH-AMSELLEM, M.A.; MYARA, I.; PICO, I.; MAZIERE, J.C.; MOATTI, N. Oxidative modifications of low-density lipoproteins (LDL) by the human endothelial cell line EA hy 926. *Experientia* 52: 234-238.

129. PENTIKAINEN, M.O.; OKSJOKI, R.; OORNI, K.; KOVANEN, P.T.
Lipoprotein lipase in the arterial wall: linking LDL to the arterial extracellular matrix and much more. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 22(2):211-7, 2002.
130. PICARD, S. Lipoprotein glyco-oxidation. *Diabete & Metabolisme (Paris)*, 21: 89-94, 1995.
131. PLOTNICK, G.D.; CORRENTI, M.C.; VOGEL, R.A.; Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal. *JAMA.* 278: 1682-1686, 1997.
132. PONSNER, I.; DeSANCTIS, J. Kinetics of product inhibition and mechanisms of lipoprotein lipase activation by apolipoprotein C-II. *Biochemistry* 26: 3711-3717, 1987.
133. RAHBAR, S.; FIGAROLA, J.L. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Arch. Biochem. Biophys.* 419: 63-79, 2003.
134. REDDY, S.; BICHLER, J.; WELLS-KNECHT, K.J.; THORPE, S.R.; BAYNES, J.W. N epsilon-(carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins. *Biochemistry* 34:10872-8, 1995
135. RICE-EVANS, C.; LEAKE, D.; BRUCKDORFER, R.; DIPLOCK, A.T.
Practical approaches to low density lipoprotein oxidation: whys, wherefores and pitfalls. *Free Rad. Res.* 25 (4): 285-311, 1996.
136. ROMANO, M.; ROMANO, E.; BJORKERUD, S.; HURT-CAMEJO, E.
Ultrastructural localization of secretory type II phospholipase A2 in atherosclerotic regions of human arteries. *Arterioscl. Thromb. vasc. Biol.* 18: 519-525, 1998.
137. RONG, J.X.; RANGASWAMY, S.; SHEN, L.; DAVE, R.; CHANG, Y.H.; PETERSON, H.; HODIS, H.N.; CHISOLM, G.M.; SEVANIAN, A. Arterial Injury by Cholesterol Oxidation Products Causes Endothelial Dysfunction and Arterial Wall Cholesterol Accumulation *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*; 18: 1885 - 1894, 1998.
138. RUTLEDGE, J.C.; WOO, M.M.; REZAI, A.A.; CURTISS, L.K.; GOLDBERG, I.J. Lipoprotein lipase increases lipoprotein binding to the artery wall and

- increases endothelial layer permeability by formation of lipolysis products. *Circ. Res.* 80: 819-828, 1997.
139. SAKATA, N.; UESUGI, N.; TAKEBAYASHI, S.; NAGAI, R.; JONO, T.; HORIUCHI, S.; TAKEYA, M.; ITABE, H.; TAKANO, T.; MYINT, T.; TANIGUCHI, N. Glycooxidation and lipid peroxidation of low-density lipoprotein can synergistically enhance atherogenesis. *Cardiov. Res.* 49: 466-475, 2001.
 140. SAKURAI, T.; KIMURA, S.; NAKANO, M.; KIMURA, H. Oxidative modification of glycated low density lipoprotein in the presence of iron. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 177 (1): 433-439, 1991.
 141. SANCHEZ-QUESADA, J.L.; BENITEZ, S.; ORDONEZ-LLANOS, J. Electronegative low-density lipoprotein. *Curr. Opin. Lipidol.* 15:329-35, 2004
 142. SANCHEZ-QUESADA, J.L.; CAMACHO, M.; ANTON, R.; BENITEZ, S.; VILA, L.; ORDONEZ-LLANOS, J. Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells. *Atherosclerosis* 166:261-70, 2003
 143. SANCHEZ-QUESADA, J.L.; BENITEZ, S.; OTAL, C.; FRANCO, M.; BLANCO-VACA, F.; ORDONEZ-LLANOS, J. Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects. *J. Lipid Res.* 43:699-705, 2002
 144. SÁNCHEZ-QUESADA, J.L.; PÉREZ, A.; CAIXÀS, A.; RIGLA, M.; PAYÉS, A.; BENÍTEZ, S.; ORDÓNEZ-LLANOS, J. Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modifications. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(7): 3243-3249, 2001.
 145. SÁNCHEZ-QUESADA, J.L.; OTAL-ENTRAIGAS, C.; FRANCO, M.; JORBA, O.; GONZÁLEZ-SASTRE, F.; BLANCO-VACA, F.; ORDÓNEZ-LLANOS, J. Effect of simvastatin treatment on the electronegative low-density lipoprotein present in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am. J. Cardiol.* 84: 655-659, 1999.
 146. SÁNCHEZ-QUESADA, J.L.; PÉREZ, A.; CAIXÀS, A.; ORDÓNEZ-LLANOS, J.; CARRERAS, G.; PAYÉS, A.; GONZÁLEZ-SASTRE, F.; LEIVA, A.

