

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

**Determinação da Lipoproteína de Baixa Densidade
Eletronegativa (LDL⁻) e de seus Autoanticorpos em
Pacientes Portadores de Síndromes Coronárias
Estáveis (Angina Estável) e Síndromes Coronárias
Agudas (Angina Instável e Infarto Agudo do Miocárdio)**

JAIR APARECIDO DE OLIVEIRA

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

**Orientadora
Prof.^a Dr.^a Dulcineia Saes Parra Abdalla**

SÃO PAULO

2003

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005745

Ficha Catalográfica

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

O48d Oliveira, Jair Aparecido de
Determinação da lipoproteína de baixa densidade eletronegativa (LDL) e seus autoanticorpos em pacientes portadores de síndromes coronárias estáveis (angina estável) e síndromes coronárias agudas (angina estável e infarto agudo do miocárdio) / Jair Aparecido de Oliveira. -- São Paulo, 2003.
104p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Curso de Mestrado Interinstitucional com a Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Abdalla, Dulcineia Saes Parra

I. Lipídio : Bioquímica clínica I. T. II. Abdalla, Dulcineia Saes Parra, orientador.

616.0756 CDD

Jair Aparecido de Oliveira

Determinação da Lipoproteína de Baixa Densidade Eletronegativa (LDL⁻) e de seus Autoanticorpos em Pacientes Portadores de Síndromes Coronárias Estáveis (Angina Estável) e Síndromes Coronárias Agudas (Angina Instável e Infarto Agudo do Miocárdio)

**Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre**

**Prof^ª. Dr^ª. Dulcineia Saes Parra Abdalla
orientadora/presidente**

**Prof^ª. Dr^ª. Tânia Leme da Rocha Martinez
1^º. examinador**

**Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa
2^º. examinador**

São Paulo, 30 de Outubro de 2003.

Dedico

Para minha esposa Dora e meu filho Bruno, pela compreensão de minha ausência física e mental nestes dois preciosos anos de suas vidas.

Especialmente

Aos meus pais, Milton e Alice, que dedicaram a maior parte de suas vidas para que estas palavras pudessem ser escritas.

AGRADECIMENTOS

A todos os pacientes e seus familiares que, talvez no momento mais difícil de suas vidas, prontamente colaboraram para que este estudo fosse realizado. Para eles, devo a mais profunda gratidão.

A minha orientadora, prof.^a Dr.^a Dulcineia Saes Parra Abdalla, não apenas por sua orientação segura, competente e objetiva, mas também por ter me aberto as portas do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP, permitindo-se acesso à sua experiência e aos recursos técnicos imprescindíveis para meu trabalho, assim como pelo seu esforço pessoal na viabilização do projeto de mestrado interinstitucional entre a Universidade de São Paulo e Universidade Estadual de Londrina.

A minha grande amiga e excelente farmacêutica Elaine Apolinário, a quem espero um dia retribuir a inestimável ajuda nos procedimentos experimentais deste trabalho.

A Andréa Lorenzon, futura farmacêutica, pela sua dedicação e grande capacidade técnica, essenciais na realização dos ensaios desenvolvidos neste estudo.

As professoras Edna Maria V. Reiche, Leda Mezzaroba, Dr.^a Primavera Borelli e professor Dr. Décio Sabbatini Barbosa pelos esforços na viabilização do programa de mestrado interinstitucional UEL/USP, com certeza o maior progresso em capacitação docente na história de nosso departamento.

Ao meu amigo de longa data, Ricardo José Rodrigues, docente e médico cardiologista dos hospitais onde este estudo foi realizado, sem o qual tal propósito seria impraticável.

A todos os funcionários do Laboratório de Análises Clínicas e do Setor de Coletas do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná, especialmente aos meus velhos companheiros Airton de Moraes e Luciano da Silveira, que participaram mais constantemente das tarefas realizadas.

À todo o pessoal da Irmandade da Santa Casa de Londrina (ISCAL), principalmente à freira Elvira Maria Pércles Lawand, coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos que, com responsabilidade e serenidade, facilitou sobremaneira meu acesso àquela instituição. Igualmente, à farmacêutica Denise Vicenzi Gomes, responsável pelo laboratório de análises clínicas da ISCAL, assim como a todos os seus funcionários, pela imensa colaboração.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da USP, Kátia K. Yuahashi, Simone Ferderbar, Isabela Rosier O. Pereira e Edimar C. Pereira, que me receberam de braços abertos e tornaram muito confortável minha permanência naquele local. São amigos que deixarão saudades.

À todos os docentes envolvidos com o programa de mestrado interinstitucional, Dr^a. Marina Baquerizo Martines, Dr^a. Primavera Borelli, Dr^a. Rosário Domingues C. Hirata, Dra. Ligia Ferreira Gomes, Dr. Adhemar Longatto Filho, Dr. Raul Cavalcante Maranhão, prof. Ricardo David Couto, prof. Emerson Silva Lima, Dr^a. Hermínia Y. Kanamura, Dr^a. Adelaide José Vas, Dr^a. Roxane M. Fontes Piazza, Dr^a. Ana Campa e Dr^a. Dulcinéia Saes Parra Abdalla, pela sua dedicação e disponibilidade deixando a conveniência de seus locais de trabalho e o conforto de seus lares para contribuir de forma inestimável com nossa formação.

Para toda a "Família Minter", mestrandos Alessandra M. Okino, Maria Emilia Fávero, Sandra Regina Q. Carvalho, Regina Maria B. Quesada, Ingridt H. Vogler, Helena K. Morimoto, Egídio Tesser, Sirlei M. Zanluchi e Emerson D. Cavassin, pelo companheirismo de todas as horas e, especialmente, para minhas companheiras de ladeira Alê e Emilia.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Oxidação da LDL.....	1
1.2 O Processo Aterosclerótico.....	10
1.3 LDL eletronegativa.....	15
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Casuística.....	28
3.2. Coleta de amostras.....	29
3.2.1 Processamento e preservação de amostras.....	30
3.3 Características gerais.....	30
3.4 Determinações bioquímicas.....	31
3.5 Isolamento da LDL por ultracentrifugação.....	32
3.6 Isolamento da LDL⁻.....	33
3.7 ELISA para determinação da LDL⁻.....	34
3.7.1 Sensibilização das microplacas com o anticorpo.....	34
3.7.2 Bloqueio de sítios de ligação livres.....	34
3.7.3 Aplicação das amostras.....	34
3.7.4 Reação com o conjugado.....	34
3.7.5 Reação com o substrato.....	35
3.7.6 Cálculos.....	35
3.8 ELISA para determinação de autoanticorpos anti LDL⁻.....	36
3.8.1 Sensibilização das microplacas com o antígeno.....	36
3.8.2 Bloqueio de sítios de ligação livres.....	36

3.8.3	Aplicação de amostras.....	36
3.8.4	Reação com o conjugado.....	37
3.8.5	Reação com o substrato.....	37
3.8.6	Cálculos.....	37
3.9	Estatística.....	38
4.	RESULTADOS.....	39
5.	DISCUSSÃO.....	52
6.	CONCLUSÃO.....	67
7.	ANEXOS.....	69
	Anexo 1. Características Gerais do Grupo Estudado	
	Anexo 2. Parâmetros Bioquímicos do Grupo Estudado	
	Anexo 3. Perfil Lipídico dos Pacientes com Síndromes Coronárias Agudas (2ª Amostra)	
	Anexo 4. Valores de Referência	
	Anexo 5. Lista de Medicamentos Utilizados pelos Pacientes	
	Anexo 6. Reagentes e Soluções	
	Anexo 7. Método de Lowry para Doseamento de Proteínas	
	Anexo 8. Termo de Consentimento Esclarecido	
	Anexo 9. Relatório	
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Concentrações de LDL ⁻ (µg/ml) nos subgrupos de indivíduos estudados.....	42
Figura 2	Níveis de autoanticorpos anti LDL ⁻ (ABS 405 nm) nos subgrupos de indivíduos estudados.....	43
Figura 3	Correlação entre as concentrações de PCR (mg/l) e níveis de autoanticorpos anti LDL ⁻ (ABS 405 nm) no grupo de indivíduos estudados.....	44
Figura 4	Correlação entre a atividade de CKMB (U/l) e níveis de autoanticorpos anti LDL ⁻ (ABS 405 nm) em indivíduos com infarto agudo do miocárdio.....	44
Figura 5	Correlação entre concentrações de LDL ⁻ (µg/ml) e níveis de autoanticorpos anti LDL ⁻ (ABS 405 nm) no grupo de indivíduos estudados.....	45
Figura 6	Comparação entre níveis de autoanticorpos anti LDL ⁻ (ABS 405 nm) em indivíduos com síndromes coronárias agudas e indivíduos com síndrome coronária crônica.....	46
Figura 7	Comparação dos níveis de autoanticorpos anti LDL ⁻ (ABS 405 nm) entre indivíduos com síndromes coronárias agudas ou crônica usuários e não usuários de estatinas.....	49
Figura 8	Variação das concentrações de LDL ⁻ (µg/ml) e níveis de autoanticorpos anti LDL ⁻ (ABS 405 nm) durante o tempo de evolução (horas) das síndromes coronária agudas.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características Gerais do Grupo Estudado.....	39
Tabela 2	Parâmetros Bioquímicos do Grupo Estudado.....	40
Tabela 3	Valores de r para as Correlações entre LDL ⁻ ou Autoanticorpos Anti LDL ⁻ e Parâmetros Bioquímicos determinados no Grupo Estudado.....	43
Tabela 4	Comparação das Concentrações de LDL ⁻ e dos Níveis de Autoanticorpos Anti LDL ⁻ entre Indivíduos com Síndromes Coronárias Agudas (IAM e AI) e Síndrome Coronária Crônica (AE).....	45
Tabela 5	Comparação entre as Concentrações de LDL ⁻ ou Níveis de Autoanticorpos Anti LDL ⁻ com o Número de Lesões Angiograficamente Detectáveis em Indivíduos Portadores de Síndromes Coronárias Agudas (IAM e AI) ou Crônica (AE).....	47
Tabela 6	Comparação das Concentrações de LDL ⁻ ou dos Níveis de Autoanticorpos Anti LDL ⁻ entre Indivíduos com Síndromes Coronárias Agudas ou Crônica Portadores ou Não Portadores de Fatores de Risco Tradicionais para Aterosclerose.....	48
Tabela 7	Associação do Número de Fatores de Risco com as Concentrações de LDL ⁻ e Níveis de Autoanticorpos Anti LDL ⁻ em Indivíduos com Síndromes Coronárias Agudas e Crônica.....	48
Tabela 8	Comparação das Concentrações de LDL ⁻ e dos Níveis de Autoanticorpos Anti LDL ⁻ entre Indivíduos com Síndromes Coronárias Agudas ou Crônica Usuários ou Não Usuários de Estatinas.....	49
Tabela 9	Concentrações de LDL ⁻ ou Níveis de Autoanticorpos Anti LDL ⁻ em Relação ao Tempo de Evolução das Síndromes Coronárias Agudas.....	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS: 2,2'-azino-bis (ácido 3-etil benzotiazolino-6-sulfônico)

AE: angina estável

AGPI: ácidos graxos poliinsaturados

AI: angina instável

ApoB: apolipoproteína B

AST: aspartato aminotransferase

BHT: hidroxitolueno butilado

C: controle

c-HDL: colesterol-HDL

CKMB: creatinofosfoquinase-fração MB

c-LDL: colesterol-LDL

CPK: creatinofosfoquinase

c-VLDL: colesterol-VLDL

DAC: doença arterial coronária

DMSO: dimetil sulfóxido

EDTA: ácido etileno-diaminotetracético

ERN: espécies reativas do nitrogênio

ERO: espécies reativas do oxigênio

HMG-CoA: β-hidroxi-3-metil glutaril coenzima A

4-HNE: 4-hidroxinonenal

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HO· : radical hidroxila

HOCl: ácido hipocloroso

IAM: infarto agudo do miocárdio

ICAM-1: molécula de adesão intercelular 1

IFN-γ: interferon γ

IL-12: interleucina-12

IL-2: interleucina-2

IL-8: interleucina-8
LDH: lactato desidrogenase
LDL: lipoproteína de baixa densidade
LDL⁻: lipoproteína de baixa densidade eletronegativa
LO[•]: radical alcóxila
LOO[•]: radical peróxila
LOOH: hidroperóxido lipídico
LPA: ácido lisofosfático
LPC: lisofosfatidilcolina
MCP-1: proteína quimiotática para monócitos-1
M-CSF: fator estimulador de colônias de macrófagos
MDA: malondialdeído
MDA-LDL: lipoproteína de baixa densidade modificada pelo MDA
MHC-II: complexo de histocompatibilidade principal-II
MM-LDL: lipoproteína de baixa densidade minimamente modificada
MPO: mieloperoxidase
nLDL: lipoproteína de baixa densidade nativa
NO: óxido nítrico
O₂⁻: ânion superóxido
ONOO⁻: peroxinitrito
Ox-LDL: lipoproteína de baixa densidade oxidada
PAPC: 1-palmitoil-2-aracdonoil-sn-glicerol-3-fosforilcolina
PBS: salina tamponada-fosfato
PCR: proteína C reativa
PEIPC: 1-palmitoil-2-(5,6-epoxyprostanó E2)-sn-glicerol-3-fosforilcolina
PGPC: 1-palmitoil-2-glutaroil-sn-glicerol-3-fosforilcolina
PMSF: fenilmetil sulfonil fluoreto
POVPC: 1-palmitoil-2-oxovaleroil-sn-glicerol-3-fosforilcolina
SCA: síndrome coronária aguda
SCC: síndrome coronária crônica
SOD: enzima superóxido dismutase
TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBS: salina tamponada-TRIS

Th1: célula T helper 1

Th2: célula T helper 2

TNF- α : fator de necrose tumoral- α

TNF- β : fator de necrose tumoral- β

TRIS: (hidroximetil) aminometano

VCAM-1: molécula de adesão da célula vascular 1

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade

RESUMO

Vários estudos têm reconhecido a importância da lipoproteína de baixa densidade oxidada (Ox-LDL) no processo aterosclerótico e suas manifestações clínicas. Neste estudo avaliou-se uma forma de LDL minimamente oxidada denominada LDL eletronegativa (LDL⁻) assim como os autoanticorpos dirigidos contra esta partícula. A LDL⁻, que é caracterizada por alterações conformacionais da ApoB-100, aumento de carga negativa da partícula lipoprotéica e discreta lipoperoxidação, foi estudada juntamente com seus anticorpos através de imunoensaios utilizando anticorpo monoclonal anti-LDL⁻ com o objetivo de monitorar a oxidação da LDL *in vivo*. A presença da LDL⁻ e dos autoanticorpos foi determinada em indivíduos portadores de síndromes coronárias agudas e crônicas correlacionando-se os dados obtidos para esta subfração da LDL com os resultados de ensaios bioquímicos e angiografia coronária, assim como fatores de risco para aterosclerose e uso de estatinas. Os dados obtidos neste estudo poderão elucidar a importância da LDL⁻ como marcador dos eventos clínicos acima citados.

