

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

Oxidação da LDL *in vitro* e *in vivo*, concentração de antioxidantes plasmáticos e de apolipoproteína H (β_2 Glicoproteína I) em idosos hipercolesterolêmicos

André Fonseca Alves

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes

São Paulo
2002

André Fonseca Alves

Oxidação da LDL *in vivo* e *in vitro*, concentração de antioxidantes plasmáticos e de apolipoproteína H (β_2 -Glicoproteína I) em idosos hipercolesterolêmicos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de mestre

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
orientadora/presidente

Profa. Dra. Adelaide José Vaz
1º. examinador

Prof. Dr. Francisco Antônio Helfenstein Fonseca
2º. examinador

São Paulo, 9 de abril de 2002.

A ciência prospera com seus erros, eliminando-os um a um. Conclusões falsas são tiradas todo o tempo, mas elas constituem tentativas. As hipóteses são formuladas de modo a poderem ser refutadas. Uma seqüência de hipóteses alternativas é confrontada com os experimentos e a observação. A ciência tateia e cambaleia em busca de melhor compreensão. Alguns sentimentos de propriedade individual são certamente ofendidos quando uma hipótese científica não é aprovada, mas essas refutações são reconhecidas como centrais para o empreendimento científico.

CARL SAGAN

Dedico essa tese a meus pais e minha irmã, exemplos de vida e dedicação ao trabalho, e em especial a minha esposa Roseliane pelo apoio, amor e compreensão oferecidos em todos os momentos.

Agradecimentos:

À minha orientadora Prof^a Dr^a Lígia Ferreira Gomes e à Prof^a Dr^a Virgínia B. C. Junqueira pela intensa dedicação e envolvimento que tiveram em todas as etapas desse trabalho.

Aos funcionários do laboratório Vitae, especialmente ao casal Luciano e Tânia Rodrigues e à equipe de geriatria da Escola Paulista de Medicina em especial ao Dr Luiz Roberto Ramos, Leandro e Karin Giavarotti e à Dr^a Maisa Seabra.

Aos amigos Paula Regina Knox, Adriana Miranda, Mário Balanco, ao Prof Dr Marcelo Barcinski e a Moema Santos pela cuidadosa revisão.

Ao apoio da FAPESP.

Sumário

Introdução	1
I Patogênese da Aterosclerose	1
II A oxidação da LDL <i>in vitro</i>	6
III Partículas de LDL minimamente modificadas <i>in vitro</i> e seus efeitos biológicos	8
IV Partículas de LDL minimamente modificadas circulantes (LDL ⁻ ou LDL <i>minus</i>)	10
V β_2 GPI e Aterosclerose	12
Objetivos	18
Material e métodos	19
I Casuística	19
II Determinação de antioxidantes lipossolúveis	21
III Determinação de antioxidantes hidrossolúveis	22
IV Separação da LDL do plasma	22
V Avaliação da oxidabilidade da partícula de LDL	23
VI Separação de LDL <i>minus</i> HPLC	24
VII Determinação da concentração de proteínas	24
VIII Purificação de β_2 -GPI por cromatografia de afinidade	24
IX Ensaio imunoenzimático (ELISA) para β_2 GPI	25
X Análise estatística	26
Resultados	28
I Teste ELISA para β_2 GPI	28
II Caracterização do grupo experimental	32
III Estudos de correlação na população hipercolesterolêmica	37
Discussão	40
Conclusões	53
Referências bibliográficas	54

Abreviaturas

β_2 GPI	β -2 glicoproteína 1
$\alpha_4\beta_1$	$\alpha_4\beta_1$ - integrina
β -C	β -caroteno
α -TC	α -tocoferol (vitaminaE)
γ -TC	γ -tocoferol
9-HODE	ácido 9-hidroxi-10,12-octadecanóico
a β_2 GPI	anticorpo anti- β -2 glicoproteína 1
aCL	anticorpo anti-cardiolipina
ADP	5-difosfato de adenosina
AGPI	ácidos graxos poliinsaturados
aLDLox	anticorpos anti-LDLox
aPL	anticorpos antifosfolídeos
Apo cII	apolipoproteína cII
Apo-B100	apolipoproteína B-100
Apo-E	apolipoproteína E
APS	síndrome do anticorpo antifosfolípido
C5a	fator 5a do sistema complemento
CD-36	receptor scavenger A
CL	cardiolipina
Col-ox	colesterol oxidado
CS-1	região CS-1 da fibronectina
CuSO ₄	sulfato de cobre
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
ELAM-1	molécula de adesão leucocitária 1
Fase Lag	fase de retardamento
fator XII	fator XII da via intrínseca da cascata de coagulação
fator XIIa	fator XII ativado
Fc	fração Fc de anticorpos
FT	fator tecidual
HDL	lipoproteína de alta densidade
HDLox	HDL oxidada
ICAM-1	molécula de adesão intercelular
LCAT	lecitina colesterol acil-transferase
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDL _{minus}	LDL minimamente oxidada
LDLox	LDL oxidada
LFC	lisofosfatidilcolina
LIC	licopeno
LPL	lipase lipoproteica
MCP-1	proteína quimiotática de monócitos 1
M-CSF	fator estimulador de colônias para monócitos
MDA	malondialdeído
PAF	fator estimulador de plaquetas
PAF-AH	PAF-acetil hidrolase
PAPC	1-palmitoil

PAPCox	PAPC oxidado
PBS	tampão fosfato
PGPC	1-palmitoil-2-glutaril-sn-glicero-3-fosfocolina
POVPC	1-palmitoil-2-(5-oxovaleril)-sn-glicero-3-fosfocolina
Q-10	ubiquinol-10 (coenzima Q-10)
Qm	quilomícrons
RS	receptor Scavenger
SLE	lúpus eritematoso sistêmico
SRAB	substâncias reativas do ácido barbitúrico
SR-B1	receptor scavenger SR-B1
TG	triglicerídeos
VCAM-1	molécula de adesão da célula vascular 1
VLA-4	antígeno de ativação vascular 4
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade
VLDLox	VLDL oxidada
VMAP 1	proteína vascular associada à adesão de monócitos 1

Oxidação da LDL *in vitro* e *in vivo*, concentração de antioxidantes plasmáticos e de apolipoproteína H (β_2 Glicoproteína I) em idosos hipercolesterolêmicos.

Resumo

A idade avançada e a dislipidemia são dois dos fatores de risco clássicos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e se associam à fisiopatologia da aterosclerose. A oxidação da LDL, *in vivo*, é parte do mecanismo de iniciação e progressão das placas ateromatosas. A LDL oxidada, encontrada no espaço sub-endotelial, interfere com a função de células endoteliais e macrófagos. Formas minimamente oxidadas da LDL, ou LDL_{minus}, são circulantes. Discute-se a importância das vitaminas como substâncias protetoras *in vivo*, embora a susceptibilidade da partícula à oxidação *in vitro* dependa de seu conteúdo em antioxidantes lipossolúveis. A apolipoproteína H ou β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI) é uma apolipoproteína capaz de ligar-se a lipoproteínas oxidadas *in vitro*, especialmente a LDL e pode desempenhar um papel protetor, *in vivo*. A oxidação da LDL avaliada pela sua susceptibilidade à oxidação *in vitro* e pela concentração plasmática de LDL_{minus} *in vivo*, a concentração plasmática de vitaminas antioxidantes e de β_2 GPI foram avaliadas em cem indivíduos idosos hipercolesterolêmicos (concentrações LDL > 130mg/dL) clinicamente normais. Estes indivíduos foram orientados a manter a dieta preconizada pela American Heart Association e atividade física regular. Mediram-se as concentrações de colesterol total e frações e separou-se a fração de LDL por ultracentrifugação, para determinação da sua susceptibilidade à oxidação e da concentração plasmática de LDL_{minus}. A duração da fase lag em ensaios de oxidabilidade foi de (68 ± 23) min e a velocidade de oxidação, (0,03 ± 0,01) Abs/min. A concentração plasmática de LDL_{minus} foi de (8 ± 6) mg/dL, correspondente (5 ± 3)% da LDL nativa. Após separação por HPLC, foram obtidas as concentrações plasmáticas de ácido ascórbico (57 ± 23) μ M, β -caroteno (0,4 ± 0,3)nmol/mg colesterol na LDL, licopeno (0,4 ± 0,2) nmol/mg colesterol na LDL, α -tocoferol (11 ± 4) nmol/mg colesterol na LDL, γ -tocoferol (1,8 ± 0,9)nmol/mg colesterol na LDL, ubiquinol-10 (0,09 ± 0,07)nmol/mg colesterol na LDL. Foi padronizado um ensaio imunoenzimático de competição para a β_2 GPI plasmática, obtendo-se (397 ± 168) μ g/mL. As concentrações de LDL_{minus} correlacionaram-se inversamente com as de α -tocoferol (p=0,003) e ubiquinol-10 (p=0,046) plasmáticos e as de ubiquinol-10 correlacionaram-se diretamente com a fase lag da oxidabilidade (p=0,037). Os resultados sustentam a hipótese de que α -tocoferol e ubiquinol-10 protegem a LDL da oxidação. Concentrações plasmáticas elevadas β_2 GPI em idosos hipercolesterolêmicos sugerem o envolvimento dessa glicoproteína no metabolismo de lipoproteínas.

Palavras Chave: aterosclerose, envelhecimento, hipercolesterolemia, antioxidantes,

LDL_{minus}, β_2 glicoproteína I. e-mail – alfaalves@uoi.com.br

lfgomes@plugnet.com.br

In vitro and in vivo LDL oxidation and plasmatic concentration of antioxidants and apolipoprotein H (β_2 Glycoprotein I) in hypercholesterolemic elderly subjects

Abstract

Advanced age and dislipidemic disorders are two of the main risk factors in the development of cardiovascular disease, as they are associated to the physiopathology of atherosclerosis. *In vivo* LDL oxidation is involved both in the initiation mechanism and the progression of atheroma plaques. Oxidized LDL, found in the subendothelial space, interferes in endothelial cell and macrophage function. A minimally oxidized form of LDL, called LDL_{minus}, is also found in the blood stream. The importance of antioxidant vitamins in the *in vivo* protection of the particle is currently a matter of discussion; indeed, its susceptibility to *in vitro* oxidation depends on its liposoluble antioxidant content. Apolipoprotein H, also known as β_2 -glycoprotein I (β_2 GPI), is a molecule capable of binding to *in vitro* oxidized lipoproteins, particularly to oxidized LDL, and may play a protective role *in vivo*. LDL oxidation - evaluated by its susceptibility to *in vitro* oxidation and the *in vivo* plasmatic concentration of LDL_{minus} -, as well as plasmatic concentration of antioxidant vitamins and of β_2 GPI, were assessed in one hundred elderly hypercholesterolemic (LDL concentration > 130mg/dL) subjects, otherwise clinically normal. These subjects received nutritional orientation to follow the diet recommended by the American Heart Association, as well as to perform regular physical activities. Total cholesterol and its fractions were measured and the LDL fraction was subsequently separated by ultracentrifugation in order to determine its susceptibility to oxidation and the concentration of LDL_{minus} in the fraction. The extension of the lag phase during oxidability assays was found to be of 68 ± 23 min, with an oxidation rate of $0,03 \pm 0,01$ Abs/min. Plasmatic concentration of LDL_{minus} was 8 ± 6 mg/dL, corresponding to $5 \pm 3\%$ of the native LDL. Following HPLC separation, plasmatic concentration of ascorbic acid (57 ± 23 μ M), β -carotene ($0,4 \pm 0,3$ nmol/mg LDL cholesterol), lycopene ($0,4 \pm 0,2$ nmol/mg LDL cholesterol), α -tocopherol (11 ± 4 nmol/mg LDL cholesterol), γ -tocopherol ($1,8 \pm 0,9$ nmol/mg LDL cholesterol), and ubiquinol-10 ($0,09 \pm 0,07$ nmol/mg LDL cholesterol) were determined. A competition immune enzymatic assay was standardized to measure β_2 GPI plasmatic concentration, which was found to be 397 ± 168 μ g/mL. LDL_{minus} concentration inversely correlates to both α -tocopherol ($p=0,003$) and ubiquinol-10 ($p=0,046$) plasmatic contents. Also, ubiquinol-10 directly correlates to the lag phase of the oxidability assay ($p=0,037$). These results support the contention that α -tocopherol and ubiquinol-10 protect LDL from oxidation. Moreover, the increased plasmatic concentrations of β_2 GPI found in the hypercholesterolemic elderly subjects suggest the involvement of this glycoprotein in the metabolism of lipoproteins. **Keywords:** atherosclerosis, ageing, hypercholesterolemia, antioxidants, LDL_{minus}, β_2 glycoprotein I

Introdução

I - Patogênese da Aterosclerose

A aterosclerose, um componente fisiopatológico de doenças cardiovasculares, é um processo que ocorre nas médias e grandes artérias. Em estágios avançados, acomete as três camadas da parede arterial. Uma vez desencadeado o processo, ele proporciona um ambiente favorável para o aparecimento de um espectro de desordens clínicas, entre elas a angina pectoris, o infarto do miocárdio, a morte súbita cardíaca, o ataque isquêmico cerebral transitório, o acidente vascular cerebral, a doença arterial oclusiva das extremidades e alguns aneurismas aórticos (Schwartz & Valente 1994).

O estudo da aterosclerose em indivíduos idosos é importante pelo impacto destas enfermidades na morbidade e mortalidade nesta faixa etária (Schwartz & Valente 1994).

O caráter progressivo da aterosclerose torna o idoso mais sujeito ao desenvolvimento da doença. Lesões iniciais, denominadas de estrias gordurosas, são comumente encontradas em crianças e adolescentes. Lesões mais complexas, as placas fibrosas, manifestam-se geralmente, em idades mais avançadas (Schwartz & Valente 1994).

A aterogênese resulta da interação de uma cascata de eventos que culminam com dano endotelial e alteração das propriedades fisiológicas do endotélio vascular.

Entre os agravantes do processo estão estímulos inflamatórios, componentes do ambiente hemodinâmico local, susceptibilidade genética e reações de reparo da parede arterial. Uma característica dominante é o espessamento da túnica íntima das artérias (Schwartz & Valente 1994).

As placas ateromatosas são formadas quando lipídios e ésteres de colesterol, transportados principalmente pela lipoproteína de baixa densidade (LDL), atravessam a barreira formada pelas células endoteliais e acumulam-se na parede arterial. Esses lipídios interferem na biologia das células musculares lisas, células endoteliais e macrófagos presentes nesse local. A túnica média torna-se, freqüentemente, mais afinada devido a uma

perda de massa de células musculares lisas, que migram para a íntima. Na túnica adventícia ocorre infiltração de linfócitos, fibrose e aumento da vascularização (Libby & Bhattacharyya 1998).

As placas ocorrem freqüentemente próximas a desvios de fluxo, em locais de ramificação e em áreas de curvatura arterial. Essa distribuição preferencial das lesões reflete a importância do ambiente hemodinâmico na iniciação e progressão da placa. Por este motivo, também, considera-se que a geometria arterial é um fator de risco para o desenvolvimento de doença arterial coronariana.(Schwartz & Valente 1994).

Nas áreas propensas à lesão, as forças de arraste e o estresse causado pelo fluxo laminar são relativamente baixos e estão associados a domínios de reversão do fluxo sangüíneo. Aí o tempo de permanência de células (principalmente monócitos sangüíneos e plaquetas) e de partículas como a LDL sobre as células endoteliais é prolongado. Isto facilita processos dependentes de tempo, tais como o acoplamento celular e o transporte vesicular (*transcitose*) de lipoproteínas pelas células endoteliais (Schwartz & Valente 1994). Nessas áreas, as células endoteliais exibem um arranjo peculiar e um glicocálix menos espesso, observáveis antes do desenvolvimento da lesão (Schwartz & Sprague 1992).

O influxo de lipoproteínas e sua acumulação na camada íntima das artérias são determinados por vários fatores: (i) níveis circulantes aumentados de lipoproteínas, especialmente LDL, (ii) tamanho da partícula de LDL (*fenótipo B* de LDL pequena e densa), (iii) distribuição dos ésteres de colesterol entre as populações de lipoproteínas, (iv) presença de disfunção endotelial com aumento da permeabilidade vascular, e (v) estado de oxidação da partícula de LDL (Schwartz & Valente 1994, Libby & Bhattacharyya 1998, Nerem & Sprague 1993).

A disfunção endotelial, potencializada pela aquisição de fatores de risco como a hipertensão arterial, diabetes e dislipidemia é caracterizada por um aumento da permeabilidade vascular, redução da atividade antitrombótica do endotélio e promoção de vasoconstrição por secreção diminuída de prostaciclina e NO^{*} e por um aumento da produção de

substâncias mitogênicas como o PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) pelas células endoteliais, um estímulo à migração de células musculares lisas (Libby & Bhattacharyya 1998).

A LDL nativa é uma partícula heterogênea, constituída por diversos componentes lipídicos e pela apolipoproteína B-100 (apoB-100). Esses componentes são modificados durante a oxidação da LDL (Esterbauer et al 1990).

Na camada íntima, a oxidação da LDL leva à formação da LDL oxidada (LDLox), uma partícula aterogênica e citotóxica, capaz de promover a ativação endotelial pró-coagulante e induzir o recrutamento de leucócitos (Schwartz & Valente 1994).