- Electronegative low density lipoprotein subform is increased in patients with short-duration IDDM and is closely related to glycaemic control. *Diabetologia* 39: 1469-1476, 1996.
147. SANGUINETTI, S.M.; SCHREIER, L.E.; ELBERT, A.; FASULO, V.; FERRARI, N.; WIKINSKI, R.L. Detection of structural alterations in LDL isolated from type 2 diabetic patients: application of the fructosamine assay to evaluate the extent of LDL glycation. *Atherosclerosis*. 143(1):213-5, 1999.
 148. SAKURAI, T.; TSUCHIYA, S. Superoxide production from nonenzymatically glycosylated protein. *FEBS Letters* 236: 406-410, 1988.
 149. SARTIPY, P.; HURT-CAMEJO, E. Modification Of Plasma Lipoproteins By Group IIA Phospholipase A(2): Possible Implications For Atherogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* 9(8):232-8, 1999.
 150. SASAKI, J.; COTTAM, G.L. Glycosylation of LDL decreases its ability to interact with high-affinity receptors of human fibroblasts *in vitro* and decreases its clearance from rabbit plasma *in vivo*. *Biochem. Biophys. Acta.* 713: 199-207, 1982.
 151. SAXENA, U.; WITTE, L.D.; GOLDBERG, I.J. Release of endothelial cell lipoprotein lipase by plasma lipoproteins and free fatty acids. *J. Biol. Chem.* 264: 4349-4355, 1989.
 152. SCHLEICHER, E.; DEUFEL, T.; WIELAND, O.H. Non-enzymatic glycosilation of human serum lipoproteins – elevated ϵ -lysine glycosylated low density lipoprotein in diabetic patients. *FEBS Letters* 129: 1-4, 1981
 153. SCHIMIDT, A.M.; HORI, O.; BRETT, J.; YAN, S.D.; WAULTIER, J.L.; STERN, D. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler. Thromb.* 14: 1521-1528, 1994.
 154. SCHIMIDT, A.M.; VIANNA, M.; GERLACH, M.; BRETT, J.; RYAN, J.; KAO, J.; ESPOSITO, C.; HEGARTY, H.; HURLEY, W.; CLAUSS, M.; WANG, F.; PAN, YC.E.; TSANG, T.C.; STERN, D. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung

- which are present on the endothelial cell surface. *J. Biol. Chem.* 267 (21): 14987-14997, 1992.
155. SEGREST, J.P.; JONES, M.K.; DE LOOF, H.; DASHTI, N. Structures of apolipoprotein B-100 in low density lipoprotein. *J. Lipid. Res.* 42: 1346-1367, 2001.
 156. SERBAN, M.; TANASEANU, C.; KOSAKA, T.; VIDULESCU, C.; STOIAN, I.; MARTA, D.S.; TANASEANU, S.; MOLDOVEANU, E. Significance of platelet-activating factor acetylhydrolase in patients with non-insulin-dependent (type 2) *diabetes mellitus*. *J. Cell Mol. Med.* 6(4): 643-647, 2002.
 157. SEVANIAN, A.; BITTOLO-BON, G.; CAZZOLATO, G.; HODIS, H.; HWANG, J.; ZAMBURLINI, A.; MAIORINO, M.; URSINI, F. LDL⁻ is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein. *J. Lipid. Res.* 38: 419-428, 1997.
 158. SMITH, M.A.; TANEDA, S.; RICHEY, P.L.; MIYATA, S.; YAN, S.D.; STERN, D.; SAYRE, L.M.; MONNIER, V.M. PERRY, G. Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:5710-4, 1994.
 159. SMITH, P.R.; THORNALLEY, P.J. Mechanism of the degradation of non-enzymatically glycated proteins under physiological conditions: studies with the model fructosamine, N ϵ -(deoxy-D-fructos-1-y)hippuryl-lysine. *Eur. J. Biochem.* 210: 729-739, 1992.
 160. SOBAL, G.; MENZEL, E.J.; SINZINGER, H. The effects of glycation/glycooxidation on the liberation of 8-epi-PGF_{2 α} from low density lipoprotein during its in vitro oxidation. *Prost. Leuk. Essent. Fatty Acids* 62(4): 217-224, 2000.
 161. SOMMER, A.; PRENNER, E.; GORGES, R.; STUTZ, H.; GUILHOFFER, H.; KOSTNER, G.M.; PALTAULF, E.; HERMETTER, A. Organization of phosphatidylcholine and sphingomyelin in the surface monolayer of low density lipoprotein and lipoprotein (a) as determined by time-resolved fluorometry. *J. Biol. Chem.* 267: 24217-24222, 1992.
 162. STEFANOWICZ, P.; BORATYNSKI, J.; KANSKA, U.; PETRY, I.; SZEWCZUK, Z. Evaluation of high temperature glycation of proteins and

- peptides by electrospray ionization mass spectrometry. *Acta Bioch. Pol.* 48 (4): 1137-1141, 2001.
163. STEINBER, G.D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T.E.; KHOO, J.C.; WITZTUM, J.L. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* 320:915-24, 1989
 164. STEINBRECHER, U.P., WITZTUM, J.L. Glucosylation of low-density lipoprotein to an extent comparable to an extent comparable to that seen in diabetes slows their catabolism. *Diabetes* 33: 130-134, 1984.
 165. STONE, W.L.; SCOTT, R.L.; STEWART, E.M.; KHESHTI, A. Lipoprotein alterations in the spontaneously hypertensive rat fed diets deficient in selenium and vitamin E *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 206(2):130-7, 1994.
 166. SUTHERLAND, W.H.F.; WALKER, R.J.; JONG, S.A.; VAN RIJ, A.M.; PHILIPS, V.; WALKER, H.L. Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 1340-1347, 1999.
 167. SZWERGOLD, B.S.; HOWELL, S.; BEISSWENGER, P.J. Human fructosamine-3-kinase: purification, sequencing, substrate specificity, and evidence of activity in vivo. *Diabetes.* 49: 1627-1634, 2001.
 168. TAKETO, M.M.; SONOSHITA, M. Phospholipase A2 and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585:72-6, 2002
 169. TERTOV, V.V.; BITTOLO-BON, G.; SOBENIN, I.A.; CAZZOLATO, G.; OREKHOV, A.N.; AVOGARRO, P. Naturally occurring modified low density lipoproteins are similar if not identical: More electronegative and desialylated lipoprotein fractions. *Exp. Mol. Pathol.* 62: 166-172, 1995.
 170. THORNALLEY, P.J.; LANGBORG, A.; MINHAS, H.S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.* 344: 109-116, 1999
 171. THORNALLEY, P.; WOLFF, S.; CRABBE, J.; STERN, A. The autoxidation of glyceraldehyde and other simple monosaccharides under physiological conditions catalysed by buffer ions.. *Biochim. Biophys. Acta.* 797: 276-287, 1984.