ABSTRACT

Several studies have been recognizing the importance of the oxidized low density lipoprotein (Ox-LDL) in the atherosclerotic process and its clinical manifestations. In this study, a form of minimally oxidized LDL termed electronegative LDL (LDL⁻) was evaluated as well as the autoantibodies driven against this particle. The LDL⁻, that it is characterized by structural alterations of ApoB-100, increased electronegative charge and low grade of lipoperoxidation, and its autoantibodies it was studied through immunoassays using an anti-LDL⁻ monoclonal antibody with the objective of monitoring the oxidation of LDL *in vivo*. The presence of LDL⁻ and anti LDL⁻ antibodies was determined in subjects with acute and chronic coronary syndromes and the obtained data for this LDL subfraction it was correlated with the results of biochemical parameters and coronary angiography, as well as risk factors for atherosclerosis and statins use. The obtained data in this study can elucidate the importance of LDL⁻ as marker of the above mentioned clinical events.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Oxidação da LDL

A aterosclerose tem sido uma das patologias mais estudadas nas últimas décadas e, devido ao número e a complexidade dos eventos envolvidos no seu desenvolvimento assim como a natureza e a extensão de suas conseqüência junto à saúde pública dos países desenvolvidos, deverá continuar como objeto de intensa investigação científica por um longo período de tempo. Trabalhos como o de STEINBERG (1989), LIBBY (1995) e ROSS (1999), entre vários outros, foram de importância fundamental para a reunião de informações que proporcionaram o entendimento atual da aterosclerose como uma doença inflamatória crônica da parede arterial iniciada por alguma forma de agressão ao endotélio (SCHOEN & COTRAN, 2000). Dentro deste conceito, um papel fundamental tem sido atribuído para a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (BERLINER et al., 1995), o qual, apesar de ainda obscuro em alguns pontos, tem colocado a LDL oxidada (Ox-LDL) como participante chave de toda a complexa série de etapas que constituem o processo aterosclerótico (STEINBERG, 1989; NAVAB et al., 1995; STEINBERG, 1997, STEINBERG & WITZTUM, 2002). Deste modo, a LDL oxidada tem se constituído em um importante elo entre as alterações bioquímicas e os eventos celulares e imunológicos que podem resultar nas modificações da parede arterial que dão origem ao ateroma (ROSS, 1999). A evolução de tal processo, geralmente longo e insidioso, pode resultar em síndromes clínicas crônicas como a angina estável (AE) ou agudas como o infarto agudo do miocárdio (IAM) e a angina instável (AI), que são as conseqüências mais dramáticas da aterosclerose (FALK, SHAH & FUSTER, 1995; LIBBY, 1995).

Acredita-se que um dos eventos mais iniciais da aterosclerose seja o acúmulo de LDL na íntima arterial (NAVAB et al.,

1995). Tem sido demonstrado por estudos *in vitro* e *in vivo* que a LDL, principalmente durante a hipercolesterolemia, atravessa facilmente o endotélio arterial e interage com proteínas da matriz extracelular no espaço subendotelial (BERLINER et al., 1995). Como tem sido postulado, isto ocorreria devido a interações complexas entre o componente protéico da LDL, ou seja, a apolipoproteína B (ApoB) e componentes estruturais da parede arterial, como o sulfato de condroitina, que é um proteoglicano constituinte da intrincada rede fibrilar que compõe a matriz extracelular da íntima arterial (ANBER et al., 1997). Além de condições hemodinâmicas e fatores mecânicos que parecem favorecer o acúmulo de LDL em determinados locais (BERLINER et al., 1995), condições intrínsecas da própria LDL, como tamanho reduzido da partícula (PACKARD, CASLAKE & SHEPHERD, 2000), conteúdo de ácido siálico (ANBER et al., 1997) e alterações na conformação da ApoB (URSINI et al., 2002) também poderiam contribuir para a penetração e retenção da LDL na parede arterial. O microambiente da parede arterial parece ser um local propício para alterações oxidativas na LDL, principalmente devido à dificuldade de acesso dos antioxidantes plasmáticos e à exposição prolongada da LDL à ação de células da parede do vaso, como células endoteliais, células de músculo liso e fibroblastos (MERTENS & HOLVOET, 2001). A combinação destes fatores parece ser capaz de modificar a LDL, induzindo vários níveis de oxidação a partir da LDL nativa (nLDL) (SEVANIAN, ASATRYAN & ZIOUZENKOVA, 1999), fazendo com que esta LDL modificada oxidativamente, ao contrário da LDL nativa, adquira propriedades biológicas que a transformam em uma partícula aterogênica com papel fundamental em todo o curso da aterosclerose (STEINBERG, 1997). Várias evidências têm demonstrado a ocorrência da oxidação da LDL *in vivo*: (1) LDL oxidada tem sido demonstrada em homogenatos de lesões ateroscleróticas de coelhos e humanos, (2) anticorpos contra LDL oxidada reagem *in vitro* com epítomos presentes em lesões ateroscleróticas, (3) presença de autoanticorpos anti LDL oxidada foram demonstrados em coelhos e humanos e (4) tratamento

com antioxidantes tem retardado a progressão da aterosclerose em animais (STEINBERG, 1997).

Um grande número de estudos *in vitro* tem mostrado que células presentes na parede arterial (residentes ou recrutadas) têm capacidade de oxidar a LDL e este tem sido considerado o mecanismo mais provável para as modificações que resultam em partículas aterogênicas (URSINI et al., 2002). Algumas das ações exercidas por estas células, que podem resultar em oxidação das lipoproteínas, são: produção de espécies reativas do oxigênio (ERO) e do nitrogênio (ERN), produção de substratos que originam oxidantes, liberação de peroxidase ou compostos com atividade peroxidásica, como grupamentos ferril e perferril, que promovem a propagação da peroxidação lipídica e, por fim, depleção de antioxidantes da própria lipoproteína (STEINBERG, 1997). Tanto a porção lipídica como protéica da LDL podem sofrer a ação destes compostos e a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) dos fosfolipídeos, principalmente na posição sn-2 do esqueleto de glicerol, tem sido uma das alterações estruturais da LDL associadas com o desenvolvimento de propriedades pró-aterogênicas por esta partícula (BERLINER et al., 2001; NAVAB et al., 2002). A oxidação de fosfolipídeos pode dar origem a liso-derivados como a lisofosfatidilcolina (LPC) e o ácido lisofosfatídico (LPA), resultantes da quebra da ligação ester da posição sn-2, ou a produtos mais complexos, como 1-palmitoil-2-oxovaleroil-sn-glicerol-3-fosforilcolina (POVPC), 1-palmitoil-2-glutaroil-sn-glicerol-3-fosforilcolina (PGPC) e 1-palmitoil-2-(5,6-epoxyprostano E2)-sn-glicerol-3-fosforilcolina (PEIPC), que são fosfolipídeos oxidados derivados do 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicerol-3-fosforilcolina (PAPC) (BERLINER et al., 2001; NAVAB et al., 2002). A continuidade do processo de oxidação nos AGPI pode levar à produção de aldeídos altamente reativos como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonal (BERLINER et al., 2001). Alterações da ApoB também ocorrem e, em algumas instâncias, uma reatividade preferencial para as proteínas tem sido descrita e sugerido que modificações da ApoB podem ocorrer mesmo com alterações mínimas dos lipídeos (URSINI et al., 2002).

Entre os vários compostos para os quais têm sido atribuída capacidade de promover a oxidação da LDL, destaque especial tem sido dado para íons metálicos, ERO, ERN, glicose e enzimas como a mieloperoxidase e lipoxigenase, entre outras (BERLINER & HEINECKE, 1996; HAMILTON, 1997; LIMA & ABDALLA, 2001; MERTENS & HOLVOET, 2001). Íons metálicos, como Cu^{2+} ou Fe^{2+} , são mediadores importantes para a oxidação da LDL por células endoteliais *in vitro* (BERLINER & HEINECKE, 1996) e a oxidação dos AGPI resulta na produção de aldeídos reativos como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE) (LIMA & ABDALLA, 2001). Tais compostos podem ligar-se a resíduos de aminoácidos positivamente carregados na ApoB, principalmente lisina, produzindo alterações de carga que resultam em partículas de LDL com carga eletronegativa aumentada. O aumento de cargas negativas é uma característica comum das partículas de LDL modificadas e provocam diminuição da afinidade da lipoproteína pelo seu receptor específico (receptor-LDL) (MERTENS & HOLVOET, 2001) fazendo com que a LDL seja avidamente captada por receptores para LDL oxidada (receptores *scavenger*), que não são regulados por retroalimentação negativa pelo colesterol intracelular (STEINBERG, 1997).

A lipoxigenase é uma enzima citosólica de monócitos, macrófagos e células endoteliais a qual tem sido atribuída capacidade de produzir hidroperóxidos lipídicos (LOOH) a partir da oxidação de AGPI (HALLIWELL et al., 1995; HAMILTON, 1997; LIMA & ABDALLA, 2001, MERTENS & HOLVOET, 2001). Considerando isto, alguns trabalhos têm sugerido que um dos possíveis mecanismos de oxidação da LDL talvez seja a transferência, a partir das células vasculares, de fosfolípidos da membrana celular contendo AGPI oxidados pela lipoxigenase para a lipoproteína (BERLINER & HEINECKE, 1996).

A mieloperoxidase (MPO), por sua vez, é uma enzima secretada juntamente com o peróxido de hidrogênio por neutrófilos e monócitos ativados (MERTENS & HOLVOET, 2001) responsável pela produção de ácido hipocloroso (HOCl) e radicais hidroxila (HO^{\cdot}) que

poderiam reagir com a ApoB da LDL (HAMILTON, 1997) e induzir a formação de LDL com carga eletronegativa aumentada (LDL⁻) (FABJAN et al., 2001). Além disso, lipoproteínas com modificações induzidas pelo HOCL têm sido encontradas nas lesões ateroscleróticas e isto tem sido atribuído à liberação de HOCL por macrófagos contendo MPO presentes nestes locais (HANSON et al., 2002).

A possível participação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) na oxidação da LDL parece ocorrer devido à sua capacidade de iniciar reações em cadeia na LDL nativa, conforme tem sido mostrado por experimentos com inibidores como a superóxido dismutase. No entanto as interpretações destes estudos têm sido controversas (BERLINER & HEINECKE, 1996).

O óxido nítrico (NO) é uma ERN produzida por células endoteliais da parede da artéria e tem importante função regulatória do tônus vascular arterial (BERLINER & HEINECKE, 1996; ALEXANDER & DZAU, 2000). A participação deste radical livre na modificação da LDL é afetada por diversos fatores. Dependendo das condições físico-químicas do microambiente arterial, o NO pode ter atuação deletéria reagindo com o $O_2^{\cdot -}$ e dando origem ao peroxinitrito (ONOO[·]), que se decompõe em radical hidroxila (HO[·]), um potente oxidante, ou interagir com a ceruloplasmina liberando cobre na circulação sanguínea, o que também resulta em efeito pró-oxidante (SHOJI et al., 1999). Por outro lado, o NO também poderia exercer uma função antiaterogênica, neutralizando radicais alcóxila (LO[·]) e peróxila (LOO[·]) e inibindo a lipoperoxidação (MERTENS & HOLVOET, 2001).

A glicose é outro composto que pode participar nas reações de oxidação da LDL, principalmente em diabéticos, onde tem sido associada com a progressão da doença vascular destes indivíduos (HAMILTON, 1997). Tem sido postulado que, além da glicação aumentada da ApoB, a hiperglicemia poderia promover modificações na LDL através do aumento do estresse oxidativo promovido por compostos como cetoaldeídos, radicais livres e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) resultantes da autooxidação da glicose (MORO et al., 1999).

Além da ação de fatores externos como os citados anteriormente, condições intrínsecas da própria LDL, como a concentração reduzida de antioxidantes lipossolúveis e a sua composição lipídica parecem colaborar para o estabelecimento do processo oxidativo. Desta maneira, partículas de LDL ricas em ácidos graxos poliinsaturados são mais facilmente oxidadas do que aquelas que contêm maiores quantidades de ácidos graxos saturados ou monoinsaturados (SEVANI et al., 1996; PACKARD & SHEPHERD, 1997; CHANCHARME et al., 1999; TRIBBLE et al., 2001). O conteúdo preexistente de produtos de peroxidação lipídica também parece colaborar para a susceptibilidade oxidativa da partícula (SEVANI et al., 1996; NAVAB et al., 2002.). LDL minimamente oxidada, isolada do plasma de pacientes com doença arterial coronária (DAC), tem apresentado as seguintes propriedades em relação à LDL nativa: maior mobilidade eletroforética (devido ao aumento da eletronegatividade da partícula), redução nos níveis de araquidonato e de ácido linolêico em 75% e 80% respectivamente, e 60 a 90 substituições lisina-aldeído (MERTENS & HOLVOET, 2001).

A LDL é a principal fonte extracelular de fosfolipídeos (NAVAB et al., 2002) e a sua oxidação, além dos produtos bioativos derivados destes fosfolipídeos (BERLINER et al., 2001; NAVAB et al., 2002), também pode resultar em compostos como hidroperóxidos lipídicos, lisofosfolipídeos (fosfolipídeo depletado em AGPI, como a lisofosfatidilcolina), compostos carbonil e outras moléculas com atividade biológica que têm sido encontradas na fração lipídica do ateroma (BERLINER et al., 2001; LIBBY, RIDKER & MASERI, 2002). Aparentemente, estes produtos de oxidação conferem a esta partícula a capacidade de iniciar e perpetuar um ciclo autoalimentável de oxidação-inflamação, envolvendo de maneira complexa vários componentes bioquímicos, celulares e imunológicos da parede arterial e do sangue (BERLINER et al., 1995, NAVAB et al., 1995; STEINBERG, 1997; ROSS, 1999).