Haberland et al constataram a presença de LDLox, por imunohistoquímica, em aortas de coelhos Watanabe com hipercolesteremia hereditária. Para isto, utilizaram anticorpos específicos para derivados de produtos de peroxidação lipídica, obtidos a partir de reações *in vitro* de lisina com malondialdeído ou 4-hidroxinonenal (Haberland et al 1988).

Partículas de LDL extraídas de lesões de aortas e artérias ilíacas de doadores humanos e de aortas de coelhos Watanabe com hiperlipidemia hereditária mostraram as mesmas propriedades físicas e químicas da LDL oxidada *in vitro*, entre elas aumentos na mobilidade eletroforética, na densidade, no conteúdo de colesterol livre e no conteúdo de esfingomiéline e lisofosfatidilcolina na fração fosfolipídica (Yla-Herttuala et al 1989). Além disso, partículas extraídas de lesões possuem propriedades biológicas compartilhadas com a LDLox produzida *in vitro*, como o estímulo à esterificação do colesterol e à degradação por macrófagos e efeito quimiotático para monócitos (Yla-Herttuala et al 1989).

A oxidação da LDL nativa *in vivo* é determinada em função de um balanço entre a geração de oxidantes e uma efetiva disponibilidade de vários sistemas antioxidantes, alguns deles presentes na própria partícula de LDL. Macrófagos derivados de monócitos circulantes, células endoteliais e células musculares lisas são fontes celulares de substâncias oxidantes no espaço da camada íntima, especialmente espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

(Esterbauer et al 1992). O estado de oxidação da partícula de LDL, circulante ou aprisionada na camada subendotelial, é importante em estágios iniciais da aterogênese (Schwartz & Valente 1994, Esterbauer et al 1992, Esterbauer & Ramos 1995).

O mecanismo de oxidação da LDL no compartimento circulante não é completamente conhecido, mas existe uma subfração da LDL nativa encontrada na circulação chamada de LDL_{minus}, ou LDL⁻, com características semelhantes a formas de LDL minimamente modificadas por agentes diversos que causam oxidação branda *in vitro* e que são genericamente denominadas de LDL-MM (Berliner et al 1990). Alguns dos efeitos da LDL-MM, estudados *in vitro*, mimetizam os efeitos da LDLox aprisionada no endotélio. Entre as propriedades compartilhadas pela LDLox e a LDL-MM está a capacidade de induzir a interação entre células endoteliais e monócitos (Berliner et al 1990).

A adesão de monócitos a células endoteliais é induzida por LDLox. A expressão e o tipo de moléculas de adesão presentes na superfície de células endoteliais expostas a partículas de LDLox depende do grau de oxidação de tais partículas (Takei et al 2001).

A LDLox, além de induzir um acúmulo e a mobilização de selectina-P para a membrana celular em células endoteliais, induz a expressão e a liberação de selectina-E (Kim et al 1994). A LDLox é capaz de induzir a expressão da molécula de adesão da célula vascular 1 (VCAM-1), da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), do antígeno de ativação vascular 4 (VLA-4) e da molécula de adesão leucocitária 1 (ELAM 1), além da ativação do fator 5a (C5a) do sistema complemento (Kim et al 1994). Assim, a LDLox estimula a adesão de monócitos e de polimorfonucleares ao endotélio.

Fosfolípidios oxidados presentes na LDL-MM e na LDLox são responsáveis por efeitos pró-inflamatórios. Estas substâncias interagem com receptores específicos (Auge et al 1996, Rajavashisth et al 1995) e estimulam vias de transdução de sinal, modulando a atividade de células endoteliais e monócitos (Liao et al 1993, Liao et al 1994).

A apolipoproteína oxidada, presente na LDLox é importante na formação das células espumosas. A reação dos aldeídos, formados por oxidação dos lipídios da LDL, com os grupos lisina da cadeia da ApoB-100 diminui o reconhecimento da partícula pelos receptores BE, mas permite a sua ligação a receptores scavenger (RS) (Steinbrecher et al 1987).

As mudanças ocorridas na cadeia da ApoB-100 fazem com que macrófagos residentes efetuem uma captação aumentada de lipoproteínas modificadas por oxidação, que não é regulada pelo conteúdo de colesterol intracelular. Esse processo culmina com o acúmulo de colesterol e de ésteres de colesterol nestas células e sua transformação em células espumosas presentes em grande quantidade em lesões ateromatosas (Esterbauer & Ramos 1995).

As células espumosas elaboram vários fatores que contribuem para o recrutamento de células musculares lisas. Por exemplo elas liberam PDGF que estimula a migração de células musculares lisas para a camada íntima e sua subsequente replicação neste local. Células espumosas também liberam citocinas e fatores de crescimento como TNF- α , IL-1, fator de crescimento de fibroblastos e TGF- β , que estimulam a proliferação de células musculares lisas e a síntese de proteínas da matriz extracelular. O crescimento de células musculares lisas a partir da camada média, invadindo a camada íntima e o desenvolvimento de uma cápsula fibrosa de matriz extracelular caracteriza a placa fibrosa e é relevante para o aparecimento de sintomas clínicos de doenças cardiovasculares (Libby & Bhattacharyya 1998).

Assim, considera-se a aterosclerose como uma inflamação crônica da parede arterial, desenvolvida em resposta a diversos fatores que levam à disfunção endotelial, acumulação de lipídeos na camada íntima, recrutamento de leucócitos circulantes, proliferação de células musculares lisas na camada íntima e deposição de matriz extracelular.

II - A oxidação da LDL *in vitro*

A oxidação completa da LDL *in vitro*, induzida por cobre ou por um sistema gerador de espécies reativas de oxigênio produz a LDLox. Esse processo pode ser dividido em 3 etapas: a fase "lag" (ou fase de retardo) na qual os antioxidantes lipossolúveis são perdidos (vitamina E, β -caroteno, ubiquinol-10) a fase de propagação, na qual formam-se hidroperóxidos e o colesterol é oxidado e a fase de decomposição, durante a qual os lipídios oxidados sofrem fragmentação, e reagem com a apoB-100 (Esterbauer et al 1992).

A LDL_{minus}, separada de amostras de LDL, e preparações de LDL-MM possuem características químicas peculiares, pelas quais podem ser distinguidas de outras formas oxidadas de LDL e que respondem pelas suas propriedades biológicas.

A LDL-MM, por exemplo, é a denominação genérica para as partículas de LDL que sofreram depleção de antioxidantes, oxidação parcial de seus ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) - principalmente ácido araquidônico - e pouca ou nenhuma modificação protéica. Essa partícula pode ser produzida por armazenamento prolongado a 4° C (Berliner et al 1990) por oxidação com lipoxigenase (Sparrow et al 1988), ferro ou cobre (Kosugi 1987) e por incubação com células da parede arterial (Esterbauer et al 1990). Diferentes preparações de LDL-MM são heterogêneas quanto aos efeitos biológicos, composição lipídica e conteúdo de antioxidantes.

Quase toda a bioatividade de partículas minimamente modificadas está associada à fração polar dos lipídios, que contém fosfolipídios modificados por oxidação (Berliner et al 1990).

Fosfolipídios que contêm ácido araquidônico são os mais propensos à oxidação. Verificou-se que 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina (PAPC), pode ser oxidado facilmente *in vitro*, dando origem a moléculas multioxigenadas (4 ou 5 átomos de oxigênio) como o PAPCox. O PAPCox pode ser usado como um substituto para a LDL-MM em experimentos de adesão de leucócitos, pois é capaz de mimetizar os efeitos da LDL-MM (Watson et al 1995a).

Os principais fosfolípidios oxidados, biologicamente ativos, derivados do PAPC, são: o 1-palmitoil-2-(5-oxovaleril)-sn-glicero-3-fosfocolina (POVPC) e o 1-palmitoil-2-glutaril-sn-glicero-3-fosfocolina (PGPC) (Watson et al 1997).

Esses fosfolípidios oxidados com atividade biológica estão presentes em lesões aterogênicas de coelhos alimentados com dietas ricas em colesterol. Quando a dieta é suplementada com antioxidantes, como a vitamina E e probucol a quantidade dessas moléculas é reduzida (Watson et al 1997).

Também na LDLox as cadeias de ácidos graxos polinsaturados são o principal alvo das modificações oxidativas. Enquanto na LDL nativa os ácidos graxos polinsaturados estão ainda intactos, e em partículas minimamente modificadas encontram-se parcialmente oxidados a aldeídos e hidroperóxidos, na LDLox a oxidação dos fosfolípidos dos ácidos graxos polinsaturados é extensiva (Watson et al 1995a). Além da oxidação do ácido araquidônico, na LDLox encontram-se produtos de oxidação do ácido linoleico, como o ácido 9-hidroxi-10,12-octadecanóico (9-HODE) e o aldeído 2,4-decadienal. Fosfolípidios podem também sofrer hidrólise na posição sn-2, o que leva à formação de lisofosfatidilcolina (LFC) (Watson et al 1995a). Todos esses produtos, possivelmente, contribuem para o recrutamento de monócitos e a citotoxicidade de formas oxidadas de LDL.

Uma característica comum às partículas minimamente modificadas de LDL (presentes *in vivo* como a LDL_{minus} ou produzidas *in vitro* como a LDL-MM) é a capacidade de ainda serem reconhecidas e captadas pelo receptor normal de LDL – receptor BE – presente em células endoteliais e no fígado (Berliner et al 1990). A LDL_{minus} pode ser recolhida da circulação (depuração exercida pelo fígado) acompanhando a mesma via da LDL nativa.

III - Partículas de LDL minimamente modificadas *in vitro* e seus efeitos biológicos

A LDL humana, oxidada, branda ou extensivamente, tem sua composição química alterada. Produtos das reações de oxidação, que podem ser diferentes de acordo com a substância oxidante, são responsáveis pelos efeitos obtidos em ensaios que utilizam monócitos, macrófagos e células endoteliais.

LDL-MM obtida por estoque prolongado a 4°C por 3 meses foi utilizada em ensaios realizados por Berliner et al 1990. Uma comparação desta partícula com a LDL nativa mostrou que ela possuía o dobro do conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAB) por miligrama de colesterol de LDL (2 a 5 nmols) e 4 vezes mais epóxidos de colesterol. Células endoteliais, na presença de LDL-MM, produzem mais fator quimiotático para monócitos, levando ao aumento da captação da partícula modificada por macrófagos derivados de monócitos migrados (Berliner et al 1990).

LDL-MM aumenta a atividade quimiotática para monócitos também em células musculares lisas. Constatou-se que esse aumento da atividade quimiotática para monócitos, na presença de LDL-MM, estava correlacionado com a expressão de RNAm para proteína quimiotática para monócitos 1 (MCP-1) (Cushing et al 1990).

Partículas de LDL obtidas de voluntários humanos, oxidadas com ferro 9µM por 72 horas, ou oxidadas por estoque a 4°C de 6 a 11 meses e contendo de 2 a 3,7nmol de SRAB/mg colesterol de LDL, foram injetadas em camundongos BALBc para avaliar a atividade de LDL-MM *in vivo*. Nesses animais foi constatado um aumento na concentração plasmática de fator de crescimento de colônias para macrófagos (M-CSF). Além disso, após a injeção com LDL-MM ocorreu um aumento da produção e aumento da expressão de RNAm de uma proteína homóloga à MCP-1 (chamada de JE) em vários tecidos (Liao et al 1991).

A LDL-MM obtida por estoque prolongado de LDL humana nativa, ou por oxidação com fosfolipase A2, também induz a produção de MCP-1 por células endoteliais aórticas humanas *in vitro* (Navab et al 1991).

Entre as selectinas, que permitem as interações fracas entre o endotélio e os leucócitos (Navab et al 1991, Spriger et al 1994, Laski et al 1992) observadas durante o processo de "rolagem", Vora et al constataram que a LDL-MM promove um acúmulo intracelular de P-selectina no endotélio, mas um estímulo adicional é necessário para sua mobilização para a superfície celular (Vora et al 1997).

Partículas de LDL-MM, estimulam a adesão seletiva de monócitos através da indução específica da expressão da proteína vascular associada à adesão de monócitos (VMAP-1) (McEvoy et al 1997). A adesão de monócitos estimulada por LDL-MM é mediada pela $\alpha_4\beta_1$ integrina do monócito, que se liga a região CS-1 da fibronectina no endotélio (Teng et al 1996).

Partículas de LDL-MM obtidas por estoque de LDL humana a 4°C por 3 a 6 meses ou por uma breve exposição a 1 μ M de Ferro foram capazes de induzir a expressão de RNAm para fator tecidual em células endoteliais de uma maneira dose dependente (Drake et al 1991).

Yoshida et al constataram que a LDL-MM também contribui com a formação das células espumosas, por agir diretamente sobre os macrófagos presentes na parede arterial. Partículas oxidadas brandamente são capazes de induzir a expressão do receptor para a internalização de LDLox, denominado "*receptor scavenger A*" (CD36) e macrosialina em macrófagos peritoniais de camundongo (Yoshida et al 1998). A LDL-MM é portanto, capaz de induzir a expressão de RS podendo assim preparar macrófagos para iniciar sua transformação em células espumosas.

As interações entre monócitos e células endoteliais, verificadas na presença de partículas de LDL brandamente oxidadas podem ser bloqueadas, *in vitro*, pela HDL através de uma enzima associada a ApoA-1, a paraoxonase (Watson et al 1995a).

Tratamento de LDL-MM, obtida por oxidação de LDL nativa com lipoxigenase de soja, ferro ou células da parede arterial, com paraoxonase inibiu a sua habilidade em induzir interações entre monócitos e células endoteliais em ensaios de transmigração (Watson et al 1995a). A hipótese de que paraoxonase associada à HDL, pode interagir com fosfolipídeos biologicamente ativos presentes na LDL-MM (como moléculas multioxygenadas encontradas no PAPCox ativo) limitando seus efeitos não pode ser descartada (Stafforini et al 1996, Watson et al 1995b).

Lipídios da LDL-MM, obtida por oxidação com hidrocloreto de 2,2-azobis-2-amidinopropano, afetam a função da HDL, inibindo a atividade da lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) (Bielicki et al 1996). Assim a LDL-MM também é capaz de influenciar o metabolismo de lipoproteínas limitando os efeitos benéficos da HDL na via anti-aterogênica de transporte reverso de colesterol.

IV - Partículas de LDL minimamente modificadas circulantes (LDL⁻ ou LDL^{minus})

As vias que levam a oxidação da LDL na circulação não são completamente conhecidas. Frações de LDL minimamente modificadas existem na circulação, e sua concentração pode ser estimada, via de regra, utilizando-se ensaios com HPLC.

Usando cromatografia de troca iônica com uma coluna de Sepharose 6B DEAE, Shimano et al constataram a presença de uma fração “minor” de LDL em indivíduos normolipidêmicos. A fração “minor” assim descrita, corresponde a menos de 1% da fração total de LDL e tem propriedades similares a LDLox, como aumento de carga negativa, maior razão proteína/colesterol e alta densidade de flotação quando comparada com a LDL nativa (Shimano et al 1991).

Recentemente constatou-se que a estrutura secundária da ApoB100 na fração “minor” da LDL tem sua conformação alterada. Parasassi et al

descreveram também uma compactação na monocamada lipídica, provavelmente pela presença de fosfolípidios oxidados, na fração “minor” da LDL. Essa compactação, provavelmente contribui para a baixa afinidade dessa subfração a receptores normais de LDL em fibroblastos (Parasassi et al 2001).

Uma comparação da LDL_{minus} com LDL extensivamente oxidada por cobre mostrou que a primeira apresenta um aumento no conteúdo de produtos e oxidação do colesterol (Sevanian et al 1995). Esses produtos são semelhantes aos encontrados em partículas submetidas à oxidação branda (Hodis et al 1994). Entretanto a quantidade de peróxidos lipídicos (medidos em ensaios de TBARS) na LDL_{minus} é muito menor do que na LDL_{ox}. A citotoxicidade da LDL_{minus}, associada a uma ruptura da membrana de células endoteliais aórticas, estava associada a derivados oxidados de colesterol que compunham a partícula e causavam um aumento sustentado do fluxo de cálcio intracelular nessas células (Hodis et al 1994).

Sevanian et al passaram a postular que uma elevação nos níveis de LDL_{minus} constituem um estado pró-oxidante que facilita reações oxidativas nos componentes vasculares. Além disso, por sua composição química e efeitos citotóxicos semelhantes a partículas de LDL-MM obtidas *in vitro*, que têm um papel no recrutamento específico de monócitos, a LDL_{minus} mediará o processo aterogênico *in vivo* (Sevanian et al 1996). A forte correlação entre aumento nos níveis de LDL e doenças vasculares reforça a hipótese de que partículas de LDL brandamente oxidadas existentes no plasma - LDL_{minus} – presentes como uma subfração da LDL nativa podem agir como elementos desencadeadores ou como agravantes do processo aterogênico.