172. TIKKANEN, M.J.; GOLE, T.G.; SCHONFELD, G. Differential reactivity of human low density lipoproteins with monoclonal antibodies. *J. Lipid Res.* 24: 1494-1499, 1983.
173. TRAVERSO, N.; MENINI, S.; COTTALASSO, D.; ODETTI, P.; MARINARI, U.M.; PRONZATO, M.A. Mutual interactions between glycation and oxidation during non-enzymatic protein modification. *Biochim. Biophys. Acta.* 1336: 409-418, 1997.
174. URSINI, F.; DAVIES, K.J.A.; MAIORINO, M.; PARASASSI, T.; SEVANIAN, A. Atherosclerosis another misfolding disease? *Trends Molec. Med.* 8(8): 370-374, 2002a.
175. URSINI, F.; SEVANIAN, A. Postprandial oxidative stress. *Biol. Chem.* 383: 599-605, 2002b.
176. URSINI, F.; SEVANIAN, A. Wine polyphenols and optimal nutrition. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 957: 200-209, 2002c.
177. URSINI, F.; ZAMBURLINI, A.; CAZZOLATO, G.; MAIORINO, M.; BOM, G.B.; SEVANIAN, A. Postprandial plasma lipid hydroperoxides: a possible link between diet and atherosclerosis. *Free Radical Biol. Med.* 25(2): 250-252, 1998.
178. VADAS, P. Elevated plasma phospholipase A2 levels: correlation with the hemodynamic and pulmonary changes in gram-negative septic shock. *J Lab Clin Med.* 104(6):873-81, 1984.
179. VAN BARLINGEN, H.H.J.J.; KOCK, L.A.W.; MAN, H.A.F.; ERKELENS, W.; BRUIN, T.W.A. *In vitro* lipolysis of human VLDL: effect of different VLDL compositions in normolipidemia, familial combined hyperlipidemia and familial hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 121(1): 75-84, 1996.
180. VAN OOSTROM, A.J.H.H.M.; SIJMONSMA, T.P.; VERSEYDEN, C.; JANSEN, E.H.J.M.; KONING, E.J.P.; RABELINK, T.J.; CABEZAS, M.C. Postprandial recruitment of neutrophils may contribute to endothelial dysfunction. *J. Lipid Res.* 44: 576-583, 2003.
181. VLASSARA, H.; PALACE, M.R. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J. Internal Medicine* 251: 87-101, 2002.

182. VEDIE, B; JEUNEMAITRE, X; MEGNIEN, JL, *et al.* Charge heterogeneity of LDL in asymptomatic hypercholesterolemic men is related to lipid parameters and variations in the ApoB and CIII genes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:1780-91998
183. VILELLA, E.; JOVEN, J.; FERNANDEZ, M.; VILARO, S.; BRUNZELL, J.D.; OLIVERONA, T.; BENGSTOSSON-OLIVECRONA, G. Lipoprotein lipase in human plasma is mainly inactive and associated with cholesterol-rich lipoproteins. *J. Lip. Res.* 34: 1555-1564, 1993.
184. WAUTIER, M.P.; CHAPPEY, O.; CORDA, S.; STERN, D.M.; SCHMIDT, A.M.; WAUTIER, J.L. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280(5):E685-94, 2001
185. WANG, X.; BUCALA, R.; MILNE, R. Epitopes close to the apolipoprotein B low density lipoprotein receptor-binding site are modified by advanced glycation end products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 7643-7647, 1998.
186. WELLS-KNECHT, M.C.; THORPE, S.R.; BAYNES, J.W. Pathways of formation of glycoxidation products during glycation of collagen. *Biochemistry* 34: 15134-15141, 1995a.
187. WELLS-KNECHT, M.C.; ZYZAK, D.V.; LITCHFIELD, J.E.; THORPE, S.R.; BAYNES, J.W. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* 34: 3702-3709, 1995b
188. WENDT, T.; TANJI, N.; GUO, J.; HUDSON, B.I.; BIERHAUS, A.; RAMASAMY, R.; ARNOLD, B.; NAWROTH, P.P. YAN, S.F.; D'AGATI, V.; SCHMIDT, A.M. Glucose, glycation, and RAGE: implications for amplification of cellular dysfunction in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14:1383-95, 2003
189. WITZTUM, J.L.; STEINBERG, D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 88:1785-92, 1991.