Os tipos de atividade biológica exercidos pela LDL parecem depender de seu estado de oxidação. BERLINER et al., (1995) e NAVAB et al., (1995) postularam que as modificações oxidativas na LDL dentro da parede arterial ocorreriam com intensidade diferente dependendo da presença ou não de monócitos/macrófagos recrutados da circulação. No primeiro caso, as modificações da LDL seriam provocadas apenas pelas ERO liberadas por células residentes da parede arterial (NAPOLI & LERMAN, 2001) e não seriam suficientes para comprometer estruturalmente a ApoB, dando origem a um tipo de LDL que tem sido considerada minimamente ou moderadamente modificada. Apesar desta característica, esta partícula foi capaz de ativar células endoteliais, o que resultou na produção de moléculas quimiotáticas e de adesão para monócitos/macrófagos e várias citocinas (NAVAB et al., 1995; NAPOLI & LERMAN, 2001). De fato, para reproduzir a oxidação da LDL com maior similaridade aos prováveis processos *in vivo*, um tipo de LDL com modificações oxidativas mínimas tem sido produzida *in vitro* através de incubação de LDL com células endoteliais, hemoproteínas, mieloperoxidase, lipase (URSINI et al., 2002) ou cobre (YOSHIDA et al., 1998). As partículas resultantes destes procedimentos têm sido constantemente referidas como MM-LDL, ou seja, LDL minimamente modificada (CAZZOLATO, AVOGARO & BITTOLO-BOM, 1991; STEINBERG, 1997). A MM-LDL tem demonstrado uma série de efeitos considerados aterogênicos, como as induções de molécula de adesão de células vasculares (VCAM), molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1), E-Selectina, interleucina 8 (IL-8), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), P-Selectina e MPO, entre outros (BERLINER et al., 1995; NAVAB et al., 1995; De CASTELARNAU et al., 2000; BERLINER et al., 2001; MERTENS & HOLVOET, 2001; NAVAB et al., 2002). Fosfolípidos oxidados derivados do PAPC, como o POVPC, PGPC e PEIPC têm sido relacionados de forma importante com as propriedades pró-inflamatórias da MM-LDL (NAVAB et al., 2002) e a sua ação parece estar associada ao fator de transcrição receptor- α do proliferador ativado do peroxissoma (PPAR- α)

(BERLINER et al., 2001; NAVAB et al., 2002). Produtos mais simples como a lisofosfatidilcolina e o ácido lisofosfático também foram associados à receptores celulares para fosfolipídeos oxidados (BERLINER et al., 2001).

A etapa mais severa de oxidação da LDL parece ter início após a entrada dos monócitos na parede arterial e sua posterior diferenciação em macrófagos. Neste novo ambiente parece ocorrer um aumento dramático na liberação de ERO pelos macrófagos ativados, provocando um grande aumento do potencial oxidativo local que resulta em oxidação adicional da LDL e alterações da ApoB (STEINBERG et al., 1989, BERLINER et al., 1995; STEINBERG; 1997). Uma das principais conseqüências deste processo, resultante da oxidação de AGPI dos ésteres de colesterol, fosfolipídeos e triacilgliceróis, têm sido mostrado ser a formação de MDA e 4-HNE. Como citado anteriormente, estes aldeídos interagem com grupamentos amina positivamente carregados em resíduos de lisina da ApoB, provocando alteração estruturais e funcionais na proteína. Além destes, a formação de outros produtos de oxidação, como óxidos de colesterol, também têm sido identificados (STEINBERG, 1997). Devido a estas alterações nos lipídeos e na ApoB, acredita-se que ocorra uma amplificação das propriedades aterogênicas da LDL, tais como: quimioatração e localização tecidual de monócitos/macrófagos, inibição da vasodilatação induzida pelo NO, estimulação mitogênica para macrófagos e células de músculo liso, indução da produção de proteína quimiotática para monócitos 1 (MCP-1) e fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) por células endoteliais. Além disso, tem sido demonstrado que as alterações oxidativas da LDL resultam no seu reconhecimento por receptores *scavenger* de macrófagos e células de músculo liso. Como citado anteriormente, estes tipos de receptores não são modulados por retroalimentação negativa do colesterol intracelular permitindo a rápida interiorização e o acúmulo de ésteres de colesterol na célula, o que pode dar origem às células espumosas (BERLINER & HEINECKE, 1996, STEINBERG, 1997; HANSSON, 2001;). Além de lipoproteínas modificadas, receptores *scavenger* como SRA I e II, CD36, SR-PSOX, LOX-1, MARCO e

CD68 (macrosialina) demonstraram reconhecer motivos estruturais compartilhados por uma grande variedade de macromoléculas microbianas e células apoptóticas (HANSON et al., 2002).

Outra propriedade atribuída à LDL oxidada é a sua capacidade de atrair células T (HANSSON, 2001). Entre 10 a 20% das células encontradas em lesões ateroscleróticas humanas avançadas têm sido identificadas como células T (HANSON et al., 2002) e aproximadamente 2/3 destas foram classificadas como células T do subtipo T-helper (Th1). Os fatores responsáveis pelo direcionamento da diferenciação celular para o eixo Th1 aparentemente envolvem as produções de interleucina-12 (IL-12), que inibe a resposta do tipo Th2, osteopontina (também chamada proteína inicial de ativação do linfócito T-1) e IL-8 pelas células presentes na lesão, além da participação de lipoproteínas modificadas que atuam como autoantígenos (HANSON, 2001; HANSON et al., 2002). Por sua vez, as células Th1 secretam interferon- γ (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) e β (TNF- β) causando ativação de macrófagos, ativação vascular e inflamação (HANSSON, 2001). Além disso, como as células Th1 reconhecem proteínas antigênicas apresentadas via complexo principal de histocompatibilidade-II (MHC-II) de macrófagos, a LDL oxidada também poderia atuar como autoantígeno induzindo o tipo de resposta imune que tem sido associada à aterosclerose (ROSS, 1999; HANSSON, 2001; HANSON et al., 2002). Considerando que a resposta imune dirigida à LDL oxidada *in vivo* parece ser complexa e depender da fase da doença, o seu caráter pró-aterogênico ou antiaterogênico ainda não foi estabelecido (SHOENFELD et al., 2000). Outras células que têm sido encontradas na placa aterosclerótica são linfócitos T do subtipo CD8, linfócitos B, células dendríticas, que são células especializadas na apresentação de antígenos, e mastócitos (HANSSON, 2001; HANSON et al., 2002).

1.2 O Processo Aterosclerótico

A combinação dos eventos bioquímicos e celulares descritos resulta na formação da estria gordurosa. A estria gordurosa, que é uma lesão puramente inflamatória (ROSS, 1999), é formada principalmente pelo acúmulo de células espumosas de macrófagos e também de células T que migram para a região subendotelial e dão origem a esta lesão, considerada a mais inicial da aterosclerose. Posteriormente, em um processo mediado pela própria LDL oxidada, por fatores de crescimento, interleucinas e citocinas, produzidas pelas células participantes da lesão, tem início uma seqüência de eventos envolvendo migração, proliferação e síntese de matriz extracelular por células de musculares lisas “ativadas” atraídas para a íntima, o que resulta em progressão da lesão (BERLINER & HEINECKE, 1996; ROSS, 1999; SCHOEN & COTRAN, 2000). Tem sido postulado que tal processo inicia uma etapa importante na patogênese da placa que é a formação da cápsula fibrosa, que é constituída basicamente de células de músculo liso e matriz extracelular (SCHOEN & COTRAN, 2000).

Com a evolução da lesão, esta estrutura fibromuscular irá recobrir a região mais interna da placa denominada centro necrótico, centro lipídico, ou centro ateromatoso da lesão, que é formado principalmente por lipídeos extracelulares altamente oxidados, como óxidos de colesterol, por células espumosas e células T em menor quantidade (DAVIES, 1996). Acredita-se que estes lipídeos sejam liberados por células espumosas mortas, cujo apoptose ou necrose foi estimulada por lipídeos oxidados citotóxicos e seus derivados, como óxidos de colesterol e 4-HNE (FALK, SHAH & FUSTER, 1995; BERLINER & HEINECKE, 1996). Além destes, pelo menos uma parte dos lipídeos do centro parece ser formada de lipídeos ligados ao fibrinogênio e a proteoglicanos que ainda não foram processados pelos macrófagos (DAVIES, 1996). O tamanho e a consistência do centro necrótico parecem estar relacionados com a vulnerabilidade da placa, sendo que aquelas placas com centro lipídico ocupando mais de 40% da área da

lesão foram consideradas particularmente sujeitas à ruptura (FALK, SHAH & FUSTER, 1995).

A cápsula fibrosa tem o papel fundamental de garantir a estabilidade da placa e impedir o contato entre o sangue circulante e o centro lipídico, altamente trombogênico, da lesão. Assim, a sua estrutura deve ser capaz de suportar o estresse mecânico ao qual a parede da artéria está constantemente submetida devido ao seu formato circular e à pressão sanguínea. Para que isto ocorra, a cápsula deve manter a sua integridade estrutural, que depende fundamentalmente do balanço favorável entre a produção e degradação do colágeno que é sintetizado, principalmente, pelas células de músculo liso, para a manutenção da matriz extracelular (FALK, SHAH & FUSTER, 1995, LIBBY, 2001). A atividade de células presentes na lesão e a ação de mediadores inflamatórios como o IFN- γ , sintetizado por células T, assim como o TNF- α e a IL-1 sintetizada por macrófagos, podem diminuir a síntese de colágeno, inibir a proliferação de células de músculo liso e células endoteliais (LIBBY, 1995; ROSS, 1999; HANSSON, 2001, LIBBY, 2001), estimular a produção de enzimas que degradam a matriz extracelular, como as metaloproteinases (LIBBY, 1995, LIBBY, 2001;) e induzir a apoptose de células de músculo liso (HANSON et al., 2002). Além disso, a digestão de matriz extracelular devido a produção de proteases por mastócitos encontrados na placa aterosclerótica, também tem sido relatada (HANSON et al., 2002). A ação combinada destes vários fatores pode provocar o enfraquecimento da cápsula fibrosa e comprometer a sua função protetora sobre o centro lipídico da lesão, tornando a placa mais vulnerável ao estresse mecânico provocado pelos fatores hemodinâmicos (BUJA & WILLERSON, 1994; LIBBY, 2001). Nestas condições, a placa poderia sofrer ruptura, principalmente na região do “ombro” (isto é, a junção lateral entre a placa e a região adjacente menos afetada do vaso), que é um local de menor resistência onde a cápsula fibrosa é menos espessa, com poucas células de músculo liso e grande infiltração de macrófagos e células T (FALK, SHAH & FUSTER, 1995; LIBBY, 1995; ZAMAN et al., 2000). O IFN- γ sintetizado pelas células T estimula a produção de TNF- α e IL-1 por

macrófagos que, por sua vez, induzem a síntese de IL-6 nas células de músculo liso. Esta última interleucina atua sobre os hepatócitos incrementando a produção de proteínas de fase aguda, principalmente a PCR, que juntamente com a IL-6 tem sido associada à atividade inflamatória das placas ateroscleróticas instáveis (ROSS, 1999; HANSSON, 2001). A ruptura de placas instáveis, onde a participação de mecanismos de ativação imunes e inflamatórios parecem fundamentais, pode dar origem à trombose associada às síndromes clínicas da aterosclerose, principalmente infarto agudo do miocárdio e angina instável (BERLINER & HEINECKE, 1996; SCHOEN & COTRAN, 2000, HANSSON, 2001).

Apesar da ruptura franca da placa ser reconhecida como a principal causa da trombose, a erosão endotelial, provocada pelos mesmos fatores que levam à primeira situação, também podem provocar formação de trombos devido à exposição de colágeno assim como de fator tecidual, que é um potente indutor da coagulação (LIBBY, 2001) constituído principalmente por fosfatidilserina exposta na superfície de células endoteliais vasculares e macrófagos apoptóticos (ZAMAN et al., 2000; LIBBY, RIDKER & MASERI, 2002). Tem sido relatado que este tipo de evento geralmente ocorre em placas que produzem alto grau de estenose e estão mais associadas com as síndromes crônicas da aterosclerose (LIBBY, 1995; DAVIES, 1996). Ao contrário, a ruptura franca da cápsula parece ocorrer em placas ateroscleróticas que produzem estenose menor que 50% sobre o diâmetro interno do vaso e tem sido mais relacionadas aos eventos clínicos agudos da aterosclerose, como angina instável e infarto agudo do miocárdio (LIBBY, 1995; ZAMAN et al., 2000). Neste caso, o trombo é formado pelo sangue do lúmen arterial que penetra através da cápsula rompida e entra em contato com o colágeno e fator tecidual do centro da lesão (DAVIES, 1996). O tipo e as conseqüências do trombo formado parecem depender, entre outros fatores, da extensão da ruptura, grau de estenose, tipo e local do vaso afetado, velocidade do fluxo sanguíneo e o equilíbrio entre outros fatores trombogênicos e fibrinolíticos (DAVIES, 1996; SHOENFELD et al., 2000; LIBBY, 2001).

Dependendo de sua localização, o trombo tem sido classificado como intraplaca, quando contido dentro da lesão, transicional/mural, quando formado na região de transição entre a placa e o lúmen do vaso e intraluminal ocludente, quando se projeta bloqueando a luz do vaso (DAVIES, 1996). Dependendo das condições citadas anteriormente, os trombos podem evoluir de várias maneiras. Estudos têm revelado que nos casos onde o trombo é reabsorvido, produtos associados como a trombina e mediadores plaquetários poderiam aumentar o acúmulo de colágeno e a proliferação de células de músculo liso no local, resultando em lesões avançadas com fibrose e calcificação. Este tipo de lesão crônica tem sido associado com o desenvolvimento da angina estável, que é uma síndrome coronária crônica. Por outro lado, condições que permitem a formação de trombos oclusivos podem levar à isquemia severa que origina as síndromes coronárias agudas, isto é infarto agudo do miocárdio e angina instável (LIBBY, 2001).