As quantidades absolutas de LDL_{minus} são relacionadas aos níveis plasmáticos de colesterol na LDL, indicando que as concentrações de LDL_{minus} podem ser muito maiores em indivíduos hiperlipidêmicos do que em indivíduos normolipidêmicos (Sevanian et al 1996, Cazzolato et al 1991)

Indivíduos com aumento de LDL densa tem um risco aumentado de aterosclerose. Sevanian et al determinaram as concentrações de LDL_{minus}

em populações de LDL pequenas e densas densidade ($\delta = 1,055$ a $1,019$) separadas de voluntários humanos com níveis de colesterol total plasmático entre 160 e 210mg/dL usando HPLC. Partículas de LDL pequenas e densas são mais susceptíveis à oxidação. Além disso, a LDL_{minus} foi encontrada em grandes quantidades nas frações densas de LDL, que tinham maiores quantidades de hidroperóxidos do que as partículas mais leves de LDL (Sevanian et al 1996).

Segundo Sevanian et al, a oxidabilidade das partículas de LDL separadas por densidade correlaciona-se com o conteúdo de LDL_{minus}. Mas o aumento na susceptibilidade oxidativa da fração total de LDL só é verificado quando na presença de proporções de LDL_{minus} acima de 2% (Sevanian et al 1996).

Esses dados sustentam a hipótese de que a geração de LDL_{minus} na circulação influencia a susceptibilidade da LDL nativa à oxidação.

V - β_2 GPI e Aterosclerose

A apolipoproteína-H também chamada de β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI) é uma glicoproteína produzida no fígado e no intestino. Embora sua função não seja conhecida, descreve-se sua participação no metabolismo lipídico (Nakaya et al 1980) e na coagulação sanguínea (McNally et al 1996). A β_2 GPI participa ainda da fisiopatologia de algumas doenças auto-imunes em que anticorpos antifosfolípidios estão envolvidos (George et al 1999a, Romero et al 1998).

Recentemente sua interferência na fisiopatologia da aterosclerose e sua correlação com doenças cardiovasculares são objeto de investigação (Limaye et al 1999).

A β_2 GPI foi primeiramente purificada por Schultz et al em 1961. Sua massa molecular estimada com SDS-PAGE esta em torno de 50kDa (Schultz et al 1961). A β_2 GPI humana é composta por 326 aminoácidos. Seqüências de β_2 GPI de outras espécies de mamíferos (bovina,

camundongo e rato) mostram aproximadamente 84% de homologia com a proteína humana. A β_2 GPI possui 5 locais potenciais de N-glicosilação, abundantes resíduos prolina e 11 pontes dissulfeto internas. A β_2 -GPI pertence a uma família de proteínas que possui 4 domínios com uma seqüência de 60 aminoácidos repetidos que permite a formação das pontes dissulfeto. Os domínios repetidos da β_2 GPI são denominados de repetições consensuais curtas ou em inglês “short consensus repeats” (SRC), de onde deriva o nome da família de proteínas a que ela pertence. A mesma família inclui as proteínas do sistema complemento. A β_2 GPI apresenta um quinto domínio, com uma porção C-terminal que foge ao padrão de proteínas da família SRC (Groot et al 2000). O gene para β_2 GPI parece estar localizado no cromossomo 17 humano, diferentemente de outras proteínas da família SRC que estão no cromossomo 1. No domínio V da β_2 GPI existe um sítio de ligação para fosfolípidios negativos (Shoenfeld et al 2000).

Há uma ampla variação interindividual nas concentrações plasmáticas de β_2 GPI. Tais variações estão sobre controle genético, mas suas bases moleculares são desconhecidas (Mehdi et al 1999). O gene para a β_2 GPI é constituído por um 8 exons e 7 introns (Sanguera et al 1997a).

A β_2 GPI ou ApoH, mostra um polimorfismo estrutural com a ocorrência de 3 alelos: ApoH*1, ApoH*2 e ApoH*3. Baseada em sua reatividade com anticorpos monoclonais 3D11, o alelo ApoH*3 pode ser subdividido em ApoH*3^W e ApoH*3^B (Mehdi et al 1999). O alelo ApoH*2 tem sido o mais freqüentemente encontrado e o alelo ApoH*3^W, o mais comum em populações de indivíduos norte americanos brancos, foi correlacionado com os menores níveis plasmáticos dessa proteína (Sanguera et al 1997a).

Hasunuma et al relatam a ligação de β_2 GPI a lipoproteínas plasmáticas oxidadas, principalmente LDL (Hasunuma et al 1997). β_2 GPI parece ligar-se mais fortemente a lipoproteínas oxidadas por cobre (CuSO_4) do que por malondialdeído. Foi demonstrado que β_2 GPI e anticorpos antifosfolípido interagem com LDLox e participam de sua captação por macrófagos (Matsuura et al 1998).

Cerca de 40% da β_2 GPI circulante, está ligada a frações de lipoproteínas, principalmente as mais ricas em triglicérides (TG), como quilomícrons (Qm) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). A β_2 GPI ativa a lipase lipoproteica (LPL). Desta forma auxilia na hidrólise de TG e regula a concentração de lipídios do soro, acelerando o processamento de Qm e VLDL (Limaye et al 1999). A ativação da LPL tem um efeito pró-coagulante, por gerar moléculas que podem ativar a cascata da coagulação. Dados de McNally et al sustentam que a superfície da VLDL, sob ação da LPL, sofre transformações pelo aumento de ácidos graxos poliinsaturados, que podem promover a ativação do fator XII. Entretanto, concentrações de β_2 GPI próximas das fisiológicas ($200\mu\text{g/mL}$) podem inibir diretamente a geração de fator XIIa. Por isso, alguns autores especulam que ela possa regular reações hemostáticas que ocorrem na superfície de lipoproteínas (McNally et al 1996).

A β_2 GPI diminui a captação de LDLox por macrófagos, via “receptor scavenger”, de maneira dose dependente. Também tem sido especulado que a ligação de β_2 GPI a LDLox pode induzir mudanças conformacionais na β_2 GPI, cuja molécula poderia ser reconhecida por anticorpos antifosfolipídios (aPL) (Romero et al 1998 ,Hasunuma et al 1997).

Quando complexada com fosfolipídios negativos, a β_2 -GPI forma neoantígenos, que servem de alvo para autoanticorpos, principalmente para anticorpos anticardiolipina (Romero et al 1998). Cuadrado et al. sugerem que epítomos para aCL, surgem sobre a molécula de β_2 GPI, quando essa interage com membranas lipídicas contendo cardiolipina, fosfatidilserina ou ácido fosfatídico (Cuadrado et al 1998). O domínio IV da molécula de β_2 GPI está envolvido na expressão do epítomo para aCL (Matsuura et al 1998).

Níveis aumentados de anticorpos antifosfolipídios (aPL) estão presentes em algumas condições inflamatórias ligadas a autoimunidade. Os aPL aumentam o risco de doenças oclusivas (venosas e arteriais) e danos endoteliais. A síndrome do anticorpo antifosfolipídio primária é caracterizada por ocorrências vasculares de trombose (Petri et al 1992). A síndrome antifosfolipídio secundária, presente em pacientes com Lúpus Eritematoso

Sistêmico (SLE) também é caracterizada por oclusões vasculares, trombocitopenia e ocorrência de aPL (Wu et al 1999).

Vaarala et al relataram que anticorpos anticardiolipina (aCL) presentes em pacientes com SLE podem reagir cruzadamente com LDL modificada por malondialdeído (Vaarala et al 1996).

Embora muitos grupos não tenham obtido êxito em mostrar uma reação cruzada entre anticorpos anti- β_2 GPI e anti-LDLox em pacientes com síndrome do anticorpo antifosfolípido primária (Tinahones et al 1998), constatou-se que anticorpos anti- β_2 GPI podem ser marcadores para trombose arterial em pacientes com SLE, enquanto IgG anti-LDLox não esta relacionada com trombose arterial (Romero et al 1998).

Vários trabalhos mostram a aquisição de uma aterosclerose precoce, em pacientes com síndrome do anticorpo antifosfolípido primária. Nessa condição, o desenvolvimento de lesões pode estar relacionado a uma resposta imune local, intensificada, contra fosfolípidios nativos ou oxidados (Shoenfeld et al 1998).

Estudos recentes sugerem que alguns anticorpos anti-fosfolípidios em pacientes com esta síndrome são direcionados a neoepítomos de lipídios oxidados, ou a produtos de adição de fosfolípidios oxidados a proteínas. A especificidade desses anticorpos é ainda uma questão em aberto, mas ao menos uma das formas oxidadas de PAPC, o POVPC, proveniente da oxidação da LDL vem sendo implicada como alvo (Watson et al 1995, Parasassi et al 2001).

Estudos de Matsuura et al. mostraram que a LDLox pode ser um alvo, não somente para anticorpos direcionados para fosfolípidios modificados por oxidação, como também para anticorpos anti- β_2 GPI (anti- β_2 GPI), uma vez que a β_2 GPI liga-se a LDLox (Matsuura et al 1998).

Recentemente um ligante específico para β_2 GPI, derivado da LDLox foi isolado e sua estrutura caracterizada. Esta molécula denominada ox-Lig1, é o 7-cetocolesterol-9-carboxinanoato. Lipossomos contendo ox-Lig1 foram captados por macrófagos em um processo dependente da presença de β_2 GPI e de anticorpos anti- β_2 GPI. Autoanticorpos anti- β_2 GPI em pacientes

APS foram detectados por ELISA, utilizando-se a molécula de ox-Lig1 complexada com β_2 GPI em fase sólida (Kobayashi et al 2001).

A imunização de camundongos com β_2 GPI, leva à produção de aCL semelhantes aos humanos. Afek et al. avaliando os efeitos da imunização com β_2 -GPI em camundongos deficientes em apo-E e suplementados com dietas ricas em gordura mostraram que esses animais desenvolvem mais lesões ateromatosas no *sinus* aórtico, quando comparados com camundongos deficientes não imunizados. As lesões nesses camundongos são ricas em células imunocompetentes CD-4 e CD-8 (resposta linfocitária precoce à β_2 GPI), que podem ter um papel no desenvolvimento da placa ateromatosa (Afek et al 1999).

George et al. propuseram que ela participe das reações imunológicas que ocorrem na fase final do processo de aterosclerose, baseados em evidências da presença concomitante de β_2 GPI e linfócitos T CD-4 em placas ateromatosas (George et al 1999a). A β_2 GPI mostrou ser capaz de ativar células endoteliais *in vitro* e é possível que um recrutamento subsequente de células imunocompetentes determine uma aceleração da aterosclerose secundária à imunização. O recrutamento imunomediado promove o encontro de linfócitos CD-4 e CD-8, bem como um acúmulo de macrófagos (George et al 1999b).

Além disso, a β_2 GPI é uma molécula anticoagulante, e sua neutralização por anticorpos específicos pode contribuir para um estado pró-trombótico, associado à aterosclerose (Afek et al 1999). Afek et al justificaram o agravamento da lesão na presença de anti- β_2 GPI pela competição entre LDLox e anti- β_2 GPI por β_2 GPI. A LDLox ligada à β_2 GPI não seria removida via RS. Portanto a presença de anti- β_2 GPI resultaria em aumento da remoção de LDLox via RS pelos macrófagos, favorecendo a formação de células espumosas. Esta não é, entretanto, a única possibilidade de mecanismo para esse efeito. A região de ligação de β_2 GPI a fosfolípidios, localizada no domínio V, também é uma das regiões de ligação para anti- β_2 GPI e, provavelmente a região de ligação para LDLox.

Na verdade, nos modelos experimentais em que se observa que a captação de LDLox por macrófagos é inibida por β_2 GPI, também se observa um aumento dessa captação com a adição simultânea de anti- β_2 GPI e β_2 GPI (Hasunuma et al 1997, Cuadrado et al 1998). Esse aumento na captação é maior do que 211% quando anticorpos específicos para o domínio IV (anticorpo WB-CAL-1) da β_2 GPI estão presentes. Essa linha de evidência sugere que β_2 GPI inibe a captação de LDLox por macrófagos, por sua ligação com LDLox. Um aumento na captação de LDLox na presença de anticorpos específicos para esse domínio juntamente com β_2 GPI pode ser explicado pela presença de receptores para Fc em membranas de macrófagos (Hasunuma et al 1997).

Entretanto, quando são adicionados anticorpos específicos para o domínio V da β_2 GPI (anticorpos cof-18) - domínio de ligação a fosfolipídios e possivelmente o domínio de ligação a lipídios oxidados em lipoproteínas - não há aumento na ligação de LDLox a macrófagos. Provavelmente tais anticorpos têm a propriedade de competir com LDLox pela ligação a β_2 GPI (Hasunuma et al 1997).

Aspectos da estrutura de β_2 GPI e de LDLox relevantes para esse efeito vêm sendo esclarecidos nos últimos anos. A β_2 GPI possui, no seu domínio V, uma região rica em aminoácidos de carga positiva, que é responsável pela ligação a superfícies aniônicas. A LDLox tem carga negativa, atribuída a modificações na sua estrutura protéica, além da presença de lipídios oxidados. O aumento na carga negativa da LDLox é importante para seu reconhecimento por RS, como *CD-36* e *SR-B1* (Hasunuma et al 1997). Portanto, a ligação de β_2 GPI a lipídios oxidados na LDLox poderia interferir com a captação via "receptor scavenger" por efeito de carga.

Embora este ponto ainda não tenha sido abordado na literatura, é possível que a fração *LDLminus* tenha o mesmo comportamento com relação à β_2 GPI, já que também apresenta um aumento de carga negativa. A *LDLminus*, ao contrário da LDLox é uma subfração circulante da partícula de LDL. Assim, nossa hipótese de trabalho é que a variação da concentração

plasmática da LDL_{minus} possa ter correlação com as concentrações plasmáticas de β_2 GPI, que atuaria modulando negativamente o seu efeito aterogênico.

Objetivos

Em indivíduos idosos hipercolesterolêmicos:

- Estudar as concentrações plasmáticas de LDL_{minus}.
- Estudar as correlações entre as concentrações plasmáticas de vitaminas antioxidantes e as concentrações plasmáticas de LDL_{minus}.
- Estudar as correlações entre as concentrações plasmáticas de vitaminas antioxidantes e a susceptibilidade da LDL à oxidação.
- Estudar correlações entre as concentrações plasmáticas de LDL de LDL_{minus} e as concentrações plasmáticas de β_2 GPI.

Material e Métodos

I - Casuística

Foram selecionados para esse estudo, 100 voluntários idosos com idade superior a 65 anos, de ambos os sexos, Os critérios utilizados para inclusão dos indivíduos no grupo de estudo foram a presença de concentrações plasmáticas de LDL colesterol ≥ 130 mg/dL e de triglicerídeos < 400 mg/dL (medidos no sangue coletado após jejum de 12 h). Foram excluídos indivíduos que fizessem uso de hipolipemiantes ou de vitaminas e os portadores de doença cardiovascular instável (como infarto e acidente vascular cerebral) ou demência.

Os 100 idosos selecionados (36 homens e 64 mulheres) responderam a um questionário que avalia estilo de vida (atividade física, tabagismo), fatores de risco cardiovasculares (idade, antecedente pessoal e familiar, antecedentes mórbidos e ascendência familiar) e foram encaminhados para inquérito alimentar executado por nutricionistas. Todos foram orientados a seguir a fase I da dieta preconizada pela *American Heart Association* (Tabela 1) e manter atividade física regular (mais especificamente, a fazer caminhadas de 5Km por dia).

Tabela 1 Dieta preconizada pela *American Heart Association*.

Nutrientes	Fase I
Gordura total	$\leq 30\%$ do total de calorias
Ácidos graxos poliinsaturados	$\leq 10\%$ do total de calorias
Ácidos graxos saturados	8% a 10% do total de calorias
Ácidos graxos monoinsaturados	$\leq 15\%$ do total de calorias
Carboidratos	$\geq 55\%$ do total de calorias
Proteínas	$\approx 15\%$ do total de calorias
Colesterol	< 300 mg por dia

Uma população de 10 idosos normocolesterolêmicos (com níveis séricos de colesterol de LDL menores do que 130mg/dL) da mesma faixa etária, que não fazia uso de medicação e recebendo as mesmas orientações

da população hipercolesterolêmica, foi inserida como um instrumento de calibração da metodologia empregada.

Todos os voluntários foram orientados a não fazer uso de medicação sem orientação e a manter sob controle eventuais doenças de base, principalmente Diabetes Mellitus e Hipertensão Arterial, com o intuito de diminuir a influência dessas doenças sobre os resultados obtidos no estudo. Durante todo o estudo, uma equipe médica assistiu aos idosos selecionados para o grupo amostral e para o grupo de indivíduos normocolesterolêmicos, sendo documentadas as medidas de pressão arterial e da glicemia de jejum de cada um dos idosos.