190. WOLFF, S.P.; NOUROOZ-ZADEH, J. Hypothesis: UK consumption of dietary lipid hydroperoxides – a possible contributory factor to atherosclerosis. *Atherosclerosis* 119: 261-263, 1996.
191. YAMAGUCHI, Y.; KUNITOMO, M.; HAGINAKA, J. Assay methods of modified lipoprotein in plasma. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 781: 313-30, 2002
192. YAMAMOTO, M.; RANGANATHAN, S.; KOTTKE, B.A.; Metabolism of glycosylated very-low-density lipoprotein in human skin fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 875: 410, 1986.
193. YAMAMOTO, Y. Chemiluminescence-based high-performance liquid chromatography assay of lipid hydroperoxides. *Method. Enzimol.* 233: 319-324, 1994.
194. YANG, C-Y.; GU, Z-W.; YANG, M.; GOTTO, A.M. Primary structure of apoB-100. *Chem. Phys. Lip.* 67/68: 99-104, 1994.
195. YANG, C.Y.; CHEN, S.H.; GIAN TURCO, S.H.; BRADLEY, W.A.; SPARROW, J.T.; TANIMURA, M.; LI, W-H.; SPARROW, D.A.; DeLOOF, H.; ROSSENEU, M; LEE, F-S; GU, Z-W.; GOTTO, A.M.; CHAN, L. Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B-100. *Nature* 323:738-42, 1986
196. YANO, M.; INOUE, M.; MAEHATA, E.; SHIBA, T.; YAMAKADO, M.; HIRABAYASHI, Y.; TANIYAMA, M.; SUZUKI, S. Increased electronegative charge of serum low-density lipoprotein in patients with diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta.* 340: 93-98, 2004.
197. YEBOAH, F.K.; ALLI, L.; YAYLAYAN, V.A. Reactivities of D-glucose and D-fructose during glycation of bovine serum albumin. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3164-3172, 1999.
198. YIN, B.; LOIKE, J.D.; KAKO, Y.; WEINSTOCK, P.H.; BRESLOW, J.L.; SILVERSTEIN, S.C.; GOLDBERG, I.J. Lipoprotein lipase regulates Fc receptor-mediated phagocytosis by macrophages maintained in glucose-deficient medium. *J. Clin. Inv.* 100: 649-657, 1997.

199. YLA-HERTTUALLA, S.; LIPTON, B.A.; ROSENFELD, M.E.; GOLDBERG, I.J.; STEINBERG, D.; WITZTUM, J.L. Macrophages and smooth muscle cells express lipoprotein lipase in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88: 10143-10147, 1991.
200. ZHU, W.; SANO, H.; NAGAI, R.; FUKUHARA, K.; MIYAZAKI, A.; HORIUCHI, S. The role of galectin-3 in endocytosis of advanced glycation end products and modified low density lipoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 1183-1188, 2001.
201. ZIMMERMAN, R.; PANZENBÖCK, U.; WINTERSPERGER, A.; LEVAK-FRANK, S.; GRAIER, W.; OTTO, G.; FRITZ, G.; KOSTNER, G.M.; ZECHNER, R. Lipoprotein lipase mediates the uptake of glycated LDL in fibroblasts, endothelial cells, and macrophages. *Diabetes* 50(7) 1643-1653, 2001.
202. ZIOUZENKOVA, O.; ASATRYAN, L.; SAHADY, D.; ORASANU, G.; PERREY, S.; CUTAK, B.; HASSEL, T.; AKIYAMA, T.E.; BERGER, J.P.; SEVANIAN, A.; PLUTZKY, J. Dual roles for lipolysis and oxidation in peroxisome proliferation-activation receptor responses to electronegative low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.*, vol.278 (41), p.39874-39881, 2003.
203. ZIOUZENKOVA, O.; PERREY, S.; ASA TRYAN, L.; HWANG, J.; MAcNAUL, K.L.; MOLLER, D.E.; RADER, D.J.; SEVANIAN, A.; ZECHNER, R.; HOEFLE, G.; PLUTZKY, J. Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins generates PPAR ligands: evidence for an antiinflammatory role for lipoprotein lipase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 100, p.2730-2735, 2003.
204. ZIOUZENKOVA, O.; SEVANIAN, A. Oxidative modification of low-density lipoprotein (LDL) in HD patients: role in electronegative LDL formation. *Blood Purif* 18:169-76, 2000.
205. ZYZAK, D.V.; RICHARDSON, J.M.; THORPE, S.R.; BAYNES, J.W. Formation of reactive intermediates from Amadori compounds under physiological conditions. *Arch. Biochem. Biophys.* 316 547-554, 1995.