Atualmente dois sistemas de classificação têm sido utilizados para o estudo do processo aterosclerótico. A classificação de Stary (ZAMAN et al., 2000) e a classificação estabelecida pelo Comitê de Lesões Vasculares da Associação Americana do Coração (FUSTER, 1995; ZAMAN et al., 2000). A classificação de Stary é baseada em um estudo morfológico do desenvolvimento da placa e categoriza a lesão aterosclerótica em oito tipos. A lesão tipo I (Stary I) é aquela constituída somente por células espumosas derivadas de macrófagos ou monócitos isoladas, que são microscopicamente ou quimicamente demonstráveis. A lesão tipo II (Stary II) é caracterizada pelas estrias gordurosas, que já são macroscopicamente visíveis. A lesão tipo III (Stary III) é compatível com o acúmulo inicial de lipídeos extracelulares e formação de uma camada íntima mais pronunciada. O aumento da quantidade de lipídeos extracelulares, que resulta na formação do centro lipídico, caracteriza a lesão tipo IV (Stary IV). Na lesão tipo V (Stary V) são observadas migração e proliferação das células musculares lisas que vão dar origem à cápsula fibrosa. A lesão neste estágio também é conhecida como fibroateroma. À medida que o processo evolui,

hemorragia e formação de trombos podem tornar a lesão mais complexa ou complicada levando-a à classificação de lesão tipo VI (Stary VI). A posterior mineralização (calcificação), resulta em lesões do tipo VII (Stary VII) e, finalmente, em sua fase final de evolução, as lesões constituídas quase que inteiramente por colágeno fibrótico são referidas como do tipo VIII (Stary VIII) (ZAMAN et al., 2000).

Por sua vez, baseado na classificação de Stary a Associação Americana do Coração tem classificado o processo aterosclerótico em cinco fases. A fase 1, que é atribuída à pequenas lesões, geralmente observadas em indivíduos com menos de trinta anos de idade, é subdividida em três tipos. O tipo I é caracterizado pela presença de células espumosas derivada de macrófagos, o tipo II contém ambos macrófagos e células musculares lisas com depósitos de lipídeos extracelulares e o tipo III já demonstra o acúmulo de matriz extracelular e depósitos de lipídeos. A fase 2 indica placas não necessariamente estenóticas, mas propensas ao rompimento devido ao seu alto conteúdo lipídico, e da mesma maneira que na fase anterior, têm sido subdividida em tipos IV e Va. O tipo IV diz respeito a lesões celulares confluentes com grande acúmulo de lipídeos extracelulares associados a tecido fibroso, enquanto que o tipo Va mostra uma fina cápsula fibrosa recobrimdo um centro lipídico. A fase 3 tem sido considerada uma lesão do tipo VI (Stary VI) complicada, como resultado de uma ruptura ou fissura da placa, ou da formação de um trombo mural que pode não ocluir totalmente a artéria. Quando tal processo, ou seja, a complicação da lesão tipo VI, produz trombos oclusivos que provocam síndromes coronárias agudas, tem-se a fase 4. Finalmente, as mudanças na geometria da placa e a organização do trombo mural por tecido conectivo, que resultam em trombo fibrótico e altamente estenótico, caracterizam a fase V do processo (FUSTER, 1995; ZAMAN et al., 2000).

1.3 LDL eletronegativa (LDL⁻)

A síndromes coronárias citadas acima se constituem no desfecho de um roteiro onde uma das principais atuações têm sido atribuída à LDL oxidada (STEINBERG et al., 1989; STEINBERG, 1997; EHARA et al., 2001). No entanto, apesar de todas as evidências demonstradas experimentalmente, ainda existem controvérsias sobre a existência e a origem de uma forma de LDL “totalmente” oxidada na circulação sanguínea (TSIMIKAS & WITZTUM, 2001). O fato de normalmente não se encontrar LDL circulante com alterações de oxidação é atribuído à presença protetora de antioxidantes hidrossolúveis do plasma e também à própria estrutura e antigenicidade da LDL oxidada, que promoveriam a sua rápida remoção do plasma via receptores *scavenger* de macrófagos do sistema reticuloendotelial, principalmente no fígado (células de kupffer) e baço, e pela ação de anticorpos que poderiam formar imunocomplexos com a LDL oxidada facilitando a sua depuração (HOLVOET & COLLEN, 1998; PARTHASARATHY, SANTANAN & AUGÉ, 1998; TSIMIKAS & WITZTUM, 2001). No entanto, parece possível que partículas de LDL minimamente modificadas possam estar presentes na circulação sanguínea (PARTHASARATHY, SANTANAN & AUGÉ, 1998) considerando-se que, devido ao seu baixo nível de modificação, ainda não seria reconhecida pelos receptores *scavenger* de macrófagos (TSIMIKAS & WITZTUM, 2001). STEINBERG, (1997) também tem postulado que partículas de LDL com modificações oxidativas mínimas, onde as alterações da ApoB são suficientes para diminuir o seu reconhecimento por receptores LDL mas incapazes de torná-la um ligante de receptores *scavenger*, poderiam ter um tempo de vida maior que a LDL nativa, o que resultaria no aumento de sua concentração plasmática (STEINBERG, 1997). De fato, vários estudos identificaram um tipo de LDL com modificações mínimas circulante no plasma humano e de animais através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por eletroforese e têm sido consensuais quanto às suas características de carga eletronegativa aumentada, maior mobilidade

eletroforética, capacidade citotóxica e atividade proinflamatória (HODIS et al., 1994; AVOGARO, BITTOLO-BON & CAZZOLATO, 1988; DEMUTH et al., 1996; CHANG, ABDALLA & SEVANIAN, 1996; SEVANIAN et al., 1996; SEVANIAN et al., 1997; SANCHEZ-QUEZADA et al., 2002). Devido à sua eletronegatividade, esta subfração tem sido denominada LDL eletronegativa (LDL⁻).

Trabalhos com diversos tipos de delineamento têm estudado a LDL⁻ tanto no plasma humano como de animais e, provavelmente devido à variedade de procedimentos adotados, algumas das conclusões apresentadas têm sido diferentes, quando não conflitantes. CAZZOLATO, AVOGARO & BITTOLO-BON, (1991) relataram que a porcentagem de LDL⁻ em relação à LDL total variou entre 0,5 a 9,8% no plasma de indivíduos com colesterol total e triacilgliceróis não elevados e não se correlacionaram em termos relativos com o colesterol total, triacilgliceróis ou colesterol-LDL (c-LDL) plasmáticos. Porém, de acordo com SEVANIAN et al., (1996), as quantidades absolutas de LDL⁻ são relacionadas com os níveis plasmáticos de c-LDL, o que sugere que as concentrações de LDL⁻ devem ser maiores em indivíduos hipercolesterolêmicos. URSINI et al., (2002) têm igualmente relatado que apesar da porcentagem de LDL⁻ no plasma humano ter variado entre 0.1 a 5% esta poderia se elevar em situações que aumentam a LDL total, como a hipercolesterolemia e diabetes mellitus tipo 2. De fato, tais condições parecem estar associadas de maneira importante à LDL⁻, considerando que a hipercolesterolemia parece potencializar as propriedades pró-inflamatórias da LDL⁻ (SANCHEZ-QUEZADA et al., 2002) e o diabetes mellitus tem sido mostrado favorecer a produção aumentada de LDL⁻ por mecanismos envolvendo tanto oxidação como glicação da LDL (MORO et al., 1999).

A caracterização química da LDL⁻ também tem gerado certa controvérsia, o que, como citado, poderia ser explicado pelas diferenças nos procedimentos experimentais utilizados. DEMUTH et al., (1996) estudaram a LDL⁻ em plasma humano e descreveram esta partícula como uma pequena fração da LDL total ($6,7 \pm 0,9\%$) com alterações da ApoB e com poucas

evidências de peroxidação lipídica em relação à LDL nativa, considerando seu conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e dienos conjugados, que são indicadores daquele processo. Por outro lado, outros estudos comparando a LDL⁻ com a LDL nativa no plasma de animais e humanos hipercolesterolêmicos têm demonstrado a presença aumentada de TBARS , dienos conjugados, óxidos de colesterol e hidroperóxidos lipídicos na primeira, indicando, além de uma possível origem oxidativa, uma maior susceptibilidade à oxidação da primeira em relação à segunda (CAZZOLATO, AVOGARO & BITTOLO-BOM, 1991; HODIS et al., 1994; CHANG, ABDALLA & SEVANIAN, 1996; SEVANIAN et al., 1996; SEVANIAN et al., 1997). Em uma revisão de vários trabalhos comparando a LDL⁻ com a LDL nativa, SEVANIAN, ASATRYAN & ZIOUZENKOVA, (1999) mostraram que alguns destes estudos têm concordado em caracterizar a LDL⁻ como uma partícula com níveis aumentados de TBARS e dienos conjugado e diminuídos para a vitamina E (α -Tocoferol) e ácido araquidônico. Além disso, aumentos na susceptibilidade oxidativa e no conteúdo de peróxidos lipídicos assim como diminuição dos fosfolídeos e da interação com receptor LDL também foram relatados em estudos isolados. O teor de ácido siálico da LDL⁻, que também tem sido associado à aterogenicidade (TERTOV et al., 1998), produziu conclusões controversas, e foi relatado aumentado (DEMUTH et al., 1996; SEVANIAN, ASATRYAN & ZIOUZENKOVA, 1999) ou diminuído (HODIS et al., 1994). A maior citotoxicidade para células endoteliais em relação às subfrações mais positivamente carregadas tem sido uma propriedade da LDL⁻ que parece ser de consenso entre vários estudos, e tem sido avaliada *in vitro* baseado na sobrevivência de células em cultivos (HODIS et al., 1994); liberação de LDH citoplasmática, internalização de corantes e estudos morfológicos de células endoteliais (DEMUTH et al., 1996).

A LDL plasmática é constituída por um grupo heterogêneo de partículas com densidade variando entre 1,019 a 1,063 g/ml e a LDL⁻ tem sido associada às subfrações mais densas da LDL, sendo encontrada principalmente junto às subfrações > 1,045 g/ml e chegando a

aproximadamente 20% naquelas com densidade $> 1,050$ g/ml (SEVANIYAN et al., 1996). Além disso, a LDL⁻ têm demonstrando características químicas similares àquelas atribuídas às subfrações densas da LDL (SEVANIYAN, ASATRYAN & ZIOUZENKOVA, 1999). De fato, as subfrações contendo LDL pequena e densas (diâmetro $\leq 25,64$ nm) têm sido consideradas mais aterogênicas do que aquelas maiores e menos densas (LAMARCHE et al., 1997) e o seu estudo demonstra um valor preditivo para a progressão da aterosclerose mais significativo do que a LDL total (SEVANIYAN, ASATRYAN & ZIOUZENKOVA, 1999). Tal potencial aterogênico aumentado tem sido relacionado às particularidades estruturais e químicas que parecem conferir maior susceptibilidade oxidativa à LDL pequena e densa (CHAPPEY et al. 1995; GRUNDY, 1997; KRAUSS, 1998; CHANCHARME et al., 1999; PACKARD; CASLAKE & SHEPHERD, 2000; TRIBBLE et al., 2001). As vias metabólicas que resultam na produção desta subclasse de LDL parecem estar associadas com a presença de níveis limitrofes ou moderadamente elevados de triacilgliceróis plasmáticos. Estas condições têm sido mostradas favorecerem o acúmulo de uma subclasse de VLDL, denominada VLDL₁, que são precursores do *pool* β de LDL, um grupo de partículas com catabolismo (via receptor LDL) mais lento e que aparentemente dão origem à LDL pequena e densa (CHAPMAN & BRUCKERT, 1996; PACKARD & SHEPHERD, 1997; PACKARD, CASLAKE & SHEPHERD, 2000). É interessante notar que a associação entre triacilgliceróis e este fenótipo lipoprotéico aterogênico tem evidenciado a utilidade deste lipídeo como marcador de risco para a doença arterial coronária, apesar do seu papel como fator causal da doença ainda não estar totalmente estabelecido (GRUNDY, 1998).

Considerando o potencial aterogênico da LDL pequena e densa e associação da LDL⁻ com estas subclasses de lipoproteínas, SEVANIYAN et al., (1996) têm relatado que a resistência da LDL total à oxidação diminui à medida que aumenta a proporção de LDL⁻ em relação à LDL nativa. De fato, experimentos *in vitro* realizados por NAVAB et al., (2002) têm sugerido que, para ser oxidada pelas células endoteliais

vasculares, a LDL circulante necessita de um pré-condicionamento que é dependente da presença de determinadas quantidades de espécies reativas do oxigênio na lipoproteína, sem as quais o processo oxidativo e conseqüentemente a indução da inflamação não seriam iniciados. Estes autores têm proposto que a LDL⁻ contemplaria estes requisitos e poderia representar uma classe de LDL circulante pré-condicionada para a oxidação. Em concordância, SEVANIAN et al., (1996) relataram previamente que a LDL⁻ poderia conter níveis de peróxidos suficientes para exceder o limiar requerido para a propagação catalítica da peroxidação lipídica e que, posteriormente, em interações ocorridas principalmente nos espaços extravasculares, poderiam existir transferências de peróxidos lipídicos ou radicais livres da LDL⁻ para a LDL nativa resultando em oxidação desta última.

Os sítios de produção e o(s) mecanismo(s) de formação da LDL⁻ ainda são incertos. CAZZOLATO, AVOGARO & BITTOLO-BOM, (1991) indicaram que a origem da LDL⁻ plasmática poderia envolver processos tão diversos como variação genética, contato prolongado com células endoteliais, captação de pequenas quantidades de malondialdeído e tráfego reverso a partir da íntima. DEMUTH et al., (1996) têm igualmente postulado que a LDL⁻ poderia sofrer tráfego reverso da parede arterial para a circulação, sendo então detectada como uma forma circulante de LDL modificada. HODIS et al., (1994) e GREILBERGER et al., (1999) consideraram possível que a LDL⁻ tenha origem plasmática ou na parede arterial, mas têm apontado como mais provável a segunda possibilidade, considerando a maior exposição da LDL à ação deletéria das células vasculares. De fato, várias hipóteses têm surgido em relação aos locais que favoreceriam modificações oxidativas da LDL. Estas hipóteses têm proposto que tais processos poderiam ocorrer em sítios com depleção de antioxidantes hidrossolúveis, como as extremidades de capilares sanguíneos, devido ao acúmulo de "lixo" oxidativo celular, ou em microambientes formados nos espaços existentes entre o endotélio vascular e macrófagos aderidos (STEINBERG, 1997; GREILBERGER et al., 1999).