Durante um período de 11 meses e de acordo com a capacidade de processamento das amostras do laboratório, idosos dos grupos normo e hipercolesterolêmico, foram convidados para uma coleta de sangue, após jejum de 12 horas, para a realização de dosagens séricas de vitaminas, triglicérides, colesterol total e frações, e separação da LDL. A LDL isolada foi analisada quanto à composição de suas subfrações oxidadas e a sua susceptibilidade à oxidação *in vitro*. Para avaliar as concentrações plasmáticas de β_2 GPI nas duas populações, foi padronizado por nosso grupo um teste ELISA. Durante a padronização deste método, amostras de voluntários jovens saudáveis foram usadas como controle da técnica. As amostras dos 10 indivíduos controle (normocolesterolêmicos) foram inseridas ao acaso e processadas juntamente com as amostras de indivíduos hipercolesterolêmicos, sem que o manipulador conhecesse os resultados do perfil lipídico dos voluntários. Para validar a metodologia empregada, indivíduos hipercolesterolêmicos foram pareados segundo idade, sexo, pressão arterial e glicemia com a população normolipidêmica e realizado um estudo comparativo entre os grupos.

Para a análise das correlações entre as concentrações plasmáticas de vitaminas antioxidantes e os níveis de LDL_{minus}, β_2 GPI e dos dados obtidos do ensaio de oxidabilidade da LDL, somente a população hipercolesterolêmica foi utilizada.

II - Determinação de antioxidantes lipossolúveis

Preparo dos padrões: Soluções padrão de α - e γ -tocoferol, licopeno, β -caroteno e ubiquinol-10 foram preparados por dissolução dos componentes puros em clorofórmio e diluídos em etanol para uma concentração final de aproximadamente $1\mu\text{M}$. A concentração correta de cada solução padrão foi determinada usando-se os coeficientes de extinção molar. A solução de ubiquinol-10 foi preparada a partir de uma solução mãe e reduzida, como descrito por Motchnick. Todos os padrões são estáveis por vários meses e foram estocados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Motchnick 1994).

Processamento das amostras: Foram preparados extratos lipídicos conforme uma modificação do método descrito por Burton et al. Plasma foi obtido de sangue recém coletado em tubos com heparina e centrifugado por, 5 minutos, a $1000 \times g$. Uma alíquota de $200\mu\text{L}$ de plasma foi misturada por 30s com $500\mu\text{L}$ de metanol e adicionada a 4mL de hexano. A mistura foi agitada em vórtex por 1 min e centrifugada por 5min a $1000 \times g$. Uma alíquota de 3mL da camada de hexano foi transferida para outro tubo e seca por fluxo de nitrogênio. O resíduo foi dissolvido em 0,5mL de solução metanol/etanol 1/1 (v/v) e filtrado através de uma membrana micropore de $0,22\mu\text{m}$ (Burton 1985).

Redução de extratos alcoólicos: Para determinar a coenzima Q-10, as amostras foram quimicamente reduzidas. Alíquotas de 0,4mL de extrato foram misturadas com 1mL de metanol, 0,5mL de água destilada e aproximadamente 40mg de boridreto de sódio. A mistura foi agitada em vórtex por 30s e incubada a temperatura ambiente ao abrigo de luz, por 30min. ubiquinol foi extraído em 4mL de hexano. Após centrifugação, a camada de hexano foi cuidadosamente removida, seca em nitrogênio. O resíduo foi 0,5mL de metanol/etanol 1/1 (v/v) (Lang 1986).

Condições de cromatografia: Foi empregado um sistema de HPLC Bioanalytics, acoplado a um detector eletroquímico (Waters 510). Amostras foram injetadas através de um sistema injetor Reodhyne (loop: $20\mu\text{L}$) para uma coluna Nova-Pak - $4\mu\text{m}$ com dimensões de $3,9 \times 150\text{ mm}$. Para a

separação utilizou-se o fluxo de 1mL/min da fase móvel contendo 20mM LiClO₄ em metanol/água 98:2 (v/v). A detecção foi feita usando-se um potencial de oxidação de 0,6V. Os tempos de retenção, em minutos, foram os seguintes: γ -tocoferol – 3,33; α -tocoferol – 3,56; licopeno – 5,54; β -caroteno – 7,34; e ubiquinol-10 – 10,5. A concentração de antioxidantes foi calculada pela comparação de área das amostras com a correspondente área padrão, sendo os resultados expressos em μ M.

III - Determinação de antioxidantes hidrossolúveis

Processamento das amostras: A Vitamina C de amostras de sangue heparinizado foi extraída com HPO₃ 10% utilizando-se 300 μ L de plasma para 900 μ L de HPO₃. As amostras foram centrifugadas, diluídas (200 μ L de sobrenadante para 600 μ L de fase móvel), filtradas através de um filtro GV Millex de 0,22 μ e injetadas em um sistema de HPLC (Wagner 1979). Esse sistema consistia de um detector UV Waters acoplado a um sistema de derivação isocrática. As amostras foram injetadas através de um sistema injetor Reodhyne (20 μ L) para uma coluna C18 μ Bondapak, com dimensões de 3,9 x 300mm. A separação foi realizada utilizando-se uma velocidade de fluxo constante de 1,0 mL/min de fase móvel (0,8% HPO₃). A detecção em UV foi feita a 235nm. O tempo de retenção observado para o ácido ascórbico foi de 3,18min. A concentração do antioxidante foi determinada por comparação da área da amostra com a correspondente área da curva padrão e expressa em μ M.

IV - Separação da LDL do Plasma

O sangue coletado com EDTA (1mg/dL) foi centrifugado a 3000 rpm a 4°C por 15min. O plasma foi removido e transferido para tubos de ultracentrífuga e seu volume total foi medido. Inibidores de protease foram adicionados a todas as amostras de plasma (Fluoreto de fenilmetilsulfonila - 10 μ L/mL de plasma, benzamidina 4 μ L/mL de plasma e aprotinina 2 μ L/mL de

plasma). O método de separação da LDL foi baseado na ultracentrifugação por gradiente de densidade corrigida com KBr (Havel et al 1955). Após a adição dos inibidores de proteases, a densidade do plasma foi ajustada para 1,019 com KBr, os tubos foram fechados e centrifugados a 39.200 rpm, em um rotor 80Ti (Beckman Ins) a 4°C por 24 horas. O sobrenadante obtido foi descartado após a primeira centrifugação e a densidade foi ajustada para 1,063 com KBr. Em seguida as amostras foram novamente centrifugadas a 39.200 rpm por 24 horas a 4°C. O sobrenadante correspondente à fração LDL foi coletado e dialisado por uma noite em solução de NaCl 0,9% contendo Chelex, a 4° C. Ao final da diálise a LDL foi colocada em tubos plásticos e borbulhada com gás nitrogênio. As amostras foram imediatamente utilizadas para as medidas de oxidabilidade e estocadas a -80°C sob N₂ por no máximo 3 dias para a separação da LDL_{minus}.

V - Avaliação da Oxidabilidade da Partícula de LDL

A oxidação foi monitorada pela formação de dienos conjugados por espectrofotometria U.V. a 234nm. A Fase Lag e a velocidade de oxidação foram determinadas de acordo com Esterbauer et al. Em cubetas de quartzo contendo PBS suficiente para um volume final de 1,0mL, foram colocadas alíquotas das amostras de LDL isoladas por ultracentrifugação (para uma concentração final de 100µg/mL) e a reação foi iniciada com 100µL de CuSO₄ 5µM. A absorbância foi monitorada por 180 min a 37° C. O intervalo de tempo entre a adição de CuSO₄ (tempo zero) e o aumento da absorbância (fase de propagação) dada pela tangente da curva interceptando o eixo X corresponde à *Fase Lag*. A velocidade de oxidação foi calculada como a tangente da curva de oxidação (Esterbauer et al 1988).

VI - Separação de LDL_{minus} por HPLC

Amostras de LDL isolada a uma concentração variando de 300-500 μ g de proteína foram injetados em um sistema de HPLC (1mL) para separar a LDL nativa, da LDL_{minus}. Separação e eluição foram realizadas a 1mL/min usando uma coluna de troca iônica (bioRad MA7Q) e um gradiente de NaCl em Tris-HCl (0,01M) de 0 a 0,3M (Hodis et al 1994). O eluato de proteína foi caracterizado a 280nm em um detector UV/Vis Waters 2487. O pico de integração foi feito usando-se um sistema de dados "Station Unicam CG".

VII - Determinação da concentração de proteínas

A quantidade de proteína por amostra de LDL isolada foi determinada pelo método de Lowry (Lowry et al 1951).

VIII - Purificação de β_2 GPI por cromatografia de afinidade

A uma amostra de 50mL de plasma humano foi adicionado 1,25mL de ácido perclórico 70% gota a gota, sob agitação constante, por 20 minutos. A mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi neutralizado com bicarbonato de sódio saturado para um pH de 6 a 7. Este sobrenadante neutralizado foi dializado em um tampão 20mM de Tris, contendo 30mM de NaCl, pH 7,1-7,2 por 24 horas. A amostra foi purificada utilizando-se uma coluna de Sepharose Heparina CL-6B Pharmacia Biotech, previamente equilibrada com 20mM de Tris, 30mM de NaCl, pH 7,2. Durante todo o procedimento, utilizou-se o fluxo de 1mL/min. A amostra foi passada duas vezes pela coluna no tampão de diálise, para ligação da proteína à coluna. Após este procedimento a coluna foi lavada com tampão 20mM de Tris/150mM de NaCl pH 7,0 até que a absorbância do eluato fosse < 0,01 a 280nm para remoção de ligações não específicas. Em seguida a proteína foi eluída com tampão 20mM de Tris/320mM de NaCl pH 8,5 em coletor de

frações, com a absorbância monitorada no comprimento de onda de 280nm. A amostra obtida foi dialisada em PBS e a coluna foi lavada com 20mM de Tris/500mM de NaCl, pH 8,5, e em seguida reequilibrada com 20mM de Tris/30mM de NaCl pH 7,1. Todo procedimento foi realizado a 4°C. Foi encaminhada uma alíquota para a confecção de um gel de SDS-PAGE e para um ensaio ELISA para detecção de anticorpos antifosfolípido com o intuito de verificar a pureza da preparação. A proteína obtida foi utilizada na padronização do ensaio ELISA para β_2 GPI.

IX - Ensaio imunoenzimático (ELISA) para β_2 GPI

Amostras: Foram utilizadas amostras de plasma de 100 voluntários idosos hipercolesterolêmicos. Todas as amostras de plasma foram colhidas com os voluntários em jejum de 12 horas, utilizando-se tubos Vacutainer contendo EDTA. Para a padronização do método, os ensaios foram realizados com amostras de plasma de voluntários jovens saudáveis e idosos normocolesterolêmicos (os mesmos utilizados para aferição da metodologia nos demais ensaios realizados).

Sensibilização da placa: Utilizamos placas NUNC do tipo Maxi-Sorp e β_2 GPI purificada no laboratório (como descrito anteriormente). A placa foi sensibilizada com 0,1 μ g de β_2 GPI /poço.

O tampão utilizado em todo o ensaio (sensibilização, lavagem de placas, diluição de plasma, diluição do estoque de β_2 GPI) foi o mesmo e consistiu de uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH7,4, contendo Na_2HPO_4 0,007M, NaH_2PO_4 H_2O 0,002M e NaCl 0,21M. A placa foi sensibilizada por 12horas a 37°C.

Bloqueio da Placa: Após a sensibilização, a placa foi lavada 3 vezes com PBS e bloqueada durante 2 horas com uma solução 5% de leite desnatado (Molico Nestlè®) em PBS.

Estudo das condições da etapa de competição: Foi escolhido um volume final de 100 μ L por poço para a incubação referente à etapa de competição, e o tempo de incubação foi fixado em 1 hora, a 37°C. As

absorbâncias correspondentes a 0 e 100% de ligação foram medidas, respectivamente, usando o Branco (100 μ L de PBS) e o C100% que corresponde a 100% de ligação do anticorpo à placa (50 μ L de PBS e 50 μ L de anticorpo primário, na mesma diluição empregada para as amostras), incubados sobre a placa sensibilizada. O anticorpo utilizado foi o monoclonal anti-apolipoproteína H da ICN Pharmaceuticals (5F7).

Os ensaios com amostras de voluntários foram padronizados com a diluição de 1:10000 de anticorpo primário e 1:200 de plasma. Em cada placa foram feitos: triplicatas das amostras, 4 controles C100% , 4 Brancos e duplicatas da curva padrão com 8 pontos.

Conjugado: Após incubação de 1 hora a 37°C (etapa de competição), a placa foi lavada 3 vezes com PBS. Sobre a curva padrão e as amostras foram adicionados 100 μ L/poço de conjugado Pharmingen-Becton Dickson Company (anticorpo policlonal conjugado à peroxidase anti-IgG de camundongo). O conjugado foi usado na diluição de 1:5000. Em seguida as placas foram incubadas durante 1 hora a 37°C e lavadas novamente.

Revelador: Como revelador foi utilizado um kit de TMB (DADE-BEHRING/Supplementary Reagents for Enzygnost-TMB). A leitura da placa foi feita em um leitor de ELISA - "microplate reader" modelo 3550 Bio Rad - em um comprimento de onda de 450nm.

Cálculos: Os valores de concentração de proteína da curva padrão, calculados a partir da β_2 GPI estoque, em μ g/poço, foram utilizados como logaritmo da concentração (abscissa) e os valores de absorbância em cada ponto da curva foram divididos pela absorbância do controle 100% (C100%) obtendo-se assim a porcentagem de ligação de anticorpo na placa (ordenada).

X - Análise estatística dos resultados

Diferenças significativas entre as populações foram analisadas com o teste t de Student usando os grupos controle e o subgrupo da população hipercolesterolêmica pareados como descrito em casuística (n=10). As

correlações entre os parâmetros medidos no grupo de 100 idosos hipercolesterolêmicos, foram avaliadas pelo método de Pearson. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. Foi utilizado o programa estatístico SPSS.

Resultados

I - Teste ELISA para β_2 GPI

A medida das concentrações plasmáticas de β_2 GPI foi realizada conforme descrito em material e métodos em um ensaio desenvolvido durante o projeto. Um ensaio de competição, utilizando β_2 GPI purificada, um anticorpo monoclonal primário (anti-ApoH ICN) e um sistema de revelação constituído de um anticorpo secundário marcado com peroxidase e de um cromógeno TMB (AcPx/TMB). Nesse tipo de ensaio, a concentração da proteína na amostra (ou no padrão) correlaciona-se inversamente com a absorvância.

Testamos a sensibilização da placa em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 (CO_3/HCO_3) e em tampão fosfato pH 7,4. Os resultados em tampão PBS foram melhores, mostrando menor variação entre as replicatas, provavelmente porque a proteína muda de conformação ou é menos estável a pH alcalino (Celli et al 1997). A concentração de β_2 -GPI de 0,1 $\mu\text{g/poço}$ mostrou-se ótima para as condições do ensaio. Quantidades maiores de β_2 GPI resultaram em absorvâncias muito altas e perda de sensibilidade.

A figura 1 mostra uma curva padrão típica. A melhor maneira de expressar dados de absorvância e concentração obtidos de ensaios de competição semelhantes a esse é o gráfico dos valores de porcentagem de ligação (%Lig) calculada segundo a fórmula:

$$\%Lig = \text{Abs teste} \div \text{Abs controle} \times 100\%$$

Onde Abs teste, é a absorvância obtida da leitura de um dos pontos da curva de concentração conhecida e Abs controle 100% a absorvância obtida quando apenas anticorpo primário e tampão são adicionados ao poço. O resultado obtido é representado em função do logaritmo da concentração de ApoH (Christofides et al 2001). As funções matemáticas que melhor descrevem o fenômeno estudado são, segundo a literatura, uma reta ou uma função polinomial de grau 6 (sigmóide).

Os pontos da curva padrão mostrada na figura 1 representam a média de 5 determinações em dias diferentes, e as barras de erro, o erro padrão da média desses ensaios. Os extremos da curva padrão correspondem a 1,28 e 0,01 μ g/poço e apresentam porcentagens de ligação de 0,2 e 1,2 respectivamente. O limite de sensibilidade do teste foi estimado como sendo a mínima concentração de β_2 GPI adicionada ao poço que ainda resulta em variação da absorbância com relação ao controle 100% (C100%). O C100% corresponde ao máximo de ligação do anticorpo primário, quando não se adiciona β_2 GPI para competir com a β_2 GPI usada para sensibilizar a placa (0,1 μ g/poço). Os valores de referência para concentração plasmática de β_2 GPI em humanos não estão estabelecidos, mas o plasma normal, segundo alguns trabalhos presentes na literatura, tem cerca de 200 μ g/mL. Portanto, a diluição empregada, de 1:200 significa 1 μ g de proteína/poço, o que esta dentro do limite estimado para a sensibilidade do método. Absorbâncias próximas ao controle 100% surgem quando a concentração de β_2 GPI esta abaixo de 0,04 μ g/poço. Esses valores de absorbância são independentes da concentração de β_2 GPI na amostra e estão abaixo do limite de sensibilidade.

O teste ELISA foi empregado para medir as concentrações de β_2 GPI em plasmas do grupo amostral. A validação da técnica para medidas em plasma foi feita estudando-se a concentração de β_2 GPI em várias diluições de plasma de voluntários jovens, adicionadas ou não da proteína purificada. Os resultados estão mostrados na figura 2 e indicam que as curvas padrão em plasma e tampão são equivalentes. Para estudar a interferência de componentes presentes no plasma, utilizamos diluições a partir de 1:200. Com diluições maiores do que 1:1000, o ensaio não apresentou sensibilidade adequada.