ANEXOS

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacéuticas
São Paulo

TABELAS E MEDICAMENTOS DOS PACIENTES ESTUDADOS E GRUPOS CONTROLES:

Dados do perfil lipídico dos pacientes diabéticos, indivíduos intolerantes à glicose e os grupos controles:

DM I					
	TG	COL	VLDL	HDL	LDL
1	53	145	11	34	100
2	55	162	11	63	88
3	118	157	24	61	72
4	92	198	18	141	146
5	60	144	12	48	84
6	60	118	12	47	60
7	76	136	15	39	82
8	50	163	10	26	128
9	76	166	15	45	106
10	99	100	20	26	55
11	147	174	29	26	119
12	43	122	9	38	75
13	53	118	11	56	52
14	165	108	33	14	61
15	77	211	15	26	169
16	62	136	12	50	74
17	44	120	9	38	73
18	78	135	57	62	16
19	62	108	12	38	58
20	52	159	10	73	75
21	258	170	52		
22	102	150	94	36	20
23	77	255	15	57	182
24	92	177	18	67	91
25	85	161	17	34	109
26	57	96	11	43	41
27	225	207	45	57	78
28	208	251	42	39	170
29	105	262	21	63	178
30	244	269	49	50	170
31	362	331	72	80	179
32	132	200	26	50	124

DM II					
	TG	COL	VLDL	HDL	LDL
1	273	161	55	39	67
2	77	187	15	55	117
3	297	170	59	53	58
4	116	126	23	10	82
5	82	176	16	68	92

6	77	173	15	23	134
7	108	149	22	18	110
8	161	185	32	23	131
9	141	212	28	37	147
10	213	247	43	40	164
11	100	188	20	35	133
12	119	259	24	34	201
13	131	146	26	25	95
14	258	170	52		
15	47	77	33	35	9
16	157	153	31	35	86
17	209	286	42	42	202
18	266	211	53	28	129
19	241	183	48	24	111
20	160	260	32	64	164
21	160	260	32	64	164
22	173	362	35	55	272
23	259	207	52	40	115
24	202	196	40	41	115
25	158	200	32	54	114
26	77	227	15	35	177
27	134	213	27	42	144
28	234	186	47	41	98
29	253	258	51	53	154
30	157	235	31	56	148
31	198	151	40	49	64
32	258	199	52	35	112
33	199	220	40	36	144
34	254	277	51	44	182
35	296	204	59	52	93
36	391	232	78	48	106
37	333	191	67	53	71
38	219	176	44	34	98
39	123	149	25	47	77

IGT

	TG	COL	VLDL	HDL	LDL
1	284	180	57	32	91
2	166	218	37	65	116
3	270	193	54	41	98
4	198	275	40	41	191
5	327	232	65	44	125
6	121	223	24	66	133
7	152	197	30	45	122
8	227	217	45	46	126
9	165	242	33	46	163
10	250	204	50	45	109
11	175	204	15	60	129
12	124	223	25	47	149
13	140	201	20	49	132
14	259	212	52	47	113
15	125	207	25	55	127

Controle 1

	TG	COL	VLDL	HDL	LDL
1	103	185	17	54	110
2	223	204	9	31	128
3	101	197	11	41	136
4	96	240	10	42	156
5	122	267	13	54	189
6	169	274	22	72	168
7	148	186	11	49	107
8	145	201	10	43	129
9	57	237	7	23	202

Controle 2

	TG	COL	VLDL	HDL	LDL
1	82	158	16	37	104
2	122	215	24	59	132
3	163	190	33	37	120
4	110	160	22	26	112
5	134	172	27	27	118
6	137	216	27	34	155
7	67	210	13	39	158
8	196	213	39	41	132
9	154	170	31	20	119
10	174	161	35	30	96
11	105	194	21	30	143

Legenda: DM I (Diabetes Mellitus tipo I), DM II (Diabetes Mellitus tipo II), IGT (Indivíduos intolerantes à glicose), TG (triglicérides), COL (colesterol), VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade), HDL (lipoproteína de alta densidade), LDL (lipoproteína de baixa densidade).