LDL oxidativamente modificada também foi postulada ser liberada na circulação por macrófagos originários da região subendotelial das estrias gordurosa (GREILBERGER et al., 1999). A formação de LDL⁻ no plasma a partir da reação da LDL com hemoglobina liberada pela hemólise devido a imunoreações durante infecções também tem sido considerada (GREILBERGER et al., 1999). SEVANI, ASATRYAN & ZIOUZENKOVA, (1999) sugeriram que a produção de LDL⁻ poderia envolver uma via principal de formação, através da peroxidação lipídica da LDL, e também vias alternativas, onde a LDL⁻ seria formada por alterações da ApoB devido a glicação, oxidação direta de aminoácidos e reações com radicais livres de proteínas, como radicais hemoglobina. Além da oxidação e glicação SÁNCHEZ-QUESADA et al., (1999) também têm citado a depleção de ácido siálico como provável mecanismo de produção de LDL⁻. Outro mecanismo que têm sido proposto para a produção de LDL⁻ envolve a autooxidação da LDL⁻, que poderia ocorrer principalmente durante a hipercolesterolemia onde a razão lipídeos/antioxidantes lipossolúveis (principalmente o α -tocoferol) na partícula é alta e a ação dos antioxidantes seria insuficiente para evitar a oxidação (HODIS et al., 1994; GREILBERGER et al., 1999).

Com respeito ao relacionamento entre a estrutura da LDL e sua oxidabilidade, SEVANI & URSINI, (2000) relataram que as mudanças conformacionais da ApoB da LDL⁻ são suficientes para diminuir a sua capacidade de ligação com receptores LDL e resultam no acúmulo e instabilidade de peróxidos lipídicos no centro da partícula devido ao seu tempo de vida mais prolongado. Estas quantidades mínimas de peróxidos, produzidas nos estágios iniciais da oxidação, poderiam alterar o "empacotamento" dos lipídeos de superfície da partícula modificando a hidratação local e as interações com a ApoB e levar às alterações da estrutura secundária da apoproteína, que são similares àquelas observadas em MM-LDL induzida *in vitro*. Experimentos *in vitro* têm mostrado que as alterações estruturais causadas na LDL⁻ pelo acúmulo de LOOH e lisofosfolipídeos provocam maior penetração de água na monocamada lipídica da lipoproteína e isto gera aumento de polaridade e da inserção da

ApoB no centro lipídico (PARASSASI et al., 2001). URSINI et al., (2002) sugeriram que as alterações conformacionais encontradas na ApoB da LDL⁻ parecem não depender de peroxidação lipídica severa da partícula e poderiam ocorrer mesmo na presença de níveis mínimos de oxidação. Estas alterações aparentemente contribuem para tornar a LDL⁻ *in vivo* uma partícula mais susceptível à oxidação quando retida no espaço subendotelial e, uma vez neste local, esta lipoproteína parece exercer seus efeitos citotóxicos e pró-inflamatórios. NAVAB et al., (2002) têm relatado que tais efeitos seriam mediados através da liberação de derivados bioativos, principalmente de fosfolípidos oxidados.

Vários autores têm definido a LDL⁻ como a contrapartida *in vivo* da MM-LDL produzida *in vitro*, devido ao fato de compartilharem várias características biológicas e químicas (CAZZOLATO, AVOGARO & BITTOLO-BOM, 1991; STEINBERG, 1997; HOLVOET & COLLEN, 1998; GREILBERGER et al., 1999; SANCHEZ-QUEZADA et al., 2002). Entre estas características comuns, têm sido relatado que a LDL⁻ possui fosfolípidos oxidados pró-inflamatórios similares àqueles que foram isolados na MM-LDL (SEVANI, ASATRYAN & ZIOUZENKOVA, 1999). Como citado anteriormente, tais compostos incluem a lisofosfatidilcolina, o ácido lisofosfático, derivados do PAPC como o POPVC, PCPC, PEIPC e lípidos semelhantes ao fator ativador de plaquetas (PAF-like) (BERLINER et al., 2001; MERTENS & HOLVOET, 2001). Diversos trabalhos têm relatado a presença destes produtos durante praticamente todas as etapas da aterogênese, provocando efeitos tão diversos como a indução de VCAM, ICAM, E-Selectinas, M-CFS, MCP-1 e IL-8 pelas células endoteliais, enzimas como a fosfolipase A₂ secretória (sPLA₂), metaloproteinases e MPO, estimulação da via das lipoxigenases, diminuição da atividade da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), promoção da síntese dos receptores *scavenger* CD68 e CD36, aumento da atividade pró-coagulante de macrófagos e calcificação vascular (PARHAMI et al., 1993; BERLINER et al., 2001; SANCHEZ-QUEZADA et al., 2002). YOSHIDA et al., (1998) relataram que partículas de LDL minimamente oxidada presentes na íntima,

resultantes da ação de células endoteliais e células de músculo liso sobre a LDL nativa, estão especialmente associadas com a quimioatração de monócitos enquanto que a LDL “totalmente” oxidada estaria mais relacionada à adesividade destas células. Além disso, estes autores também relataram que a LDL minimamente oxidada foi mais eficiente que LDL oxidada em induzir a expressão de receptores *scavenger* em macrófagos. Os efeitos resultantes da ação de partículas de LDL minimamente oxidadas via derivados bioativos têm sido associados com várias reações de sinalização intracelular envolvendo a estimulação de proteínas G, ativação da adenilato ciclase, aumento da produção de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e da atividade da fosfoquinase A (PKA), ativação do fator nuclear kappa-B (NFκ-B) e do fator de transcrição PPAR-α (PARHAMI et al., 1993, NAVAB et al., 2002). Considerando que a LDL^o aparentemente representa uma forma de LDL minimamente oxidada circulante, têm sido hipotetizado que o endotélio poderia sofrer indução pró-inflamatória diretamente a partir do plasma (SANCHEZ-QUEZADA et al., 2002).

Além dos efeitos citados anteriormente, a oxidação de fosfolipídeos também pode dar origem a aldeídos reativos. Alterações da ApoB pelas ligações com aldeídos reativos tornam a LDL uma partícula mais imunogênica (BUI et al., 1996). Como citado anteriormente, as interações entre MDA ou 4-HNE com aminoácidos positivamente carregados da ApoB, principalmente lisina, resultam em novos epítopos, os quais têm sido denominados epítopos específicos de oxidação (HORKKO et al., 1996; GREILBERGER et al., 1999). De fato, SEVANI et al., (1997) observaram uma diminuição de mais de 40% nos grupamento amina livres na ApoB da LDL^o.

Quando a LDL se torna mais extensamente oxidada, seus epítopos induzem a produção de autoanticorpos anti LDL oxidada (PALINSKI. et al, 1990; SHOENFELD et al., 2000; SHERER et al., 2001). Vários estudos, utilizando anticorpos anti LDL modificada pelo malondialdeído (MDA-LDL), têm mostrado uma relação positiva entre títulos de anticorpos anti LDL oxidada com as síndromes coronárias agudas e a

doença arterial coronária pós-transplante cardíaco (BUI et al., 1996; HOLVOET, 1998; HOLVOET et al. 1998; INOUE et al. .2001), assim como associado o aumento dos títulos destes anticorpos com a instabilidade de placas ateroscleróticas (INOUE. et al. .2001). No entanto, o caráter pró ou antiaterogênico destes anticorpos ainda não está totalmente estabelecido (SHOENFELD et al., 2000). Foi demonstrado que em indivíduos saudáveis existe uma correlação inversa entre os títulos de anticorpos anti Ox-LDL e a concentração de LDL oxidada, o que tem sido interpretado como uma ação protetora dos autoanticorpos, provavelmente associado à depuração de LDL aterogênica (SHOENFELD et al., 2000). Por outro lado, níveis diminuídos de IgM anti LDL oxidada foram correlacionados com menor espessamento da carótida em indivíduos com IAM prévio (TSIMIKAS et al., 2003). Em indivíduos com doença aterosclerótica estabelecida, os altos títulos de autoanticorpos encontrados foram correlacionados com o avanço da doença (SHOENFELD et al., 2000).

Independente deste e de outros aspectos ainda não totalmente esclarecidos, a LDL oxidada tem sido relatada como um fator comum na via final de vários fatores de risco que levam a formação das células espumosas e, conseqüentemente, à aterosclerose (TSIMIKAS & WITZTUM, 2001). Apesar disso, ainda não se sabe precisamente qual marcador de LDL oxidada é o mais relevante para estados específicos da doença (TSIMIKAS et al., 2003). Por isso, tem sido considerado que, depois de devidamente avaliados em estudos mais extensos, os ensaios para epítomos de oxidação na LDL oxidada poderão ter qualidades preditivas substanciais, juntamente com as avaliações do perfil lipídico e dos marcadores inflamatórios, no estudo da aterosclerose (TSIMIKAS & WITZTUM, 2001). Considerando-se que a LDL^o poderia representar um estágio evolutivo inicial da LDL oxidada (MERTENS & HOLVOET, 2001; NAVAB et al, 2002), este e outros tipos de abordagens analíticas da LDL^o poderão ajudar a esclarecer alguns pontos ainda obscuros em nosso entendimento sobre o processo aterosclerótico.

Devido ao fato de ser encontrada *in vivo* na circulação sanguínea, a LDL^o poderia auxiliar a preencher uma importante lacuna existente na abordagem da aterosclerose baseada na teoria oxidativa, ou seja, a ausência de um ensaio mais adequado para demonstrar diretamente a oxidação da LDL plasmática e assim realizar uma avaliação mais consistente do risco (PARASSASI et al., 2001). Traçando um paralelo, vale lembrar que a determinação da LDL oxidada (via epítomos da MDA-LDL) juntamente com a troponina cardíaca tem se mostrado um forte preditor das síndromes coronárias agudas (HOLVOET, COLLEN & VAN de WERF, 1999; TSIMIKAS et al., 2003). Porém vale lembrar que muitos testes para determinação de LDL oxidada são baseados em imunoenaios que utilizam anticorpos produzidos contra LDL oxidada *in vitro*, muitas vezes utilizando formas de LDL “totalmente” oxidadas como antígenos, o que não garante similaridade total com o processo *in vivo* (CAZZOLATO, AVOGARO & BITTOLO-BOM, 1991; STEINBERG, 1997). Considerando-se estes aspectos, tem sido discutida a necessidade de uma melhor compreensão das atividades biológicas da LDL^o e de sua relação com o desenvolvimento da aterosclerose, no sentido de determinar a sua importância clínica como forma circulante de LDL oxidada, visto que esta ainda é pouco compreendida (AVOGARO et al., 1988; SEVANIAN et al., 1997).

Embora venha se tornado evidente a presença de formas de LDL oxidada circulante, via demonstração da existência de epítomos específicos de oxidação no plasma por anticorpos dirigidos contra tais estruturas, uma das limitações para o estudo destas formas modificadas de LDL circulantes têm sido atribuída à deficiência na especificidade e sensibilidade dos métodos utilizados para a sua determinação. Por isso, esforços no sentido de superar estas limitações metodológicas têm sido direcionados principalmente para a elaboração de imunoenaios com melhor desempenho, onde diferentes tipos de anticorpos dirigidos contra LDL oxidada têm sido utilizados. O anticorpo monoclonal murino mAb E06, dirigido para MM-LDL (também denominada Ox-LDL-E06), tem sido utilizado como um marcador plasmático de LDL oxidada (TSIMIKAS et al., 2003).

Este anticorpo faz parte de um grupo de anticorpos (EO3, EO4, EO6 e EO7) isolados de células B de camundongos deficientes em ApoE e são reativos contra fosfolípidos oxidados derivados do PAPC (SHAW et al., 2001). TOSHIMA et al., (2000) também relataram o desenvolvimento do anticorpo monoclonal murino mAb FOH1/DLH3 que reconhece produtos oxidados da fosfatidilcolina, inclusive aqueles complexados à ApoB, mas não reage com LDL nativa, MDA-LDL, LDL acetilada ou LDL glicada. Utilizando este anticorpo, CHAPPEY et al. (1995) demonstraram uma relação positiva entre a LDL oxidada de frações isoladas por ultracentrifugação e as síndromes coronárias agudas. Em um estudo abordando as síndromes coronárias agudas e crônica, HOLVOET et al., (1998) relataram o uso dos anticorpos monoclonais de origem animal mAb-4E6 e mAb-1H11 dirigidos contra LDL oxidada e contra LDL modificada pelo malondialdeído (MDA-LDL), respectivamente. Recentemente, SHAW et al., (2001) relataram o isolamento de um autoanticorpo anti LDL oxidada de origem humana a partir do soro de um indivíduo com doença arterial coronária e expressão aumentada de anticorpos anti epítomos específicos de oxidação do tipo MDA-LDL. Este anticorpo, uma IgG denominada IK 17, também se liga à células apoptóticas e inibe a sua fagocitose *in vitro*. A origem dos autoanticorpos anti LDL oxidada ainda é motivo de controvérsia, porém KEARNEY, (2000) relatou que estudos com camundongos deficientes em ApoE têm mostrado que IgM anti LDL oxidada pertencem a uma classe de anticorpos naturais (T15) dirigidos contra epítomos de fosforilcolina comuns à LDL oxidada, células apoptóticas e vários microorganismos, como pneumococos. Tais anticorpos seriam produzidos por clones de células B selecionados ainda no fígado fetal ou na medula óssea perinatal pela sensibilização por restos de células apoptóticas ou por LDL oxidada. Com a finalidade de estudar a LDL⁻ em camundongos ateroscleróticos, DAMASCENO (2001), em Tese de Doutorado pela FCF-USP/São Paulo, desenvolveu o anticorpo monoclonal anti-LDL⁻ mAb 3D1036 através do qual foi possível a determinação da LDL⁻ plasmática por um imunoensaio ELISA .

Devido às já citadas propriedades físico-químicas da LDL⁻ e considerando os inúmeros estudos que têm estabelecido a correlação da LDL e suas formas modificadas com o processo aterosclerótico (HODIS et al., 1994; DEMUTH et al. 1996 e SEVANIAN et al., 1997), a determinação da LDL⁻ poderia fornecer informações adicionais importantes sobre a ação biológica e a resposta imune envolvidas com esta lipoproteína na aterosclerose. Considerando-se também que, além da LDL⁻ possivelmente não só representar uma fração circulante de LDL oxidada (SEVANIAN et al., 1999), mas também ser um pré-requisito importante para que tal processo ocorra (SEVANIAN et al., 1996; NAVAB et al., 2002), o estudo da concentração plasmática de LDL⁻ poderia fornecer informações preditivas mais completas quanto à evolução da aterosclerose, já que esta subfração demonstraria melhor a condição real da LDL frente à ação de processos oxidativos *in vivo* (SEVANIAN et al., 1996). De fato, o estudo da aterosclerose em seus estágios iniciais ainda é de difícil realização através das tecnologias atuais e permanece o desafio para o desenvolvimento de metodologias que permitam a detecção do processo aterosclerótico em sua fase inicial (BUI et al., 1996). STEINBERG & WITZTUM, (2002), abordando um dos aspectos que ainda geram controvérsias quanto à importância da teoria oxidativa em relação à aterosclerose humana, que é a falta de comprovação dos benefícios da terapia com antioxidantes em humanos, destacaram a falta de marcadores mais adequados para estes estudos.