A média das concentrações plasmáticas de β_2 GPI obtida neste ensaio estão mostradas na figura 4.

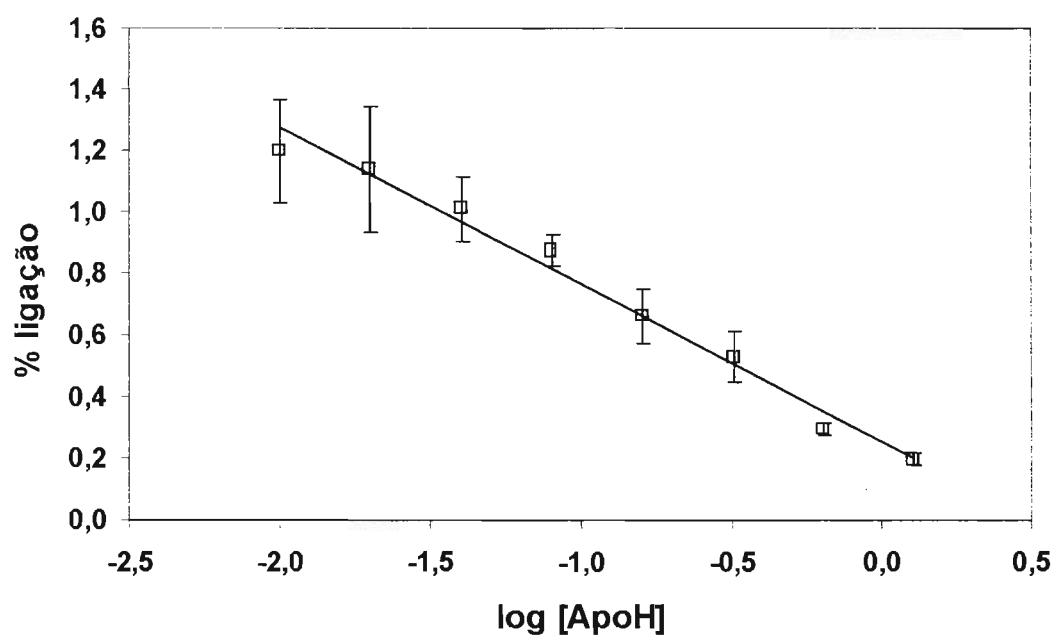


Figura 1- Curva padrão de ApoH (β_2 GPI) obtida a partir de diluições de uma solução estoque contendo $81\mu\text{g/mL}$ β_2 GPI. Curva média de 5 determinações.

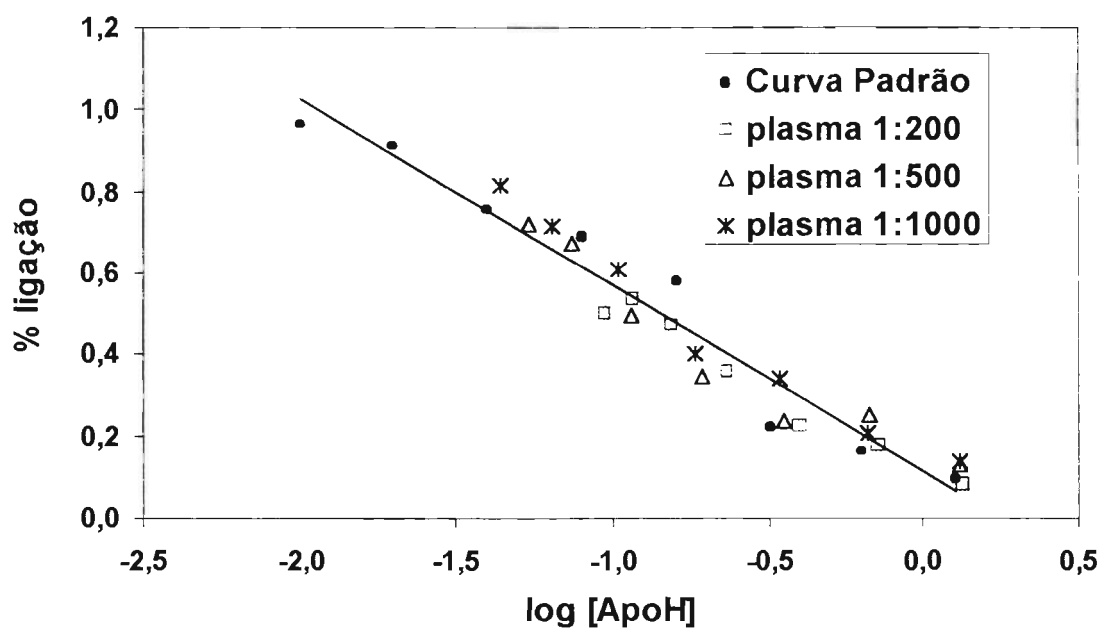


Figura 2- Curva de adição de padrão de ApoH (β_2 GPI). Curvas de adição de padrão sobre plasma diluído como indicado na legenda. A concentração inicial de ApoH nos plasmas controle foi estimada a partir da curva padrão em tampão.

II - Caracterização do grupo experimental

A literatura não descreve valores de referência para as concentrações de vitaminas antioxidantes nem para os parâmetros relacionados à oxidação da LDL *in vivo* (LDL_{minus}) ou à sua oxidabilidade *in vitro* (fase lag e velocidade de oxidação). Sendo assim, fizemos um estudo preliminar, para validar nossa hipótese de trabalho. Um grupo de indivíduos pareado como descrito em material e métodos foi estudado num total de 10 normocolesterolêmicos e 10 hipercolesterolêmicos. Os valores dos dados obtidos nos dois grupos também foram comparados com dados da literatura quando possível.

A tabela 2 documenta os critérios de inclusão (colesterol de LDL acima de 130mg/dL) a hipercolesterolemia (colesterol total acima de 200mg/dL) e mostra que os grupos analisados são diferentes com relação às concentrações plasmáticas de colesterol total, colesterol de LDL, colesterol de HDL, níveis de β_2 GPI e de LDL_{minus}.

As concentrações plasmáticas de LDL_{minus}, foram obtidas a partir de resultados de ensaios de cromatografia de troca iônica como descrito em material e métodos e são mostrados na figura 3. Os valores de concentração de LDL_{minus}, obtidos entre as duas populações foram diferentes ($p = 0,002$).

Os parâmetros do estado de oxidação da LDL, a duração da fase lag e a velocidade de oxidação da LDL foram obtidos a partir de curvas de formação de dienos conjugados durante a oxidação da LDL *in vitro*, como descrito em material e métodos. Como mostrado na tabela 2, tanto a velocidade de oxidação quanto a fase lag não foram diferentes nos dois grupos ($p=0,702$ e $0,724$ respectivamente).

A figura 4 mostra que a média das concentrações plasmáticas de β_2 GPI é diferente entre as duas populações estudadas ($p=0,04$).

As duas populações mostram-se homogêneas em relação às concentrações de vitaminas antioxidantes (tabela 3). Os valores obtidos com o α -tocoferol foram diferentes nos dois grupos ($p=0,005$). Os demais

antioxidantes, γ -tocoferol, β -caroteno, licopeno, ubiquinol-10 e ascorbato não foram diferentes nas duas populações.

Tabela 2- Caracterização do grupo experimental: parâmetros referentes ao perfil lipídico e estado de oxidação da partícula de LDL

	<i>Controles (n=10)</i>		<i>Hiperlipidêmicos (n=10)</i>		<i>p</i>
	<i>M±DP</i>	<i>EP</i>	<i>M±DP</i>	<i>EP</i>	
<i>Colesterol total (mg/dL)</i>	198±13	4	244±25	8	0,000
<i>LDLcolesterol (mg/dL)</i>	120±15	5	179±23	7	0,000
<i>HDLcolesterol (mg/dL)</i>	59±10	3	38±5	1	0,000
<i>VLDLcolesterol (mg/dL)</i>	19±6	2	279±16	5	0,073
<i>Triglicerídeos (mg/dL)</i>	95±31	10	147±79	25	0,070
<i>Lag Time (minutos)</i>	72±11	3	69±27	9	0,724
<i>Vel. de oxid. (ΔAbs/min)</i>	0,022±0,007	0,002	0,020±0,012	0,003	0,702

Tabela 3- Vitaminas antioxidantes

	<i>Controles (n=10)</i>		<i>Hiperlipidêmicos (n=10)</i>		<i>p</i>
	<i>M±DP</i>	<i>EP</i>	<i>M±DP</i>	<i>EP</i>	
<i>α-tocoferol</i>	14±4	1	9,3±2,6	0,8	0,005
<i>γ-tocoferol</i>	2,6±1,1	0,4	2,0±0,8	0,3	0,181
<i>β-caroteno</i>	0,6±0,6	0,2	0,4±0,3	0,1	0,352
<i>Licopeno</i>	0,4±0,3	0,1	0,3±0,1	0,05	0,238
<i>Ubiquinol -10</i>	0,16±0,12	0,04	0,009±0,054	0,017	0,095
<i>Ascorbato (μM)</i>	56±16	5	60±21	6	0,648

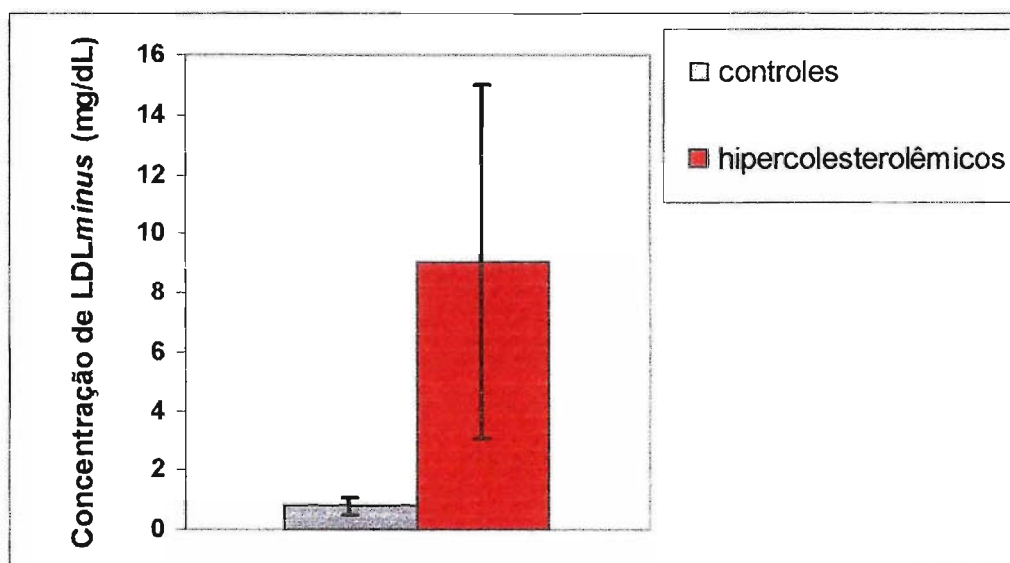


Figura 3- Média das concentrações plasmáticas de LDL_{minus} nas populações estudadas (controle e hipercolesterolêmicos pareados). Dados obtidos do ensaio de cromatografia de troca iônica. As barras de erro correspondem ao desvio padrão. Valor de p é de 0,002.

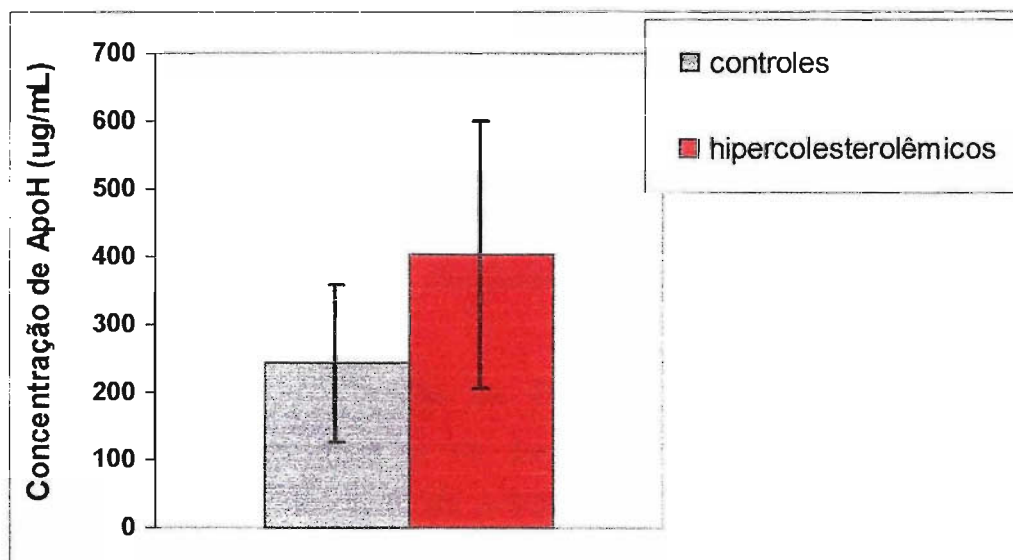


Figura 4- Média das concentrações plasmáticas de β_2 -GPI, Apo H, nas populações estudadas (controles e hipercolesterolêmicos pareados). Dados obtidos do ensaio imunoenzimático. As barras correspondem ao desvio padrão. O valor de p é de 0,04.

III - Estudos de correlação na população hipercolesterolêmica

As tabelas 4 e 5 mostram a estatística descritiva para o grupo de idosos dislipidêmicos. As médias dos valores obtidos nos parâmetros analisados são próximas às médias da população de 10 idosos utilizada no pareamento com a população normolipidêmica. A população pareada é uma fração representativa da população dislipidêmica utilizada nos estudos de correlação.

Um estudo de correlação de Pearson entre as concentrações plasmáticas de antioxidantes e os parâmetros de oxidação da LDL, teoricamente sensíveis ao efeito de antioxidantes *in vivo* (concentração de LDL_{minus}) e *in vitro* (fase lag), foram calculados para a população hipercolesterolêmica (tabela 6).

Há uma correlação direta entre a duração da fase lag e Ubiquinol-10 ($p = 0,037$). Não foram obtidas correlações entre os demais antioxidantes lipossolúveis - α -tocoferol, γ -tocoferol, β -caroteno, licopeno - e o lag time na população hipercolesterolêmica (tabela 6).

Foi encontrada uma correlação inversa entre as concentrações plasmáticas de α -tocoferol, Ubiquinol-10 e LDL_{minus} ($p=0,003$ e $0,037$ respectivamente). Não foram encontradas correlações entre as concentrações plasmáticas de LDL_{minus} e de γ -tocoferol, β -caroteno, licopeno (tabela 6).

Na população de idosos hipercolesterolêmicos, as concentrações plasmáticas de colesterol total, colesterol de LDL, colesterol de HDL, colesterol de VLDL e triglicerídios não se correlacionaram com as concentrações plasmáticas de β_2 GPI.

Dados obtidos do ensaio de oxidabilidade, como a velocidade de oxidação e fase lag, não mostraram correlação com as concentrações de β_2 GPI.

Também não foram obtidas correlações entre as concentrações plasmáticas de β_2 GPI e de LDL_{minus}.

Tabela 4- Descrição dos parâmetros analisados para a população hipercolesterolêmica

Parâmetro estudado (unidade empregada)	<i>M±DP</i>	<i>EP</i>
<i>Colesterol total (mg/dL)</i>	253±35	3
<i>LDLcolesterol (mg/dL)</i>	182±31	3
<i>HDLcolesterol (mg/dL)</i>	42±11	1
<i>VLDLcolesterol (mg/dL)</i>	35±29	3
<i>Triglicerídeos (mg/dL)</i>	156±61	6
<i>β₂GPI (μg/mL)</i>	397±168	17
<i>LDLminus (mg/dL)</i>	8±6	0,6
<i>LDLminus (%)</i>	5±3	0,3
<i>Lag Time (minutos)</i>	68±23	2
<i>Velocidade de oxidação (ΔAbs/min)</i>	0,03±0,01	0,001

Tabela 5- Concentração de plasmática de vitaminas antioxidantes na população hipercolesterolêmica (n=100)

Vitamina	<i>Concentração (nmol/mg colesterol de LDL)</i>	
	<i>M±DP</i>	<i>EP</i>
<i>α-tocoferol</i>	11±4	0,41
<i>γ-tocoferol</i>	1,8±0,9	0,09
<i>β-caroteno</i>	0,4±0,3	0,03
<i>Licopeno</i>	0,4±0,2	0,02
<i>Ubiquinol-10</i>	0,09±0,07	0,007
<i>Ascorbato (μM)</i>	57±23	2,3

Tabela 6- Correlações entre LDLminus, Fase Lag e os antioxidantes estudados

<i>Correlação</i>	<i>Coefficiente de correlação (Pearson)</i>	<i>p</i>
<i>LDLminus vs α-tocoferol</i>	-0,279	0,003
<i>LDLminus vs γ-tocoferol</i>	-0,057	0,556
<i>LDLminus vs β-caroteno</i>	0,006	0,950
<i>LDLminus vs licopeno</i>	-0,151	0,117
<i>LDLminus vs Ubiquinol-10</i>	-0,191	0,046
<i>Fase Lag vs α-tocoferol</i>	0,081	0,402
<i>Fase Lag vs γ-tocoferol</i>	0,085	0,382
<i>Fase Lag vs β-caroteno</i>	0,064	0,508
<i>Fase Lag vs licopeno</i>	0,048	0,62
<i>Fase Lag vs Ubiquinol-10</i>	0,201	0,037
<i>LDLminus vs β_2-GPI</i>	0,174	0,262

Discussão

Doenças cardiovasculares são um problema de saúde pública com importância crescente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. A susceptibilidade às doenças cardiovasculares, segundo a literatura, está associada à aquisição de fatores de risco potencialmente modificáveis como a hipertensão arterial, diabetes, dislipidemia e o fumo e a fatores de risco não modificáveis como histórico familiar e idade avançada (Libby & Bhattacharyya 1998).