Dados bioquímicos de Hemoglobina glicada (Hb glic.), frutamina (FRUT.) e glicose dos dos pacientes diabéticos, indivíduos intolerantes à glicose e os grupos controles:

DM I

	Hb glic.	FRUT.	GLICOSE
1	15.60	3.07	94
2	12.90	2.53	423
3	14.60	5.40	402
4	10.40	4.13	445
5	9.50	2.22	243
6	9.50	2.14	100
7	7.10	2.09	184
8	9.70	2.63	75
9	12.10	4.50	161
10	11.10	1.14	68
11	9.50	2.89	192

12	7.40	2.39	196
13	9.40	2.82	114
14	7.50	2.48	96
15	12.30	3.96	138
16	10.30	1.79	181
17	8.80	1.10	185
18	10.70	3.15	299
19	8.80	3.56	74
20	14.50	3.39	443
21	6.10	2.52	99
22	10.00	2.67	266
23	9.70	1.95	47
24	7.40	2.83	140
25	9.80	2.58	177
26		3.66	336
27	13.60	3.26	242
28	16.30	2.38	315
29	8.20	3.60	96
30	7.70	5.50	102
31	10.60	2.80	153
32	6.70	3.60	133

DM II

	Hb glic.	FRUT.	GLICOSE
1	9.60	2.98	242
2	10.00	2.65	256
3	8.90	2.20	166
4	5.30	1.70	143
5	8.40	3.48	239
6	11.00	2.70	342
7	10.10	1.20	112
8	8.80	2.70	189
9	8.50	1.90	147
10	12.40	2.90	343
11	7.20	2.30	117
12	7.20	2.75	158
13	8.80	3.10	231
14	6.10	2.52	99
15	9.00	2.88	169
16	11.70	1.80	304
17	10.40	3.50	198
18	7.30	2.70	123
19	9.60	3.00	97
20	9.20	7.20	260
21	9.20	6.97	260
22	6.60	6.29	98
23	5.60	6.97	131
24	6.70	4.71	96
25	6.50	6.29	127
26	6.90	6.47	133
27	11.70	6.02	91
28	6.90	8.52	131

29	8.40	6.94	171
30	8.80	3.99	234
31	9.20	13.90	150
32	7.70	4.66	163
33	10.20	12.46	187
34	6.40	6.40	93
35	7.50	12.69	140
36	10.90	4.09	228
37	7.60	4.08	137
38	9.50	1.42	187
39	8.90	11.24	107

IGT

	Hb glic.	FRUT.	GLICOSE
1	6.10	3.40	112
2	4.80	2.68	107
3	6.0	2.8	119
4	7.7	7.2	
5	6.3	3.8	109
6	7.4	4.0	116
7	6.4	3.2	116
8	6.8	3.1	115
9	5.4	2.9	123
10	6.1	2.3	118
11	5.8	2.7	93
12	7.4	5.6	100
13	6.8	2.9	
14	7.3	2.7	92
15	7.8	2.9	101

Controle 1

	GLICOSE
1	77
2	82
3	67
4	86
5	90
6	85
7	95
8	78
9	85

Controle 2

	Hb glic.	FRUT.	GLICOSE
1	6.3	2.18	105
2	6.5	2.43	86
3	6	2.48	88
4	5.8	3.41	94
5	5.4	3.16	87
6	7.5	2.61	88
7	6.2	2.73	86
8	5.5	3.04	102

9	7.9	0.52	95
10	5.2	2.09	100
11	5.1	2.19	97

Legenda: DM I (Diabetes Mellitus tipo I), DM II (Diabetes Mellitus tipo II), IGT (Individuos intolerantes 'a glicose)