Portanto, considerando a LDL⁻ como representante dos estágios iniciais de oxidação da LDL (NAVAB et al., 2002) e as possibilidades técnicas proporcionadas pelas recentes metodologias disponibilizadas, o estudo da LDL⁻ poderia representar uma nova perspectiva para o monitoramento das modificações oxidativas da LDL que ocorrem *in vivo*, assim como possibilitar investigações sobre o seu potencial aterogênico.

A proposta deste trabalho é realizar um estudo direto da LDL⁻ plasmática, através de sua concentração, assim como um estudo indireto, pela determinação dos níveis de autoanticorpos anti LDL⁻, em

indivíduos portadores de síndromes coronárias agudas (infarto agudo do miocárdio e angina instável) e crônicas (angina estável). Além de contribuir para o melhor entendimento da participação da LDL⁻ nestes eventos, as informações geradas poderão demonstrar a utilidade da LDL⁻ como marcador bioquímico das síndromes coronárias.

2. OBJETIVOS

- Estudar a LDL⁻ e a formação de autoanticorpos anti LDL⁻ em pacientes com síndromes coronárias estáveis (angina estável) e em pacientes com síndromes coronárias agudas (angina instável e infarto agudo do miocárdio).
- Verificar a utilidade da quantificação da LDL⁻ como marcador bioquímico em indivíduos com síndromes coronárias agudas e crônica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

As amostras foram obtidas de pacientes manifestando síndromes coronárias agudas (SCA) ou crônica (SCC) atendidos no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná (HURNPR) e Irmandade da Santa Casa de Londrina (ISCAL) no período de janeiro a dezembro de 2002. A inclusão dos indivíduos nestes grupos de estudo utilizou as informações constadas em prontuário médico e baseou-se essencialmente no diagnóstico clínico registrado pelo médico atendente e posteriormente confirmado por um médico cardiologista, docente do HURNPR e membro do corpo clínico da ISCAL, colaborador deste estudo. Depois da exclusão de pacientes submetidos à hemodiálise ou portadores de doenças neoplásicas, os indivíduos foram redistribuídos em 3 subgrupos: indivíduos com SCA foram subdivididos em infarto agudo do miocárdio (IAM) ou angina instável (AI) e indivíduos com SCC constituíram um único subgrupo definido como angina estável (AE). Conforme estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (RAMOS & MAGALHÃES, 2000) o IAM foi diagnosticado em indivíduos que apresentavam pelo menos dois dos seguintes achados: história de dor precordial prolongada (dor de característica isquêmica), alterações eletrocardiográficas típicas e elevação seriada característica da atividade de enzimas cardíacas. Angina instável foi definida pela presença de dor precordial de início recente com aumento de frequência dos episódios e ocorrência inclusive no estado de repouso. Angina estável foi definida como história de dor precordial típica resultante de esforço físico e com longo tempo de evolução. Todos os indivíduos com IAM, AI ou AE foram submetidos à angiografia coronária e as lesões detectadas foram descritas quanto à localização e porcentagem de estenose do lúmen do(s) vaso(s) afetado(s). Os indivíduos com IAM e AI foram submetidos a este

procedimento em período próximo à data de inclusão no estudo e tais dados serviram para a confirmação do diagnóstico. Por sua vez, os indivíduos com AE realizaram o exame em data anterior ao estudo devido a estes constituírem casos previamente diagnosticados sob acompanhamento ambulatorial. O grupo controle (C) foi composto por indivíduos que não apresentaram evidências clínicas para doença arterial coronária e nenhum dos fatores de risco estudados. O número de indivíduos em cada grupo foi de 21 (IAM), 8 (AI), 19 (AE) e 15 (C) respectivamente, totalizando um grupo de 63 indivíduos estudados. Além destes, foi recrutado um grupo de 9 indivíduos para a extração e purificação de LDL⁻ conforme descrito abaixo.

3.2 Coleta de amostras

Amostras de sangue foram coletadas através de punção venosa com tubos a vácuo de 16x100mm (VACUETTE[®], greiner bio-one) para a obtenção de soro, plasma heparinizado e plasma-EDTA (ácido etileno-diaminotetracético), sendo que a concentração de anticoagulantes utilizadas nos dois últimos tubos foi de 1,8 mg de EDTA/ml de plasma e 14 U.I. de heparina/ml de plasma, respectivamente. Após a coleta, as amostras foram mantidas refrigeradas e protegidas da luz até o momento da separação do soro/plasma e adição dos antioxidantes descritos abaixo. As amostras dos indivíduos com IAM ou AI foram obtidas até 48 horas após o atendimento e/ou internamento, sendo que, devido à intenção de se obter a amostra dentro do menor tempo possível em relação ao início dos eventos, foi dispensada a obrigatoriedade de jejum para estas amostras. No entanto, depois de um período médio de internamento de 5 dias, estes indivíduos tiveram uma amostra adicional (2^a amostra) coletada após jejum de 12 horas para o estudo de possíveis alterações no perfil lipídico da primeira amostra devido à ausência de jejum. Os indivíduos com AE e os controles, por sua vez, tiveram suas amostras coletadas depois de 12 horas de jejum.

3.2.1 Processamento e preservação de amostras

Dentro do menor prazo possível após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm durante 10 minutos e o soro/plasma obtidos foram aliquotados em frascos para congelamento e armazenados a -70°C até a realização dos ensaios. Ao plasma obtido a partir das amostras coletadas com EDTA foi acrescentado, antes do congelamento, uma mistura contendo os seguintes inibidores de proteases: aprotinina, benzamidina, fenil-metil sulfonil fluoreto-PMS e hidroxitolueno butilato-BHT, todos fornecidos por Sigma-Aldrich® Steinheim, Germany. As concentrações finais de antioxidantes nas amostras foram de: aprotinina = 2µg/ml, benzamidina = 2 mM, fenil-metil sulfonil fluoreto-PMS = 1 mM e hidroxitolueno butilato-BHT = 20 mM.

3.3 Características Gerais

As informações referentes à idade, tabagismo, hipertensão arterial, diabetes mellitus e uso de estatinas foram obtidas a partir dos registros no prontuário médico dos indivíduos e, quando necessário, através de entrevista com os mesmos, com familiares ou responsáveis. Com base no critério de classificação da pressão arterial para indivíduos > 18 anos estabelecido pelo III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial, foram considerados hipertensos os pacientes com registro para pressão sanguínea sistólica ≥ 140 mm Hg ou pressão sanguínea diastólica ≥ 90 mm Hg ou uso de anti-hipertensivo e história de hipertensão tratada ou não. O tabagismo foi atribuído a fumantes atuais e o diabetes mellitus foi considerado para pacientes em dieta, uso de medicamentos ou insulina para a redução da glicemia. De acordo com os valores referenciais para lipídeos plasmáticos em indivíduos >20 anos estabelecidos nas III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SALGADO, 2001),

foram considerados portadores de colesterol total e/ou c-LDL elevados aqueles indivíduos com colesterol total ≥ 240 mg/dl e c-LDL > 159 mg/dl.

Este trabalho foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa das instituições envolvidas, ou seja, Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná, Irmandade da Santa Casa de Londrina e Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Todos os pacientes ou seus responsáveis foram esclarecidos quanto à sua participação neste estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelas comissões acima descritas.

3.4 Determinações bioquímicas

Para a determinação do quadro clínico e demais características biológicas dos indivíduos, foram realizados o perfil enzimático cardíaco, perfil lipídico, doseamento de Apolipoproteína B (ApoB 100) e proteína C reativa (PCR). Com exceção da ApoB e proteína C reativa (PCR), todas as demais análises bioquímicas foram realizadas em um sistema autoanalisador Dimension AR[®] (Dade Behring, Newark, USA) utilizando-se *kits* de reagentes e protocolos do fabricante. As atividades das enzimas cardíacas, creatinofosfoquinase (CPK), creatinofosfoquinase-fração MB (CKMB), aspartato aminotransferase (AST) e lactato desidrogenase (LDH) foram determinadas através de métodos enzimáticos-UV. As determinações do colesterol total (CT), colesterol-HDL (c-HDL) e triacilgliceróis (TG) foram realizadas através de ensaios colorimétricos de ponto final, sendo que para o c-HDL utilizou-se um método de precipitação com fosfotungstato de sódio+magnésio. Para indivíduos com TG ≤ 400 mg/dl, as concentrações do c-VLDL e do c-LDL foram calculadas pela equação de Friedwald (c-VLDL= TG/5 e c-LDL= CT – (c-HDL + c-VLDL). Por sua vez, os ensaio para ApoB e PCR foram realizado por nefelometria em um equipamento Behring Nephelometer 100 Analyser[®] (Dade Behring). A determinação de PCR foi

realizada por metodologia ultra-sensível (N High Sensitivity CRP-Dade Behring) com sensibilidade de aproximadamente 0,175 - 1.100 mg/l.

3.5 Isolamento de Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL).

Alíquotas de LDL foram obtidas por ultracentrifugação a partir do plasma de indivíduos com colesterol total = $249 \pm 29,0$ mg/dl, de acordo com o procedimento descrito por GRIFFIN et al., (1990). Brevemente, plasma/EDTA foi obtido e processado em condições idênticas às aquelas descritas anteriormente. Em seguida as amostras de plasma tiveram suas densidades corrigidas para 1,090 g/ml com a adição de KBr sólido (0,3979 mg/3,0ml de plasma). O plasma e 7 alíquotas de salinas de KBr com densidades variadas foram então cuidadosamente dispostos seqüencialmente em tubos de polivinil para ultracentrifuga de modo a constituir um gradiente descontínuo de densidade. A seqüência e os volumes de introdução das salinas e do plasma ajustado obedeceu a seguinte ordem: 1.182g/ml(0,5 ml), plasma-1,090g/ml(3,0 ml), 1,060 g/ml(1,0 ml), 1,056 g/ml (1,0 ml), 1,045 g/ml (1,0 ml), 1,034 g/ml (1,5 ml), 1,024 g/ml (1,5 ml) e 1,019 g/ml (1,0 ml) respectivamente. Os tubos assim preparados foram ultracentrifugados durante 24 horas a 40.000 rpm e 4°C em uma ultracentrífuga Sorvall® Ultra pro 80 com rotor swing Sorvall® TH 641. Após a aspiração e descarte de 1,0 ml da fração sobrenadante (VLDL, $d= 1,019$ g/ml) foram coletados 6,0 ml da fração intermediária subsequente do gradiente ($d= 1,024$ a $1,060$ g/ml) correspondente a LDL ($d= 1,019$ a $1,063$ g/ml). Para remoção do excesso de KBr, as frações de LDL foram dialisadas durante a noite em solução tampão de diálise mantida em geladeira, sob agitação constante e protegida da luz. As alíquotas de LDL assim obtidas foram misturadas e armazenadas a -70°C até sua posterior utilização.

3.6 Isolamento da Lipoproteína de Baixa Densidade Eletronegativa (LDL⁻)

Seguindo-se a técnica descrita por Hodis *et al.* (1994), com algumas modificações, a mistura de LDL obtida foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um cromatógrafo Shimadzu[®] LC-10AD para isolamento da LDL⁻. Foi utilizada uma coluna Hamilton[®] PRP-X500 e fase móvel constituída por um gradiente formado por tampão TRIS 20mM, pH 7,8 (bomba A) e tampão TRIS 20mM + NaCl 1M, pH 7,8 (bomba B). As amostras de LDL foram injetadas com uma seringa Hamilton[®] de 1000 µl e o tempo de corrida foi de 45 minutos. Devido à sua maior eletronegatividade, a LDL⁻ foi eluída à medida que a concentração de NaCl aumentou. Os tempos de retenção para a LDL nativa (nLDL) e LDL⁻ foram de 5 e 15 minutos, respectivamente, com a fase móvel sendo constituída aos 5 minutos por 100% de tampão TRIS 20mM (bomba A) e aos 15 minutos por 62% de tampão TRIS 20mM (bomba A) e 38% de tampão TRIS 20mM + NaCl 1M (bomba B). O eluente foi monitorado a 280 nm e as alíquotas de LDL⁻ foram coletadas em frascos contendo o mesmo conjunto de antioxidantes utilizados durante a coleta das amostras. As alíquotas de LDL⁻ purificadas foram misturadas e concentradas a vácuo sob refrigeração em um Speedvac SC 110 Savant[®] e tiveram suas concentrações protéicas (µg/ml) determinadas pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) com a utilização de albumina bovina como padrão. Imediatamente a seguir, as amostras foram congeladas a -70°C até sua posterior utilização como padrões na elaboração de curvas de calibração para o doseamento da LDL⁻ ou como antígenos para a sensibilização de placas nos ensaios para determinação de autoanticorpos anti LDL⁻.

3.7 ELISA para a determinação da LDL⁻ plasmática

3.7.1 Sensibilização das microplacas com o anticorpo

Placas de microtitulação com 96 poços Lumicount[®] (Nunc Inc. Naperville, IL) foram recobertas com 50µl/poço do anticorpo monoclonal anti LDL⁻ mAb3D1036 (IgG de camundongo anti LDL⁻) diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,1M, pH 9,6) em uma concentração final de 1µg/poço e em seguida foram incubadas em 37°C durante a noite. Após descarte do sobrenadante as placas foram lavadas três vezes com 150 µl de tampão TBS-TWEEN 0,05%.

3.7.2. Bloqueio de sítios de ligação livres

As placas foram bloqueadas com 150 µl/poço de uma solução de leite em pó desnatado em TBS a 5% e após 2 horas de incubação em 37°C o sobrenadante foi descartado e as placas foram lavadas por três vezes com tampão TBS-TWEEN 0,05%.

3.7.3 Aplicação das amostras

Foram adicionados 50 µl/poço de amostras de plasma e calibradores (LDL⁻ 330µg de proteínas/ml em diluições 1/10, 1/50, 1/100 e 1/1000) em triplicata, o conjunto foi incubado por 2 horas a 37°C e em seguida lavado por três vezes com tampão TBS-TWEEN 0,05%. Três poços em cada placa foram mantidos livres de amostras para utilização como branco.

3.7.4 Reação com o conjugado

Foram aplicados 50 µl/poço do conjugado constituído pelo mAb3D1036 biotilado diluído 1:1000 em solução de leite-TBS a 1%, as placas foram incubadas durante 2 horas em 37°C e lavadas três vezes com tampão TBS-TWEEN 0,05% . Em seguida foram aplicados 50 µl/poço de solução de avidina-peroxidase diluída a 1:3000 em leite-TBS a 1% e as

placas sofreram novo período de incubação por 2 horas em 37°C e lavagem por três vezes com tampão TBS-TWEEN 0,05%.