Neste estudo, a concentração de antioxidantes e a oxidação da partícula de LDL foram avaliados em uma população que pode ser classificada como hipercolesterolêmica, por apresentar concentrações plasmáticas de colesterol total e de colesterol de LDL aumentadas como mostrado na tabela 4. O critério é documentado também na comparação entre grupos de idosos controle e hipercolesterolêmicos quando da validação da metodologia, conforme mostrado na tabela 2. A escolha da casuística deste trabalho, portanto, permitiu esperar efeitos da combinação de fatores de risco para o aparecimento de doenças cardiovasculares sobre os parâmetros medidos. A população escolhida é teoricamente mais susceptível a estas doenças do que a população normal, jovem ou idosa. (Baron et al 2001) É importante lembrar que estes indivíduos não apresentam quadro clínico de doença cardiovascular, pelo critério de inclusão adotado. Por isso, o estudo nessa população de aspectos relacionados à oxidação de LDL, que corresponde ao mecanismo mais aceito pela comunidade científica para o desenvolvimento da aterosclerose, é ainda mais interessante. Uma vez que a literatura aponta a concentração de colesterol na LDL como o determinante da formação das placas gordurosas e da progressão das lesões, considera-se que todos os indivíduos estudados apresentem algum grau de comprometimento vascular, mesmo que sub-clínico.

Como o desenvolvimento das placas ateromatosas envolve a oxidação da LDL *in vivo*, é razoável supor que, nos indivíduos da casuística,

encontrássemos concentrações elevadas de LDL_{minus}, o que de fato se verificou (figura 3 e tabela 4). Tanto a comparação entre as amostras pareadas mostra diferenças significativas, quanto os valores observados são mais elevados do que os encontrados na literatura para concentrações circulantes de LDL_{minus}, embora os valores de literatura não sejam referentes a populações de idosos hipercolesterolêmicos (Shimano et al 1991, Hodis et al 1994, Cazzolato et al 1991).

Concentrações plasmáticas de LDL_{minus} dependem de uma combinação entre a velocidade da oxidação de LDL *in vivo* e do tempo de permanência desta forma brandamente oxidada na circulação. Em qualquer caso, é importante lembrar que a susceptibilidade das partículas de LDL_{minus} à oxidação *in vivo*, especialmente no compartimento circulante, onde são continuamente expostas aos oxidantes produzidos pelos tecidos e pela parede vascular depende de características da própria partícula. As vitaminas antioxidantes representam uma proteção antioxidante para as partículas de LDL. Entre outros efeitos, limitam a ocorrência de peroxidação lipídica e das modificações da apolipoproteína derivadas da reação de aminoácidos com produtos de oxidação de lipídios presentes na LDL. A hipótese de que concentrações plasmáticas de vitaminas antioxidantes correlacionem-se com a oxidação de lipoproteínas tem sido abordada de diversas maneiras na literatura (Dieber-Roeder et al 1991, Princen et al 1992, Reaven et al 1993, Jilial et al 1993). O estudo dos efeitos do conteúdo de vitaminas sobre a oxidação da partícula *in vitro* levou ao desenvolvimento de ensaios de oxidabilidade como o que fizemos neste estudo. A oxidação da LDL *in vitro* é facilmente obtida em ensaios bem controlados de oxidação por sulfato de cobre. Descrita por Esterbauer et al (1992) a técnica permite avaliar a susceptibilidade da partícula à oxidação através do ensaio de oxidabilidade. Os antioxidantes contidos na LDL são consumidos de forma seqüencial durante a fase lag, segundo o seu potencial redox e sua concentração relativa (Halliwell & Gutteridge 1999a).

A situação *in vivo*, entretanto, pode ser bem mais complexa. A oxidação de lipoproteínas é modificada *in vivo* também pelos efeitos que as

vitaminas antioxidantes têm sobre a função de leucócitos e células endoteliais, menos conhecidos do que os efeitos sobre a peroxidação da partícula isolada. Além disso, discute-se que a fisiologia de antioxidação dependente de vitaminas antioxidantes envolva uma cascata de reações interligadas de oxi-redução, na forma de uma rede antioxidante. O estado de oxidação de cada vitamina e a disponibilidade de moléculas em diversos compartimentos alimentaria a manutenção de um ambiente redutor mais eficientemente, porque reações do metabolismo intermediário fornecem nucleotídeos reduzidos e energia para alimentar o funcionamento da rede de reações antioxidantes. Por isso, medidas de oxidação *in vitro* não necessariamente refletem o que acontece *in vivo* com a partícula de LDL.

Neste trabalho, o estudo da oxidabilidade da LDL *in vitro* e das concentrações de LDL_{minus} *in vivo* nos idosos hipercolesterolêmicos, permitiram estudar as correlações entre a formação de LDL_{minus} ou a susceptibilidade da LDL à oxidação e as concentrações circulantes de vitaminas antioxidantes.

Não existem valores de referência para nenhum desses parâmetros, embora a literatura apresente diversos estudos de população. No caso das vitaminas lipossolúveis, a literatura não é homogênea quanto à maneira de apresentar os resultados de concentração plasmática. Para evidenciar a proteção à oxidação da LDL, recomenda-se utilizar a concentração relativa aos valores de concentração de colesterol na LDL porque a fração de lipoproteínas em suspensão no sangue circulante é o compartimento onde as vitaminas se diluem e onde exercem seu papel protetor (Esterbauer et al 1992).

A orientação da dieta dos componentes da casuística, pode ser responsável pelo achado de que as populações controle e hipercolesterolêmica, pareadas, são bastante semelhantes quanto às concentrações de vitaminas antioxidantes (tabela 3). Apenas as concentrações plasmáticas de α -tocoferol são diferentes, embora ambos os grupos apresentem valores baixos com relação a outras populações documentadas na literatura. Os efeitos de uma concentração plasmática

baixa de α -tocoferol podem ser mais importantes se o indivíduo é dislipidêmico, pelo aumento do compartimento em que as moléculas da vitamina se distribuem.

Como discutido acima, o conteúdo de antioxidantes presente nas partículas de LDL é relevante na determinação da sua susceptibilidade à oxidação *in vitro*. O α -tocoferol é o principal antioxidante presente da partícula e um dos primeiros a ser consumido durante o processo de oxidação *in vitro* (Halliwell & Gutteridge 1999b), junto com o ubiquinol-10. Entretanto, embora a dieta da *American Heart Association*, seja preconizada para a obtenção de concentrações ótimas de antioxidantes, as concentrações plasmáticas de α -tocoferol na população hipercolesterolêmica são menores do que as consideradas protetoras (que previnem a oxidação da LDL) (Gey et al 1995), acima de 30 μ M. A população hipercolesterolêmica apresenta concentrações de α -tocoferol de 19,9 μ M, correspondentes aos valores de 14 nmol/mg colesterol na LDL. A população controle também não atinge concentrações protetoras (16 μ M). Estima-se que a ingestão de alimentos ricos em α -tocoferol, tal como preconizado, não tenha sido suficiente para que a população estudada atingisse os níveis circulantes considerados protetores.

Não encontramos diferença significativa entre os valores de fase lag para a população controle e hipercolesterolêmica (tabela 2).

A população hipercolesterolêmica de nosso estudo, não apresenta doença coronariana, mas por conta de seu estado dislipidêmico, esperávamos uma fase lag mais breve. Como não foram encontradas diferenças entre a fase lag, trabalhamos com a hipótese de que as concentrações plasmáticas de vitaminas antioxidantes da nossa população de idosos normo e hiperlipidêmicos estão abaixo dos valores que influenciariam na duração da fase lag.

A literatura não estabelece valores normais de fase lag. Protocolos que utilizam suplementação com antioxidantes, principalmente α -tocoferol mostram um aumento da fase lag, ou seja, um aumento da resistência da LDL à oxidação (Dieber-Roeder et al 1991, Princen et al 1992, Reaven et al

1993, Jilial et al 1993). Tais dados confirmam a hipótese de que antioxidantes plasmáticos influenciam na modificação oxidativa da LDL.

Esterbauer et al, mostraram que a incorporação de α -tocoferol a partículas de LDL *in vitro*, acarretava um aumento da fase lag, medida em ensaios de dienos conjugados (Esterbauer et al 1992).

Haidari et al recentemente constataram um aumento na susceptibilidade oxidativa da LDL em pacientes com doença coronariana. Comparados com indivíduos normais, doentes coronarianos apresentavam uma diminuição da fase lag e uma menor concentração de α -tocoferol nas partículas de LDL (Haidari et al 2001). Uma análise de regressão revelou que os níveis de α -tocoferol e a diminuição na fase lag são determinantes independentes de doença coronariana.

Na população hipercolesterolêmica o ubiquinol-10 (Q-10) é o único antioxidante a apresentar correlação positiva com a fase lag (tabela 6). Provavelmente níveis baixos desse antioxidante, sejam os responsáveis por essa correlação.

Por estar em concentrações muito pequenas na partícula de LDL – cerca de 20 vezes menos do que o α -tocoferol – os níveis de Ubiquinol-10 podem não implicar numa variação significativa na duração da fase lag na população hipercolesterolêmica (Halliwell & Gutteridge 1999b). Por outro lado, por ser um antioxidante produzido pela redução da coenzima Q-10 (cuja principal função está ligada a sistemas de transporte de elétrons transmembrana), esta substância pode ser importante para prevenir a oxidação da LDL *in vivo* por sua eficiente reciclagem (Halliwell & Gutteridge 1999b).

A velocidade de oxidação também não foi diferente entre os grupos pareados (tabela 2).

A velocidade de oxidação refere-se à fase de propagação da curva de oxidação da LDL por cobre e depende da peroxidação dos lipídios da partícula de LDL, com formação de hidroperóxidos, coincidindo com a formação dos dienos conjugados medidos no ensaio (Esterbauer et al 1992).

Segundo a literatura essa fase não depende do conteúdo de antioxidantes na partícula (Esterbauer et al 1992).

Sabe-se que a partícula de LDL nativa possui um baixo conteúdo de triglicerídios e um maior conteúdo de colesterol, livre e esterificado. Os dados obtidos com a velocidade de oxidação sugerem que a composição da partícula em ácidos graxos poliinsaturados, na sua maior parte presentes no colesterol esterificado, é semelhante nas duas populações.

As concentrações plasmáticas de LDL^{minus} não são consenso na literatura e dependem da técnica empregada nesta avaliação.

A separação por cromatografia de troca iônica, da LDL de 32 voluntários normais do sexo masculino, com idades entre 30 e 60 anos, revelou a presença de LDL⁻ na proporção média de 3,9% da LDL total (variando de 0,5 a 9,8%), com um conteúdo de TBARS três vezes maior na LDL⁻ que na fração de LDL nativa. Além disso, os níveis de LDL⁻, mostraram uma correlação negativa com as concentrações plasmáticas de HDL, com os fosfolípidos da LDL e com a concentração de vitamina E na LDL (Cazzolato et al 1991). Não houve correlação, entretanto entre as porcentagens de LDL⁻ em relação à LDL total, e o conteúdo de colesterol total, triglicerídeos ou colesterol de LDL no plasma (Cazzolato et al 1991).

Segundo Védie et al, a fração minimamente oxidada da LDL separada por cromatografia de troca iônica, pode chegar a até 10% (Védie et al 1991). Esta fração está presente soro humano normal antes mesmo da oxidação e apresenta características semelhantes, relativas à composição química, a partículas de LDL submetidas à oxidação branda com 5 μ M de cobre *in vitro* (Védie et al 1991).

Hodis et al realizaram estudos com macacos cynomolgus sp, normais (n=10) e hipercolesterolêmicos (n=30) utilizando cromatografia líquida de troca iônica. Encontraram, na fração LDL⁻, uma maior carga negativa e 53,9% de colesterol oxidado contra 10,7% da fração nativa. Animais hiperlipidêmicos apresentaram concentrações de LDL⁻ de (5,2 \pm 0,71)% e animais normais (4,9 \pm 0,19)% (5% em média nas populações estudadas). Além disso, a LDL⁻ separada do plasma destes animais, mostrou-se

citotóxica para culturas de células endoteliais aórticas de linhagem, diminuindo a fração de sobrevivência para essas células em ensaios de crescimento celular (Hodis et al 1994).

Como a literatura mostra grandes variações nos valores de referência para oxidação da LDL (*LDL_{minus}*) e não há estudos em humanos idosos, foi importante aferir nossa metodologia com um grupo de idosos normolipidêmicos.

A população hipercolesterolêmica pareada de nosso estudo, apresentou concentrações plasmáticas mais altas de *LDL_{minus}* em relação à população controle (figura 3).

Os processos que levam à oxidação da LDL nativa não são completamente conhecidos. Concentrações elevadas de *LDL_{minus}*, estão presentes em frações mais densas da LDL, em animais hipercolesterolêmicos e humanos saudáveis (Sevanian et al 1996). As quantidades absolutas de *LDL_{minus}*, em muitos estudos são correlacionadas com os níveis plasmáticos de LDL-colesterol, um indicativo de que eles podem ser maiores em indivíduos hipercolesterolêmicos (Sevanian et al 1996). Também em nosso estudo os níveis plasmáticos de *LDL_{minus}*, são correlacionados com os níveis de colesterol na LDL na população hipercolesterolêmica ($p < 0,001$).

Um aumento no número de partículas e do seu tempo de permanência na circulação, sob condições de dislipidemia, favorecem a passagem da LDL para camadas subendoteliais e a torna mais exposta a substâncias oxidantes, geradas por elementos celulares presentes no local (Pietzch et al 2001). São descritas modificações na cadeia da ApoB-100 da LDL em pacientes dislipidêmicos (Pietzch et al 2001), com aumento de substâncias provenientes de reações entre aminoácidos (Pro e Arg) da ApoB-100 e aldeídos formados por oxidação de ácidos graxos. Embora ainda não tenham sido demonstradas modificações na cadeia de ApoB-100 da *LDL_{minus}*, foi sugerido que esta partícula apresente alterações mínimas também na porção protéica (Berliner et al 1990).

O fato de termos observado concentrações maiores de LDL_{minus} na população hipercolesterolêmica, sustenta a hipótese de que ambientes dislipidêmicos favorecem a oxidação da LDL, aumentando a quantidade de formas oxidadas circulantes dessa partícula. Estudos de correlação realizados com os dados obtidos para a população dislipidêmica mostraram, de fato, uma correlação inversa entre os níveis de LDL_{minus} e de α -tocoferol e Ubiquinol-10 (tabela 6), em conformidade com a hipótese do trabalho.

A hipótese de que a LDL_{minus} é gerada a partir da LDL nativa, com oxidação e consumo de vitaminas e que essa oxidação pode ser prevenida com antioxidantes é sustentada pela correlação inversa entre o α -tocoferol e Ubiquinol-10 e o valor de LDL_{minus} na população hipercolesterolêmica.

Sabe-se que a reciclagem de antioxidantes, processo que só ocorre *in vivo*, influencia na formação de LDL_{minus}. Não está documentada na literatura a proporção em que uma rede antioxidante pode atuar modulando o processo de oxidação *in vivo*. Nossos resultados sugerem que as concentrações de LDL_{minus} circulantes podem depender dos níveis de α -tocoferol e ubiquinol-10.

A partir do que se coloca na literatura, sobre a relação entre a apolipoproteína H (β_2 GPI) e lipoproteínas, propusemos que a concentração plasmática de ApoH poderia relacionar-se ao metabolismo de LDL_{minus}. Os pontos principais que nos levaram a essa hipótese foram: i) a β_2 GPI distribui-se de forma desigual entre as frações de lipoproteínas, apesar de circular também na forma livre, indicando que essa distribuição possa ser regulada de algum modo (McNally et al 1996, George et al 1999, Romero et al 1998); ii) a β_2 GPI parece agir em conjunto com a Apo-CII e ativar a LPL (lípase lipoproteica) auxiliando na transformação de triglicerídios de quilomícrons e VLDL em ácidos graxos captados pelos tecidos (Nakaya et al 1980) iii) a β_2 GPI tem afinidade por partículas e superfícies negativas inclusive lipoproteínas oxidadas (Matsuura et al 1998); iv) β_2 GPI também modula a ingestão de partículas pelas células não parenquimatosas do fígado, sugerindo um papel dessa proteína na regulação das concentrações

plasmáticas das formas de lipoproteínas oxidadas por estes tipos celulares (Chonn et al 1995); além disso v) trabalhos recentes mostram que a β_2 GPI pode ter um efeito na prevenção da oxidação da LDL e modular o influxo de colesterol em macrófagos (Lin et al 2001).