Medicamentos, que alguns dos pacientes estavam sendo medicados durante o estudo:

DM I :

- Insulina

DM II :

- Insulina
- anti-hipoglicemiante: cloridrato de metformina, glibenclamida, metformina
- antilip^emico: bezafibrato, ciprofibrato, fenofibrato, fluvastatina, lovastatina, sinvastatina
- anti-hipertensivo: atenolol, besilato de anlodipina, captropil, clordrato de hidralazina, clortalidona, espironolactona, HCTZ, maleato de enalapril, metildopa, nifedipina.
- Diurético: furosema
- Ácido acetilsalicílico

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 134/2003

São Paulo, 25 de novembro de 2003.

Ilmo(a) Sr(a).
Kátia Kioko Yuhasi

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 24 de novembro passado, **APROVOU** o projeto "Mecanismo de formação da LDL eletronegativa (LDL-): Efeito da Glicoxidação e da Lipólise" (Protocolo nº 206) apresentado por Vossa Senhoria, devendo apenas ser excluído o item IV. 4. do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profª. Drª. Valentina Porta

Vice-Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

Orientador: Prof. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
FBC

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE SAÚDE DA REGIÃO
METROPOLITANA DA GRANDE SÃO PAULO
INSTITUTO "DANTE PAZZANESE" DE CARDIOLOGIA

Av. Dante Pazzanese, 500 (Ibirapuera) - Cx. Postal, 215 - São Paulo
Telefone: 5085-4000

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Data da Aprovação: **04 de Dezembro de 2001**

Título do Protocolo: **"DETERMINAÇÃO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE ELETRONEGATIVA (LDL-) E ANTICORPOS ANTI-LDL- EM PACIENTES INTOLERANTES À GLICOSE E DIABÉTICOS"**

Nomes dos Investigadores: Dr. Marcelo Chiara Bertolami e Dr. André Arpad Falud

Aprovação do Comitê de Ética de Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia avaliou o Protocolo de Estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Paciente, em **04 / dezembro / 2001** e o aprovou.

Membros do Comitê de Ética em Pesquisa

	<i>Cargo</i>
Dr. Pedro Silvio Farsky	Presidente
Enfermeira Fernanda Anajas Caldas Farias	Secretária
Enfermeira Célia Hiromi Shiotsu	Membro Efetivo
Dra. Claudia Gravina Taddei	Membro Efetivo
Dra. Clarisse Ogawa Índio do Brasil	Membro Efetivo
Dr. João Manoel Rossi Neto	Membro Efetivo
Engenheiro Eddie Luís Alonso Júnior	Membro Efetivo
Sr. Peterney Neves da Silva	Membro Efetivo

Dr. Pedro Silvio Farsky
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
CRM: 55.073

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
APROVADO PELA CONEP/MS EM 30/04/97-REF: CONEP/CARTA 32 EXC
Rua Dr. Cândido Mota Júnior, 1 - Santa Cecília CEP 01277-900 São Paulo - SP
FAX (11) 3274-0122 Home: 3202 - Fax: 3202 - E-mail: et@ismc.org.br

São Paulo, 23 de outubro de 2002.

Projeto nº 195/02
Informe este número para identificação
do projeto no CEP

Ilmo.(a). Sr (a)
Dr.(a) Osmar Morre
Departamento de Medicina

O Comitê de Ética em Pesquisa do ISCMSP, reunido no dia 16/10/2002 e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa: "Determinação da lipoproteína de baixa densidade eletronegativa (LDL-) e anticorpos anti-LDL- em pacientes diabéticos", emitiu parecer enquadrando-o na seguinte categoria:

- ☒ Aprovado inclusive o TCLE.
- ☐ Com pendência modificações ou informação relevante a serem atendidas em 60 dias.
- ☐ Retirado, por não ser reapresentado no prazo determinado.
- ☐ Não aprovado: e
- ☐ Aprovado inclusive o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa- MS-CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.

Prof. Dr. Daniel R. Muffoz
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa-
ISCMSP