3.7.5 Reação com o substrato

Em cada placa, a revelação foi feita acrescentando-se 50 µl/poço do substrato constituído por 0,5 ml de luminol (luminol 0,76mM + p.iodofenol 0,3 mM em tampão TRIS-HCL pH 8,5) misturado a 2,5 ml de H₂O deionizada e adicionado de 0,75 ml de H₂O₂ (0,25 ml H₂O₂/ml substrato) imediatamente antes da leitura em 405 nm realizada em um luminômetro para microplacas LumiCount® (Packard BioScience Company).

3.7.6 Cálculos

Foram obtidos os valores médios para as luminescências das triplicatas ou duplicatas cujo resultados apresentaram variação $\leq 10\%$. O resultado final da luminescência de cada amostra foi obtido depois de descontado o valor da luminescência do branco de sua respectiva placa. Estes valores foram utilizados para calcular as concentrações de LDL⁻ em µg de proteína/ml nas amostras por regressão linear ($y=36,535.x$) a partir da curva de calibração elaborada.

3.8 ELISA para determinação de autoanticorpos anti LDL⁻

3.8.1. Sensibilização das placas com o antígeno

Placas para microtitulação de 96 poços COSTAR[®] (Corning Incorporated, New York, USA) foram sensibilizadas com a aplicação de 50 µl de LDL⁻ previamente diluída com tampão carbonato-bicarbonato (0,1 M, pH 9,6) em uma concentração final de 1 µg/poço e incubadas durante a noite em estufa à 37°C. Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e as placas foram lavadas três vezes com 150 µl de tampão PBS-TWEEN 0,05% (pH 7,2).

3.8.2 Bloqueio de sítios de ligação livres

As placas sensibilizadas foram bloqueadas com a aplicação de 150 µl de uma solução de leite em pó desnatado em tampão PBS a 5% e incubadas por 2 horas em 37°C. Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e as placas foram lavadas por três vezes com 150 µl de tampão PBS-TWEEN 0,05% (pH 7,2).

3.8.3 Aplicação de amostras

Alíquotas de 50 µl de amostras de plasma previamente diluídas 1:100 em uma solução de leite em pó desnatado em tampão PBS a 1% foram aplicadas em triplicata às placas bloqueadas e em seguida incubadas por 2 horas em 37°C. Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e as placas foram lavadas por três vezes com 150 µl de tampão PBS-TWEEN 0,05% (pH 7,2). Três poços em cada placa foram mantidos livres de amostras para utilização como branco.

3.8.4 Reação com o conjugado

O conjugado anti-IgG/Peroxidase (anticorpo code 610-1302 Peroxidase Conjugated Affinity antihuman IgG (goat), Rockland) previamente diluído 1:2000 em uma solução de leite em pó desnatado em tampão PBS a 1% foi aplicado em quantidades de 50 µl/poço e em seguida as placas foram incubadas por 2 horas a 37°C. Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e as placas foram lavadas por três vezes com 150 µl de tampão PBS-TWEEN 0,05% (pH 7,2)

3.8.5 Reação com o substrato

Em cada poço foi adicionado 50 µl do substrato (preparado no momento do uso) constituído por uma solução de ABTS em tampão citrato-fostato (0,53 mg de ABTS/ml de tampão citrato-fostato) e H₂O₂ (0,25 ml para cada ml de ABTS/citrato-fostato). Em seguida as placas permaneceram em repouso durante 30 minutos em temperatura ambiente e as absorbâncias foram determinadas a 405 nm em um fotômetro para microplacas SpectraCount® (Packard BioScience Company)

3.8.6 Cálculos

Foram obtidos os valores médios para as absorbâncias das triplicatas ou duplicatas cujo resultados apresentaram variação ≤ 10%. Destes valores foi descontado o valor da absorbância do branco de sua respectiva placa e o resultado final foi considerado como o nível de autoanticorpos anti LDL⁻ da amostra (ABS 405 nm).

3.9 Estatística

Devido à grande maioria dos grupos de dados analisados não mostrarem distribuição normal, os resultados foram calculados como mediana (mínimo-máximo), exceto para a idade, onde foi utilizado média \pm desvio padrão. O tipo de distribuição dos dados foi verificado pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk em um programa Arcus Professional versão 2.0 XTc. Para comparações entre dois grupos de dados foram utilizados o Teste de Mann-Whitney ou o Teste dos Postos Assinalados de Wilcoxon (para dados pareados) enquanto que para os estudos de comparação envolvendo 3 ou mais grupos foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis. As comparações entre colunas foram realizadas pelo Teste de Comparações Múltiplas de Dunn e as correlações entre os dados avaliados foram determinadas pelo coeficiente de correlação de Spearman (r). Estes últimos métodos não-paramétricos foram aplicados com a utilização de um programa GraphPad InStat tm versão 2.04a. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

Os gráficos do tipo "Box-Chart" foram confeccionados com o programa GraphPad Prism com as linhas horizontais central, inferior e superior da caixa representando os valores da mediana, 1º e 3º quartís, respectivamente. A barra descendente mostra o valor mínimo e a ascendente o valor máximo do grupo de dados representados. Os demais gráficos foram construídos com o programa Excel e o cálculo das concentrações de LDL⁻ foram realizados através de regressão linear utilizando o mesmo programa.

4. RESULTADOS

A tabela 1 mostra as características gerais do grupo de indivíduos estudados, que foi subdividido em subgrupos IAM (infarto agudo do miocárdio), AI (angina instável), AE (angina estável) e C (controle). Entre os subgrupos, com exceção para o subgrupo AI, onde as proporções foram iguais, ocorreu predomínio do sexo masculino sobre o feminino, sendo que o grupo total apresentou 64% de homens para 36% de mulheres. Não foram verificadas diferenças significantes para a idade entre os subgrupos ($p=0,1362$). O tabagismo foi verificado em 11% do total de indivíduos estudados e teve maior frequência no subgrupo AE (16%). A hipertensão arterial foi encontrada em 43% dos indivíduos sendo igualmente mais frequente no subgrupo AE (68%). Por sua vez, o diabetes mellitus foi identificado em 16% do grupo total estudado e a maior porcentagem de indivíduos acometidos foi encontrada no subgrupo AI (25%). A utilização de estatinas abrangeu 44% dos indivíduos e sua principal utilização foi observada entre os pacientes do subgrupo AE (84%).

Tabela 1. Características Gerais do Grupo Estudado

Subgrupos	IAM	AI	AE	C	TOTAL
Nº de indivíduos	21	8	19	15	63
Sexo (Masc/Fem) (%)	13/8 (62/38)	4/4 (50/50)	15/4 (79/21)	8/7 (53/47)	40/23 (64/36)
Idade (anos)*	64±15	69±17	59±10	59±6	62±17
Tabagismo (%)	15	12	16	0	11
Hipertensão (%)	43	62	68	0	43
Diabetes Mellitus (%)	23	25	16	0	16
CT e/ou c-LDL elevados (%)	14	0	5	0	6
Uso de estatinas (%)	29	75	84	0	44

Idade expressada como média ± desvio padrão.* $p=0,1362$. IAM: infarto agudo do miocárdio; AI: angina instável; AE: angina estável; C: controle; CT: colesterol total, c-LDL: colesterol associado à LDL; CT elevado: $CT \geq 240$ mg/dl; c-LDL elevado: $c-LDL \geq 160$ mg/dl.

Na tabela 2 estão relacionados os resultados das determinações bioquímicas realizadas nos subgrupos IAM, AI, AE e C, assim como a significância estatística (p) de cada parâmetro determinado entre estes subgrupos.

Tabela 2 . Parâmetros Bioquímicos do Grupo Estudado

Testes	IAM	AI	AE	C	p
CPK (U/l)	901 (44-7649)	77,5 (14-174)	91 (34-245)	100 (32-188)	<0,0001
CKMB (U/l)	46 (1-351)	2,5 (1-33)	4 (1-8)	1 (1-5)	<0,0001
AST (U/l)	111 (2-638)	26 (10-63)	27 (6-48)	20 (11-31)	<0,0001
LDH (U/l)	355 (120-1090)	159 (87-227)	147 (102-204)	167 (109-225)	<0,0001
Col Total (mg/dl)	177 (94-262)	179 (132-223)	193 (145-274)	194 (158-216)	0,5516
c-HDL (mg/dl)	32 (15-69)	30 (21-43)	39 (28-57)	37 (20-70)	0,2097
c-VLDL (mg/dl)	26 (9-53)	30 (14-48)	26 (16-91)	27 (13-39)	0,6867
c- LDL (mg/dl)	111 (46-193)	119 (71-155)	115 (83-187)	121 (96-158)	0,6327
TG (mg/dl)	128 (46-265)	145 (69-240)	132 (82-457)	134 (65-196)	0,5739
ApoB (μ g/ml)	932 (558-1465)	988 (812-1290)	937 (644-1644)	984 (776-1269)	0,8068
PCR (mg/l)	7,91 (0,85-300)	6,51 (0,67-136)	1,23 (0,24-13,2)	1,91 (0,22-37,6)	0,0006
LDL ⁻ (μ g/ml)	41,8 (18,7-107,9)	37,5 (20,2-69,7)	35,0 (23,0-79,9)	21,62 (15,8-49,3)	0,0002
Ac Anti LDL ⁻ (ABS 405 nm)	1,070 (0,340-1,583)	1,119 (0,157-1,467)	0,527 (0,304-1,052)	0,467 (0,236-0,660)	<0,0001

Dados expressados como mediana (mínimo-máximo). IAM: infarto agudo do miocárdio; AI: angina instável; AE: angina estável; CT: controle; CPK: creatinofosfoquinase; CKMB: creatinofosfoquinase-fração MB; AST: aspartato aminotransferase; LDH: lactato desidrogenase; Col: colesterol; c-: colesterol associado a lipoproteínas, LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; TG: triacilgliceróis; ApoB: apoproteína B; PCR: proteína C reativa, LDL⁻: LDL eletronegativa; Ac Anti LDL⁻: autoanticorpos anti LDL⁻. Os valores de p referem-se às comparações entre os subgrupos (IAM, AI, AE e C).

A atividade da CPK foi maior no subgrupo IAM e diferiu significativamente dos demais subgrupos ($p < 0,001$), porém, não ocorreram diferenças significativas de atividade entre os subgrupos AI, AE e C. Da mesma forma, os níveis de atividade da CKMB também foram significativamente maiores no subgrupo IAM em relação aos subgrupos AI, AE e C ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente), sendo que, entre estes últimos subgrupos, não foram constatadas diferenças para a atividade da enzima. A determinação de AST igualmente mostrou maior atividade no subgrupo IAM, que diferiu significativamente apenas dos subgrupos AE e C ($p < 0,001$), enquanto que a LDH, por sua vez, também se mostrou maior no subgrupo IAM, onde a atividade foi mais alta que nos subgrupos AI, AE e C ($p < 0,05$, $p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente).

Os resultados de colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-VLDL, colesterol-LDL, triacilgliceróis e ApoB não apresentaram diferenças significativas entre os subgrupos e a concentração de PCR apresentou maior elevação no subgrupo IAM, diferindo significativamente dos subgrupos AE e C ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente).

A concentração de LDL⁻ em indivíduos com síndromes coronárias agudas ou crônica foi maior do que nos controles. Os níveis mais elevados de LDL⁻ em relação ao subgrupo C foram encontrados no subgrupo IAM ($p < 0,001$), onde a concentração de LDL⁻ foi 93 % maior. Os subgrupos AI, e AE, também mostraram concentrações de LDL⁻ significativamente maiores ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) com valores 73% e 62% mais altos que os controles. Por outro lado, quando comparados apenas entre eles, os subgrupos de indivíduos com síndromes coronárias agudas ou crônica (IAM, AI e AE) não mostraram diferenças significantes na concentração de LDL⁻.

A determinação dos autoanticorpos anti LDL⁻ mostrou que indivíduos do subgrupo IAM e AI possuem níveis significativamente mais elevados em relação aos controles. Os níveis mais elevados foram encontrados no subgrupo AI seguido pelos subgrupos IAM, AE e C. A comparação dos níveis de anticorpos, tanto do subgrupo IAM como do

subgrupo AI em relação ao subgrupo C, revelou diferenças significativas ($p < 0,001$) com os níveis de autoanticorpos daqueles subgrupos mostrando, respectivamente, aumentos de 129% e 140% em relação ao subgrupo C. Além disso, os subgrupos IAM e AI também mostraram níveis de autoanticorpos significativamente maiores em relação ao subgrupo AE ($p < 0,01$). Por outro lado, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre este último subgrupo e o controle. As comparações acima descritas entre as concentrações de LDL⁻ e entre níveis de autoanticorpos anti LDL⁻ nos grupos de indivíduos estudados também estão demonstrados nas figuras 1 e 2, respectivamente.

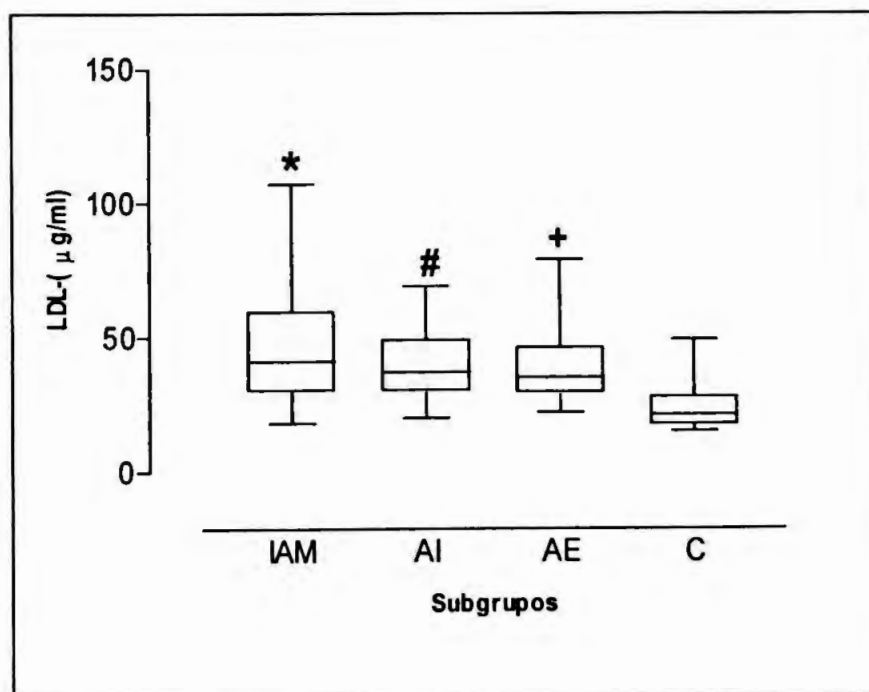


Figura 1. Concentrações de LDL⁻ (µg/ml) nos subgrupos de indivíduos estudados. Resultados expressados como mediana (mínimo-máximo). IAM: infarto agudo do miocárdio; AI: angina instável; AE: angina estável; C; controle. * $p < 0,001$; # $p < 0,05$ e + $p < 0,01$ (em relação ao subgrupo C).