Nossos dados sugerem que as concentrações plasmáticas de ApoH em idosos hipercolesterolêmicos são mais altas do que em idosos normocolesterolêmicos (figura 4). Valores de população para os indivíduos do estudo são mais altos do que os mostrados na literatura.

A literatura tem poucos registros sobre variações nas concentrações plasmáticas de β_2 GPI. Uma diminuição nas concentrações de β_2 GPI ocorre na coagulação intravascular disseminada e um aumento, nas síndromes do anticorpo antifosfolípido (McNally et al 1996, Matsuda et al 1996). A associação de β_2 GPI a lipídios negativos está relacionada à aquisição de auto-anticorpos antifosfolípidios e auto-imunidade, seria interessante investigar se indivíduos hipercolesterolêmicos têm risco maior para o aparecimento de auto-anticorpos com especificidade para fosfolípidios.

Em 1996 Brighton et al utilizando um soro policlonal anti- β_2 GPI padronizaram um teste ELISA e obtiveram valores de concentração de $186\pm 48\mu\text{g/mL}$ em plasma de 50 indivíduos normais (Brighton et al 1996).

No mesmo ano, utilizando um ensaio do tipo “sandwich” com cardioplipina aderida na fase sólida, Arvieux et al obtiveram concentrações maiores de β_2 GPI em pacientes positivos para anticorpos anticardioplipina. As concentrações de β_2 GPI no soro destes pacientes foram de $254\pm 68\mu\text{g/mL}$, enquanto que para controles normais, negativos para auto-anticorpos, os valores eram de $198\pm 55\mu\text{g/mL}$ (Arvieux et al 1996).

Horbach et al em 1998 utilizando plasma de indivíduos normais como controle e plasmas de indivíduos com síndrome do anticorpo antifosfolípido primária e lúpus eritematoso sistêmico, obtiveram valores de $142\pm 30\mu\text{g/mL}$ e de $164\pm 58\mu\text{g/mL}$ respectivamente para os valores das concentrações plasmáticas de β_2 GPI em um ELISA do tipo “sandwich” (Horbach et al 1998).

Utilizando plasmas de 8 indivíduos com síndrome do anticorpo antifosfolípido e 10 indivíduos normais, Balasubramanian et al padronizaram

ensaios do tipo avidina-biotina de competição e encontraram valores de $271 \pm 122 \mu\text{g/mL}$ em plasmas normais e $155 \pm 82 \mu\text{g/mL}$ em plasmas de pacientes doentes (Balasubramanian et al 1998). Neste mesmo estudo verificou-se que valores baixos em pacientes com síndrome do anticorpo antifosfolípido, poderiam advir do fato desses doentes possuírem anticorpos anti- $\beta_2\text{GPI}$ já que essa glicoproteína, quando ligada a fosfolípidios aniônicos, serve como um epítipo para autoanticorpos.

Biasiolo et al testaram plasma de 16 pacientes com síndrome do anticorpo antifosfolípido utilizando imunodifusão radial e encontraram valores de $369 \mu\text{g/mL}$, significativamente maiores do que em controles normais, com $210 \mu\text{g/mL}$ ($n=15$). Neste mesmo estudo, pacientes com outras síndromes auto-imunes apresentavam valores de $\beta_2\text{GPI}$ de $470 \mu\text{g/mL}$ ($n=14$) (Biasiolo et al 1999).

Em nosso estudo pareamos 10 indivíduos dislipidêmicos com a população controle e comparamos as médias das concentrações plasmáticas de $\beta_2\text{GPI}$. A população controle apresentou concentrações de $243 \pm 116 \mu\text{g/mL}$, variando de 60 a $400 \mu\text{g/mL}$ e a população hipercolesterolêmica $403 \pm 196 \mu\text{g/mL}$ variando de 170 a $773 \mu\text{g/mL}$. A diferença entre esses valores foi significativa ($p=0,04$).

Existe uma ampla variação interindividual nos níveis plasmáticos de ApoH que é exercida por controle genético, mas cujas bases moleculares ainda não são conhecidas (Mehdi 1999). O gene da $\beta_2\text{GPI}$, ou gene da ApoH é polimórfico e apresenta quatro alelos, designados de ApoH*1, ApoH*2, ApoH*3 e ApoH*4. este polimorfismo estrutural é detectado por técnicas imunológicas (immunoblotting) e técnicas de "focalização isoeletrica" (Sanguera et al 1997b).

O alelo ApoH*2 parece ser o mais comum na população em geral. Cerca de 11% da população caucasiana tem o alelo ApoH*1 e outros 11% carregam o alelo ApoH*3. O alelo ApoH*4 é somente encontrado em negros com uma frequência de 1% (Sanguera et al 1997b).

Kamboh et al mostraram que o alelo ApoH*3 pode ser dividido em dois subtipos ApoH*3^B e ApoH*3^W. A proteína produzida quando o alelo

ApoH*3W se manifesta, não se liga a fosfolipídios aniônicos. Por seqüenciamento direto de DNA, uma mutação (G → C) no códon 316, exon 8, foi encontrada. Essa mutação ocasiona uma substituição do aminoácido Trp 316 por Ser e está presente em todos os portadores do alelo ApoH*3^W (Kamboh et al 1995).

Recentemente Mehdi et al investigaram os níveis de β_2 GPI em 455 americanos caucasianos normolipidêmicos (220 homens e 235 mulheres) a fim de determinar o impacto do polimorfismo do gene da ApoH sobre os níveis de β_2 GPI plasmáticos. Os níveis plasmáticos na população investigada eram em média $200 \pm 20 \mu\text{g/mL}$ (variando de 34 a $312 \mu\text{g/mL}$). Nesse estudo uma análise de variância (ANOVA) dos níveis plasmáticos de β_2 GPI, mostraram uma associação significativa com o polimorfismo do gene de β_2 GPI. O mesmo grupo constatou que o alelo ApoH*3 estava associado a concentrações mais baixas de β_2 GPI e a forma mais comum desse alelo na população foi a ApoH*3^W (Mehdi et al 1999).

Além da variação interindividual, que afeta as médias dos níveis plasmáticos de β_2 GPI em vários trabalhos, não há dados na literatura sobre os níveis dessa proteína em populações dislipidêmicas.

Não conhecemos, em nossa população, o polimorfismo do gene da β_2 GPI, mas provavelmente as variações estruturais nos alelos da β_2 GPI também influenciam as concentrações plasmáticas de β_2 GPI na população estudada.

Auto-anticorpos com especificidade para fosfolipídios, como por exemplo: anticorpos anticardiolipina, anticorpos anti-LDLox e anticorpos anti-lisofosfatidilcolina estão presentes em baixos títulos e sem nenhum significado clínico em uma parcela da população normal (George et al 1999b, Horkko et al 1999). Aparecem também em doenças inflamatórias crônicas com componente auto-imune, como na doença alcoólica, sífilis congênita, além de SLE e APS (George et al 1999b, Horkko et al 1999). Wu et al propõem que, em níveis abaixo dos considerados patológicos, tais anticorpos podem estar envolvidos na remoção de substâncias produzidas

pelo nosso metabolismo como produtos de oxidação de membranas celulares e da própria LDL (Wu et al 1999).

É possível que em um ambiente dislipidêmico, ocorra um aumento da síntese de β_2 GPI em resposta a um aumento de produtos provenientes de reações de oxidação, mas que as concentrações desta proteína não dependam diretamente das concentrações de algum tipo de lipoproteína em especial. Isso explicaria a ausência de correlações encontradas entre o perfil lipídico e as concentrações de β_2 GPI nos 100 idosos estudados.

Trabalhos recentes de Lin et al, propõem que a β_2 GPI possua propriedades anti-aterogênicas. Esses estudos, realizados com populações portadoras de doenças cardiovasculares, mostram uma correlação positiva entre os níveis de β_2 GPI e a fase lag e uma correlação inversa com a susceptibilidade da partícula, medida como a velocidade de oxidação e a formação de dienos conjugados. A β_2 GPI também inibiu o influxo de colesterol em macrófagos em cultura (Lin et al 2001).

A β_2 GPI liga-se a lipoproteínas oxidadas *in vitro*. Recentemente uma molécula presente na superfície da LDL oxidada *in vitro* foi isolada e caracterizada, como sendo o 7-cetocolesterol-9-carboxinanonato. Essa substância, designada de oxLig-1 é responsável pela ligação de β_2 GPI à LDL oxidada (Kobayashi et al 2001).

Nossos dados, juntamente com os dados da população controle estudada por Lin (Lin et al 2001), sugerem que na situação de dislipidemia há uma diferença entre os pacientes que apresentam doença cardiovascular e a população clinicamente normal, já que há ausência de correlação entre as concentrações plasmáticas de LDL_{minus} e de β_2 GPI na população hipercolesterolêmica, exatamente como ele demonstrou em sua população controle. As concentrações elevadas encontradas por nós talvez estejam relacionadas ao efeito protetor da apoH, embora nossos dados não permitam verificar esta hipótese. O mecanismo para esta proteção poderia basear-se na relação entre a β_2 GPI e seu efeito sobre o endotélio vascular. A β_2 GPI é uma ativadora da lipase lipoproteica presente no endotélio (Nakaya et al 1980). Concentrações elevadas de β_2 GPI no plasma da

população hipercolesterolêmica poderiam resultar em aumento da degradação de LDL e diminuição do influxo de colesterol em macrófagos, de maneira semelhante ao que ocorre *in vitro* (Lin et al 2001). Esse mecanismo de modulação exercido pela β_2 GPI atuaria no sentido de prevenir a formação de células espumosas e impedir o agravamento de lesões protegendo populações dislipidêmicas.

Conclusões

Em indivíduos idosos hipercolesterolêmicos:

- As concentrações plasmáticas de LDL_{minus} são maiores do que em indivíduos idosos normocolesterolêmicos.
- As concentrações plasmáticas de LDL_{minus} correlacionam-se com as concentrações de α -tocoferol e de ubiquinol-10.
- A oxidabilidade da LDL correlaciona-se com as concentrações plasmáticas de ubiquinol-10.
- A concentração de α -tocoferol é baixa em relação a concentrações consideradas protetoras.
- As concentrações plasmáticas de β 2-GPI são maiores do que em normocolesterolêmicos.

Referências Bibliográficas

- AFEK, A., GEORGE, J., SHOENFELD, Y., GILBURD, B., LEVY, Y., SHAISH, A., KEREN, P., JANACKOVIC, Z., GOLDBERG, I., KOPOLOVIC, J., HARATS, D. Enhancement of atherosclerosis in β_2 -glycoprotein I-immunized apolipoprotein E-deficient mice. **Pathobiology**, Basel, v.67, p.19-28, 1999.
- ARVIEUX, J., DARNIGE, L., HACHULLA, E., ROUSSEL, B., BENZA, J.C., COLOMB, M.G. Species specificity of anti- β_2 -glycoprotein I autoantibodies and its relevance to anticardiolipin antibody quantitation. **Thromb. Haemostasis**, Stuttgart, v.75, p.725-730, 1996.
- AUGE, N., FITOUSSI, G., BASCANDS, J.L., PIERRAGI, M.T., JUNQUERO, D., VALENTE, P., GIROLAMI, J.P., SALVAYRE, R., NEGRE-SALVAYRE, A. Mildly oxidized LDL evokes a sustained Ca^{2+} - dependent reaction of vascular smooth muscle cells. **Circ. Res.**, Dallas, v.79, p.871-881, 1996.
- BALASUBRAMANIAN, K., KILLION, J.J., SCHROIT, A.J. Estimation of plasma β_2 -glycoprotein I levels by competitive ELISA. **Thromb. Res.**, Oxford, v.92, p.91-97, 1998.
- BARON, R.B. Lipid abnormalities. In: TIERNEY Jr., L.M., McPHEE, S.J., PAPADAKIS, M.A., eds. **Current medical diagnosis & treatment**. 40.ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2001. cap.28, p.1208-1221.
- BERLINER, J.A., TERRITO, M.C., SERAVIAM, A., RAMIN, S., KIM, J.A., BAMSHAD, B., ESTERSON, M., FOGELMAN, A.M. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. **J. Clin. Invest.**, New York, v.85, p.1260-1266, 1990.
- BIASIOLO, A., RAMPAZZO, P., BROCCO, T., BARBERO, F., ROSATO, A., PENGO, V. [Anti- β_2 -glycoprotein I- β_2 -glycoprotein I] immune complexes in

patients with antiphospholipid syndrome and other autoimmune diseases. **Lupus**, Basingstoke, v.8, p.121-126, 1999.

BIELICKI, J.K., FORTE, T.M., McCALL, M.R. Minimally oxidized LDL is a potent inhibitor of lecithin cholesterol acyltransferase activity. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.37, p.1012-1017, 1996.

BRIGHTON, T.A., HOGG, P.J., DAY, Y.-P., MURRAY, B., CHONG, B.H., CHESTERMAN, C.N. β_2 -glycoprotein I in thrombosis: evidence for a role as a natural anticoagulant. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v.93, p.185-194, 1996.

BURTON, G.W., WEBB, A., INGOLD, K.A. A mild, rapid, and efficient method of lipid extraction for use in determining vitamin E/lipid ratios. **Lipids**, Champaign, v.20, p.29-35, 1985.

CAZZOLATO, G., AVOGARO, P., BITTOLO-BON, G. Characterization of a more electronegatively charged LDL subfraction by ion exchange HPLC. **Free Radical Biol. Med.**, Oxford, v.11, p.247-253, 1991.

CELLI, C.M. **Interação de anticorpos antifosfolipídios com seus epítomos e o papel da β_2 -glicoproteína.** São Paulo, 1997. 117p. [Tese de Doutorado - Instituto de Química da USP].

CHONN, A., SEMPLET, S.C., CULLIS, P.R. β_2 -glycoprotein I is a major protein associated with very rapidly cleared liposomes in vivo, suggesting a significant role in the immune clearance of non-self particles. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.270, p.25845-25849, 1995.

CHRISTOFIDES, N.D. Free analyte immunoassay. In: WILD, D., ed. **The immunoassay handbook.** 2.ed. New York: Nature Publishing Group, 2001. cap.4, p.61-77.

CUADRADO, M.J., TINAHONES, F., CAMPS, M.T., RAMON, E., GÓMEZ-ZUMAQUERO, J.M., KHAMASHTA, M.A., HUGHES, G.R.V.

- Antiphospholipid, anti- β_2 -glycoprotein I and anti-oxidized-low-density-lipoprotein antibodies in antiphospholipid syndrome. **Q. J. Med.**, Oxford, v.91, p.619-627, 1998.
- CUSHING, S.D., BERLINER, A.J., VALENTE, A.J., TERRITO, M.C., NAVAB, M., PARHAMI, F., GERRITY, R., SCHWARTZ, C.J., FOGELMAN, A.M. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.87, p.5134-5140, 1990.
- DIEBER-ROEDER, M., PUHL, H., WAEG, G., STRIEGL, G., ESTERBAUER, H. Effects of oral supplementation with d-alpha-tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and its oxidation resistance. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.8, p.1325-1333, 1991.
- DRAKE, T.A., HANNANI, K., FEI, H.H., LAVI, S., BERLINER, J.A. Minimally oxidized low density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v.138, p.601-610, 1991.
- ESTERBAUER, H., DIEBER-ROTHENEDER, M., WAEG, G., JÜRGENS, G. Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low density lipoprotein. **Chem. Res. Toxicol.**, Washington, v.3, p.77-83, 1990.
- ESTERBAUER, H., GEBICKI, J., PUHL, H., JÜRGENS, G. The role of lipid and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Radical Biol. Med.**, Oxford, v.13, p.341-390, 1992.
- ESTERBAUER, H., RAMOS, P. Chemistry and pathophysiology of oxidation of LDL. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, Berlin, v.127, p.31-64, 1995.
- ESTERBAUER, H., STRIEGEL, G., PUHL, H., ROTHENEDER, M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. **Free Radical Res. Commun.**, Lausanne, v.6, p.67-77, 1988.

- GEORGE, J., GILBURD, B., LANGEVITZ, P., LEVY, Y., NEZLIN, R., HARATS, D., SHOENFELD, Y. β_2 -Glycoprotein I containing immune-complexes in lupus patients: association with thrombocytopenia and lipoprotein (a) levels. **Lupus**, Basingstoke, v.8, p.116-122, 1999b.
- GEORGE, J., HARATS, D., GILBURD, B., ARNON, A., LEVY, Y., SCHNEIDERMAN, J., SHOENFELD, Y. Immunolocalization of β_2 -glycoprotein I (Apolipoprotein H) to human atherosclerotic plaques. **Circulation**, Dallas, v.99, p.2227-2237, 1999a.
- GEY, K.F. Prevention of early stages of cardiovascular disease and cancer may require concurrent optimization of all major antioxidants and other nutrients: an update and reevaluation of observational data and intervention trials. In: BELLAMONO, G., MAGI, E., RICE-EVANS, C., eds. **Free radicals, lipoprotein oxidation and atherosclerosis**. London: Richelieu Press, 1995. p.119-134.
- GROOT, P.G., BOUMA, B., LUTTERS, B.C.H., SIMMELINK, J.A., DERKSEN, R.H., GROS, P. Structure function studies on β_2 -glycoprotein I. **J. Autoimmun.**, Basel, v.15, p.87-89, 2000.
- HABERLAND, M.E., FONG, D., CHENG, L. Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. **Science**, Washington, v.241, p.215-218, 1988.
- H Aidari, M., JAVADI, E., KADKHODAE, M., SANATI, A. Enhanced susceptibility to oxidation and diminished vitamin E content of LDL from patients with stable coronary artery disease. **Clin. Chem.**, Winston Salem, v.47, p.1234-1240, 2001.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. New York: Oxford University Press, 1999a. cap.3, p.105-245.

- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. New York: Oxford University Press, 1999b. cap.9, p.617-783.
- HASUNUMA, Y., MATSUURA, E., MAKITA, Z., KATAHIRA, T., NISHI, S., KOIKE, T. Involvement of β_2 -glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.107, p.569-578, 1997.
- HAVEL, R.J., EDGER, H.A., BRAGDON, J.H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. **J. Clin. Invest.**, New York, v.34, p.1345-1352, 1955.
- HODIS, H.N., KRAMSH, D.M., AVOGARO, S., 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^o). **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.35, p.669-677, 1994.
- HORBACH, D.A., OORT, E., TEMPELMAN, J.M., DERKSEN, R.H.W.M., GROOT, P.G. The prevalence of a non-phospholipid-binding form of β_2 -glycoprotein I in human plasma. **Thromb. Haemostasis**, Stuttgart, v.80, p.791-797, 1998.
- HORKKO, S., BIRD, D.A., MILLER, E., ITAPE, H., LEITINGER, N., SUBBANAGOUNDER, G., BERLINER, J., FRIEDMAN, P., DENNIS, E.A., CURTISS, L.K., PALINSKI, W., WITZTUM, J.L. Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of oxidized low density lipoprotein. **J. Clin. Invest.**, New York, v.103, p.117-128, 1999.
- JILIAL, I., GRUNDY, S. Effect of combined supplementation with α -tocopherol, ascorbate, and β -carotene on low density lipoprotein oxidation. **Circulation**, Dallas, v.88, p.2780-2788, 1993.

- KAMBOH, M.I., WAGENKENECHT, D.R., McINTYRE, J.A. Heterogeneity of the apolipoprotein H*3 allele and its role in affecting the binding of apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I) to anionic phospholipids. **Hum. Genet.**, Berlin, v.95, p.385-388, 1995.
- KIM, J.A., TERRITO, M.C., WAYNER, E., CARLOS, T.M., PARHAMI, F., SMITH, C.W., HABERLAND, M., FOGELMAN, A.M., BERLINER, A.J. Partial characterization of leukocyte binding molecules on endothelial cells induced by minimally modified LDL. **Arterioscler. Thromb.**, Dallas, v.14, p.427-436, 1994.
- KOBAYASHI, K., MATSUURA, E., LIU, Q., FURUKAWA, J., KAIHARA, K., INAGAKI, J., ATSUMI, T., SAKAIRI, N., YASUDA, T., VOELKER, D.R., KOIKE, T. A specific ligand for β_2 -glycoprotein I mediates autoantibody-dependent uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.42, p.697-709, 2001.
- KOSUGI, K., MOREL, D.W., Di CORLETO, P.E., CHISHOLM, G.H. Toxicity of oxidized LDL to cultured fibroblasts is selective for S phase of the cell cycle. **J. Cell. Physiol.**, Philadelphia, v.130, p.311-317, 1987.
- LANG, J.K., GOHIL, K., PACKER, L. Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinols, and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions. **Anal. Biochem.**, Baltimore, v.157, p.106-112, 1986.
- LASKI, L.A. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. **Science**, Washington, v.258, p.964-968, 1992. [26]
- LIAO, F., ANDALIBI, A., DEBEER, F.C., FOGELMAN, A.M., LUSIS, A.J. Genetic control of inflammatory gene induction and NF κ B-like transcription factor activation in response to atherogenic diet in mice. **J. Clin. Invest.**, New York, v.91, p.2572-2577, 1993.

- LIAO, F., ANDALIBI, A., QIAO, J.H., ALLAYE, H., FOGELMAN, A.M., LUSIS, A.J. Genetic evidence for a common pathway mediating oxidative stress, inflammatory gene induction, and aortic fatty streak formation in mice. **J. Clin. Invest.**, New York, v.94, p.877-884, 1994.
- LIAO, F., BERLINER, J.A., MEHRABIAN, M., NAVAB, M., DEMER, L., LUSIS, A.J., FOGELMAN, A.M. Minimally modified low density lipoprotein is biologically active in vivo in mice. **J. Clin. Invest.**, New York, v.87, p.2253-2257, 1991.
- LIBBY, P., BHATTACHARYYA, G., Atherosclerosis. In: LILLY, L.S., ed. **Pathophysiology of heart disease**. Philadelphia: Lippincott/Williams & Wilkins, 1998. cap. 5, p.101-117.
- LIMAYE, V., BELTRAME, J., COOK, R., GILLIS, D., PILE, K. Evaluation of antibodies to β_2 -glycoprotein I in the causation of coronary atherosclerosis as part of the antiphospholipid syndrome. **Aust. N. Z. J. Med.**, Sidney, v.29, p.789-786, 1999.
- LIN, K.-Y., PAN, J.-P., YANG, D.-L., HUANG, K.-T., CHANG, M.-S., DING, P.Y.-A., CHIANG, A.-N. Evidence for inhibition of low density lipoprotein oxidation and cholesterol accumulation by apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I). **Life Sci.**, Oxford, v.69, p.707-719, 2001.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.193, p.265-271, 1951.
- MATSUDA, J., GOTOH, M., KAWASUGI, K., GOHCHI, K., TSUKAMOTO, M., SAITOH, N. Negligible synergistic effect of β_2 -glycoprotein I on the reactivity of antioxidantized low-density lipoprotein antibody to oxidized low-density lipoprotein. **Am. J. Hematol.**, New York, v.52, p.114-121, 1996.

- MATSUURA, E., KOBAYASHI, K., YASUDA, T., KOIKE, T. Antiphospholipid antibodies and atherosclerosis. **Lupus**, Basingstoke, v.7, suppl.2, p.135-138, 1998.
- McEVOY, L.M., SUN, H., TSAO, P.S., COOKE, J., BERLINER, A.J., BUTCHER, E.C. Novel vascular molecule involved in monocyte adhesion to aortic endothelium in models of atherogenesis. **J. Exp. Med.**, New York, v.185, p.2069-2075, 1997.
- McNALLY, T., MACKIE, I.J., ISENBERG, D.A., MACHIN, S.J. β_2 -Glycoprotein I inhibits factor XII activation on triglyceride rich lipoproteins: the effect of antibodies from plasma of patients with antiphospholipid syndrome. **Thromb. Haemostasis**, Stuttgart, v.76, p.220-227, 1996.
- MEHDI, H., ASTON, C.E., SANGUERA, D.K., HAMMAN, R.F., KAMBOH, M.I. Genetic variation in the apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I) gene affects plasma apolipoprotein H concentrations. **Hum. Genet.**, Berlin, v.105, p.63-71, 1999.
- MOTCHNIK, P.A., FREI, B., AMES, B.N. Measurement of antioxidants in human blood plasma. **Methods Enzymol.**, New York, v.234, p.269-274, 1994.
- NAKAYA, Y., SCHAEFER, J., BREWER, H.B. Activation of human post heparin lipoprotein lipase by apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I). **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.95, p.1168-1174, 1980.
- NAVAB, M., IMES, S.S., HAMA, S.Y., HOUGH, G.P., ROSS, L.A., BORK, R.W., VALENTE, A.J., BERLINER, A.J., DRINKWATER, D.C., LAKS, H., FOGELMAN, A.M. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in co-cultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. **J. Clin. Invest.**, New York, v.88, p.2039-2047, 1991.

- NEREM, R.M., SPRAGUE, E.A. Hemodynamic determinants of the development and distribution of lesions. In: BORN, G.V.R., SCHWARTZ, C.J., eds. **New horizons in coronary heart disease**. London: Current Science, 1993. cap.9, p.1-10.
- PARASASSI, T., BITTOLO-BON, G., BRUNELLI, R., CAZZOLATO, G., KRASNOWSKA, E.W., MEI, G., SEVANIAN, A., URSINI, F. Loss of apoB-100 secondary structure and conformation in hydroperoxide rich, electronegative LDL. **Free Radical Biol. Med.**, Oxford, v.31, p.82-89, 2001.
- PETRI, M. The clinical syndrome associated with antiphospholipid antibodies. **J. Rheumatol.**, Toronto, v.19, p.505-510, 1992.
- PIETZCH, J., LATTKE, P., JULIUS, U. Oxidation of apolipoprotein B-100 in circulating LDL is related to LDL residence time. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v.20, p.63-67, 2000.
- PRINCEN, H.M.G., Van POPPEL, G., VOGELEZANG, C., BUYTENHEK, R., KOK, F.J. Supplementation with vitamin E but no β -carotene in vivo protects low density lipoprotein from lipid peroxidation in vitro. **Arterioscler. Thromb.**, Dallas, v.12, p.554-560, 1992.
- RAJAVASHISTH, T.B., YAMADA, H., MISHRA, N.K. Transcriptional activation of the macrophage colony stimulating factor gene by minimally modified LDL. Involvement of nuclear factor-kappa B. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v.15, p.1591-1602, 1995.
- REAVEN, P.D., KHOUW, A., BELTZ, W.F., PARTHAZARATHY, S., WITZTUM, J.L. Effect of dietary antioxidant combinations in humans. **Arterioscler. Thromb.**, Dallas, v.13, p.590-598, 1993.
- ROMERO, F.I., AMENGUAL, O., ATSUMI, T., KAMASHTA, M.A., TINAHONES, F.J., HUGHES, G.R.V. Arterial disease in lupus and secondary antiphospholipid syndrome: association with anti- β_2 -

- glycoprotein I antibodies but not with antibodies against oxidized low-density lipoprotein. **Br. J. Rheumatol.**, Oxford, v.37, p.883-889, 1998.
- SANGUERA, D.K., KRISTENSEN, T., HAMMAN, R.F., KAMBOH, M.I. Molecular basis of the apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I) protein polymorphism. **Hum. Genet.**, Berlin, v.100, p.57-62, 1997a.
- SANGUERA, D.K., WAGENKENECHT, D.R., McINTYRE, J.A., KAMBOH, M.I., Identification of structural mutations in fifth domain of Apolipoprotein H which affect phospholipid binding. **Hum. Mol. Genet.**, Oxford, v.6, p.311-316, 1997b.
- SCHULTZ, H.E., HEIDE, K., HAUPT, H. Uber ein bisher unbekanntes neidermolekul es Beta2-globulindes humanseruns. **Naturwissenschaften**, Berlin, v.48, p.719-726, 1961.
- SCHWARTZ, C.J., SPRAGUE, E.A. Vascular endothelium and hemodynamic stress. Editorial. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, Milan, v.2, p.99-100, 1992.
- SCHWARTZ, C.J., VALENTE, A.J. The pathogenesis of atherosclerosis. In: SCHWARTZ, C.J., VALENTE, A.J., eds. **Natural antioxidants in human health and disease**. New York: Academic Press, 1994. cap.10, p.287-300.
- SEVANIAN, A., HODIS, H.N., HWANG, J., McLEOD, L.L., PETERSON, H. Characterization of endothelial cell injury by cholesterol oxidation products found in oxidized LDL. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.36, p.1971-1986, 1995.
- SEVANIAN, A., HWANG, J., HODIS, H., CAZZOLATO, G., AVOGARRO, P. Contribution of an in vivo oxidized LDL to LDL oxidation and its association with dense LDL subpopulations. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v.16, p.784-793, 1996.
- SHIMANO, H., YAMADA, N., ISHIBASHI, S., MOKUNO, H., MORI, N., GOTODA, T., HARADA, K., AKANUMA, Y., MURASE, T., YAZAKI, Y.,

- TAKAKU, F. Oxidation-labile subfraction of human plasma low density lipoprotein isolated by ion-exchange chromatography. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.32, p.763-773, 1991.
- SHOENFELD, Y., HARATS, D., GEORGE, J. Atherosclerosis and antiphospholipid syndrome: a link unravelled? **Lupus**, Basingstoke, v.7, p.140-145, 1998.
- SHOENFELD, Y., HARATS, D., GEORGE, J. Heat shock protein 60/65, β_2 -glycoprotein I and oxidized LDL as players in murine atherosclerosis. **J. Autoimmun.**, Basel, v.15, p.199-202, 2000.
- SPARROW, C.P., PARATHASARATHY, S., STEIBERG, D. Enzymatic modification of low density lipoprotein by purified lipoxigenase plus phospholipase A₂ mimics cell-mediated oxidative modification. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.29, p.745-753, 1988.
- SPRIGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration the multistep paradigm. **Cell**, Cambridge, v.76, p.311-317, 1994.
- STAFFORINI, D.M., PRESCOTT, S.M., ZIMMERMAN, G.A., McINTYRE, T.M., Mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1301, p.161-168, 1996.
- STEINBRECHER, U.P. Oxidation of human LDL results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.262, p.3603-3614, 1987.
- TAKEI, A., HUANG, Y., LOPES-VIRELLA, M.F. Expression of adhesion molecules by human endothelial cells exposed to oxidized low density lipoprotein. Influences of degree of oxidation and location of oxidized LDL. **Atherosclerosis**, Shannon, v.154, p.79-86, 2001.
- TENG, P., VORA, D.K., ELICES, M., FRANK, J., TERRITO, M.C., BERLINER, A.J. The role of alternatively spliced fibronectin in monocyte

- binding to endothelial cells treated with oxidized lipids. **FASEB J.**, Bethesda, v.10, p.A1281-A1291, 1996.
- TINAHONES, F.J., CUADRADO, M.J., KHAMASHTA, M.A., MUJIC, F., GOMES-ZUMAQUERO, J.M., COLLANTES, E., HUGHES, G.R.V. Lack of cross-reaction between antibodies to β_2 -glycoprotein I and oxidized low-density lipoprotein in patients with antiphospholipid syndrome. **Br. J. Rheumatol.**, Oxford, v.37, p.746-750, 1998.
- VAARALA, O., PUURUNEN, M., LUKKA, M., ALFTHAN, G., LEIRISALO-REPO, M., AHO, K., PALOSUO, T. Affinity-purified cardiolipin-binding antibodies show heterogeneity in their binding to oxidized low-density lipoprotein. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.104, p.269-277, 1996.
- VEDIE, B., MYARA, I., PECH, M.A.M., MAZIERE, J., MAZIERE, C., CAPRANI, R., MORATI, N. Fractionation of charge-modified low density lipoproteins by fast protein liquid chromatography. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.32, p.1359-1369, 1991.
- VORA, D.K., FANG, Z.T., LIVA, S.M., TYNER, T.R., PARLANI, F., WATSON, A.D., DRAKE, T.A., TERRITO, M.C., BERLINER, J.A. Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression. **Circ. Res.**, Dallas, v.80, p.810-816, 1997.
- WAGNER, E.S., LINDLEY, B., COFFIN, R. High-performance liquid chromatographic determination of ascorbic acid in urine: effect on urinary excretion profiles after oral and intravenous administration of vitamin C. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.163, p.225-232, 1979.
- WATSON, A.D., BERLINER, J.A., HAMA, S.Y., LA DU, B.N., FAULL, K., FOGELMAN, A.M., NAVAB, M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. **J. Clin. Invest.**, New York, v.96, p.2882-2891, 1995a.

- WATSON, A.D., LEITINGER, N., NAVAB, M., FAULL, H., HÖRKKÖ, S., WITZTUM, J.L., PALINSKI, W., SCHWENKE, D., SALOMON, R.G., SHA, W., SUBBANAGOUNDER, G., FOGELMAN, A.M., BERLINER, J.A. Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence *in vivo*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.272, p.13597-13605, 1997.
- WATSON, A.D., NAVAB, M., HAMA, S.Y., SEVANI, A., PRESCOTT, S.M., STAFFORINI, D.M., McINTYRE, T.M., LA DU, B.N., FOGELMAN, A.M., BERLINER, J.A. Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. **J. Clin. Invest.**, New York, v.95, p.774-782, 1995b.
- WU, R., SVENGUSSON, E., GUNNARSSON, I., ANDERSON, B., LUNDBERG, I., ELINDER, L.S., FROSTEGÄRD, J. Antibodies against lysophosphatidylcholine and oxidized LDL in patients with SLE. **Lupus**, Basingstoke, v.8, p.142-151, 1999.
- YLA-HERTTUALA, S., PALINSKI, W., ROSENFELD, M.E., PARTHASARATHY, S., CAREW, T.E., BUTLER, S., WITZTUM, J.L., STEINBERG, D. Evidence for presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. **J. Clin. Invest.**, New York, v.84, p.1086-1095, 1989.
- YOSHIDA, H., QUEHENBERGUER, O., KONDRATENKO, N., GREEN, S., STEINBERG, D. Minimally oxidized low density lipoprotein increases expression of scavenger receptor A, CD36, and macrosialin in resident mouse peritoneal macrophages. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v.18, p.794-800, 1998.