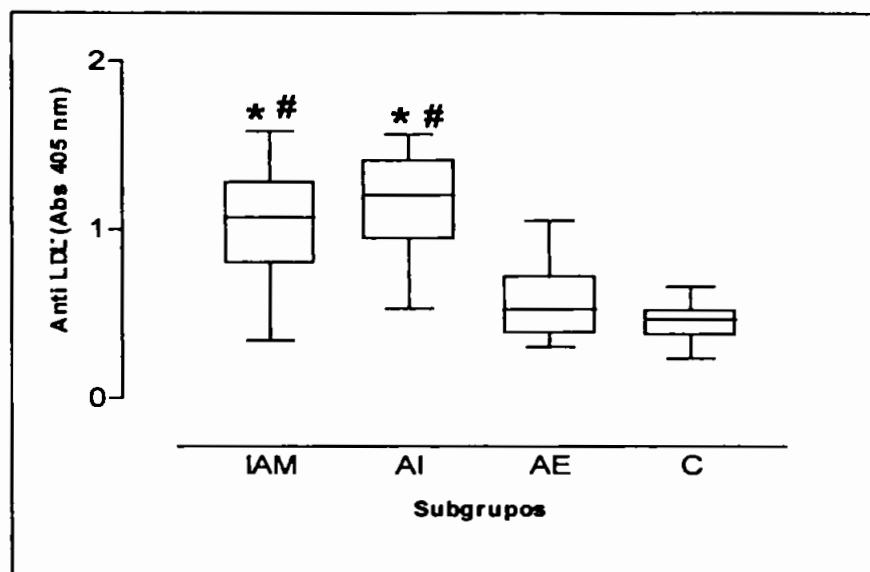


Figura 2. Níveis de autoanticorpos anti LDL⁻ (ABS 405 nm) nos subgrupos de indivíduos estudados. Resultados expressados como mediana (mínimo-máximo). IAM: infarto agudo do miocárdio; AI: angina instável; AE: angina estável; C; controle. * $p < 0,001$ (em relação ao subgrupo C); # $p < 0,01$ (em relação ao subgrupo AE).

Tabela 3. Valores de r para as Correlações entre LDL⁻ ou Autoanticorpos anti LDL⁻ com Parâmetros Bioquímicos determinados no Grupo Estudado

	LDL ⁻ (µg/ml)	Ac Anti LDL ⁻ (ABS 405 nm)
	r	r
ApoB (µg/ml)	-0,1346	-0,0802
c-LDL (mg/dl)	-0,1987	-0,2133
c-HDL(mg/dl)	-0,1075	-0,0885
Col Total (mg/dl)	-0,1651	-0,1888
Triacilgliceróis (mg/dl)	0,0337	-0,0524
hs-PCR (mg/l)	0,1646	0,3439 [§]
CKMB (U/l)*	0,3657	0,4755 [§]
LDL ⁻ (µg/ml)	-	0,3860 [§]
Ac Anti LDL ⁻ (ABS 405 nm)	0,3860	-

r = coeficiente de correlação de Spearman. * avaliado somente no grupo IAM.
[§] $p < 0,05$; [§] $p < 0,01$.

A tabela 3 mostra os valores dos coeficientes de correlação (r) entre as concentrações de LDL⁻ ou níveis de autoanticorpos anti LDL⁻ com os demais parâmetros bioquímicos determinados para os subgrupos de indivíduos estudados. Foram estabelecidas associações significativas (ROSNER, 1995) entre autoanticorpos e PCR, CKMB e LDL⁻ ($r = 0,3439$,

$r = 0,4755$ e $r = 0,3860$), respectivamente. Com os demais parâmetros bioquímicos (ApoB, c-LDL, c-HDL, colesterol total e triacilgliceróis), não foi possível demonstrar a existência de correlação. Exceto com os autoanticorpos anti LDL⁻, como citado anteriormente, também não foi possível demonstrar qualquer correlação entre as concentrações de LDL⁻ e os parâmetros bioquímicos analisados. As correlações entre os níveis de autoanticorpos anti LDL⁻ com a CKMB e a PCR nos indivíduos estudados estão demonstradas nas figuras 3 e 4, enquanto que a figura 5 mostra a correlação entre autoanticorpos anti LDL⁻ e LDL⁻.

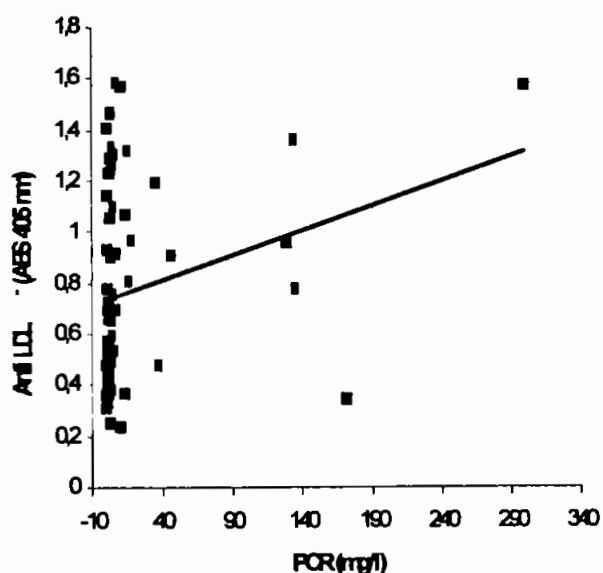


Figura 3. Correlação entre as concentrações de PCR (mg/l) e níveis de autoanticorpos anti LDL (ABS 495 nm) no grupo de indivíduos estudados. $r = 0,3439$ ($p=0,0058$).

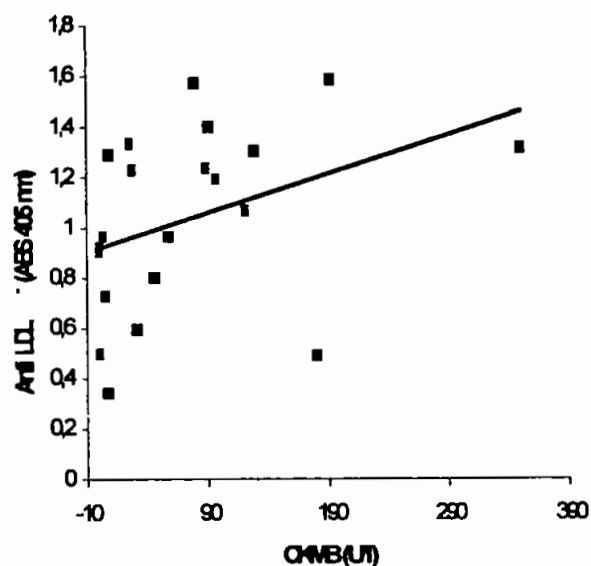


Figura 4. Correlação entre a atividade de CKMB (U/l) e níveis de autoanticorpos anti LDL (ABS 405nm) em indivíduos com infarto agudo do miocárdio. $r = 0,4755$ ($p=0,0294$).

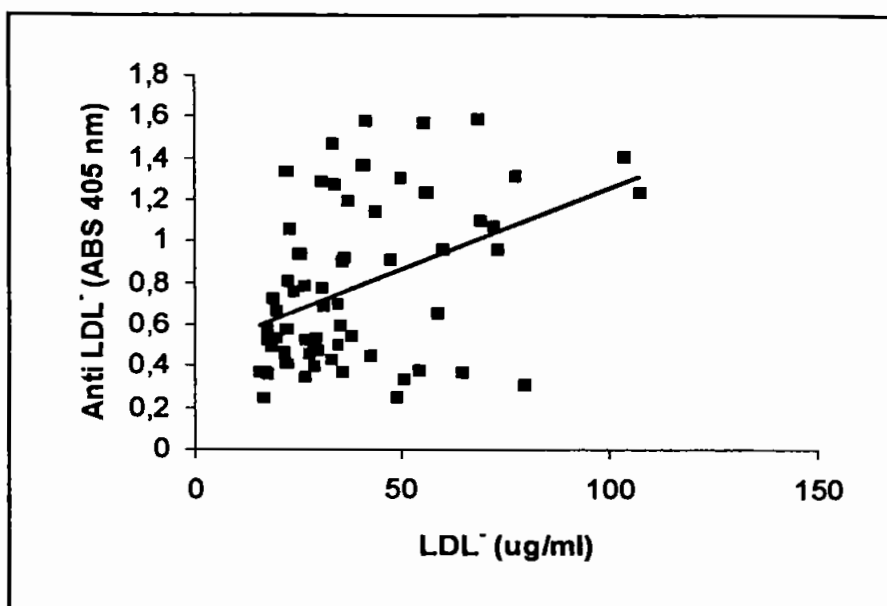


Figura 5. Correlação entre concentrações de LDL⁻ (µg/ml) e níveis de autoanticorpos anti LDL⁻ (ABS 405 nm) nos subgrupos de indivíduos estudados. $r = 0,3860$ ($p = 0,0018$).

Como demonstrado pela tabela 4, não foi verificada diferença significativa entre a concentração de LDL⁻ em indivíduos com síndromes coronárias agudas (IAM e AI) em relação àqueles com síndrome coronária crônica (AE), porém observou-se variação significativa dos níveis de autoanticorpos anti LDL⁻ entre estes dois grupos de indivíduos ($p < 0,0001$).

Tabela 4. Comparação das Concentrações de LDL⁻ e dos Níveis de Autoanticorpos Anti LDL⁻ entre Indivíduos com Síndromes Coronárias Agudas (IAM e AI) e Síndrome Coronária Crônica (AE).

	LDL ⁻ (µg/ml)	Anti LDL ⁻ (ABS 405 nm)	
		p^*	p^*
Síndromes coronárias agudas	40,7(18,7-107,9)	0,3647	1,094(0,157-1,583) <0,0001
Síndrome coronária crônica	35,0(23,0-79,9)		0,527(0,304-1,052)

Resultados expressados como mediana (mínimo-máximo). *em relação à síndrome coronária crônica.

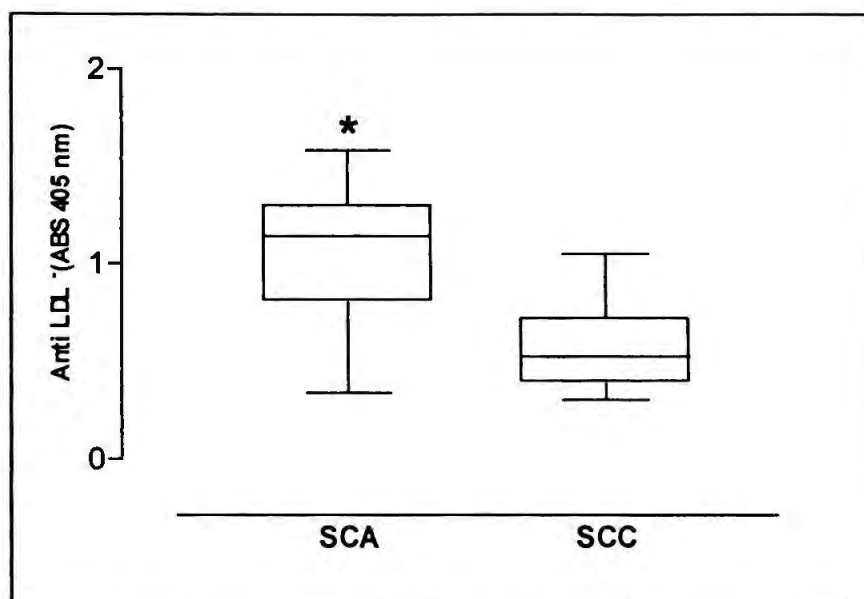


Figura 6. Comparação entre níveis de autoanticorpos anti LDL⁻ (ABS 405nm) em indivíduos com síndromes coronárias agudas e indivíduos com síndrome coronária crônica. Resultados expressados como mediana (mínimo-máximo). SCA: síndromes coronárias agudas (IAM e AI), SCC: síndrome coronária crônica (AE). * $p < 0,0001$ (em relação à SCC).

A figura 6 apresenta adicionalmente esta última constatação mostrando os níveis significativamente mais elevados de anticorpos encontrados no grupo de indivíduos com síndromes coronárias agudas.

A tabela 5 relaciona o número de lesões angiograficamente identificáveis com as concentrações de LDL⁻ e níveis de autoanticorpos anti LDL⁻ em indivíduos com síndromes coronárias agudas e crônica submetidos ao processo de cateterismo. As maiores concentrações de LDL⁻ foram observadas naqueles indivíduos com três lesões enquanto que os níveis mais elevados de autoanticorpos anti LDL⁻ foram determinados nos indivíduos com quatro ou mais lesões detectadas, apesar disso, no entanto, não foi verificado variação estatisticamente significativa para as concentrações de LDL⁻ ou níveis de autoanticorpos anti LDL⁻ relacionados ao número de lesões.

Tabela 5. Comparação entre Concentrações de LDL⁻ ou Níveis de Autoanticorpos Anti LDL⁻ com o Número de Lesões Angiograficamente Detectáveis em Indivíduos Portadores de Síndromes Coronárias Agudas (IAM e AI) ou Crônica (AE)

Número de Lesões	n	LDL ⁻ (µg/ml)	Anti LDL ⁻ (ABS 405 nm)
		p= 0,7455	p= 0,0869
I	8	36,7(18,7-54,5)	0,561(0,331-1,573)
II	15	36,1(22,4-107,9)	0,931(0,157-1,583)
III	14	38,3(19,3-79,9)	0,670(0,304-1,315)
IV ou +	9	33,4(22,6-104,2)	1,231(0,755-1,467)

Resultados expressados como mediana (mínimo-máximo). n: número de indivíduos analisados.

As concentrações de LDL⁻ e níveis de autoanticorpos anti LDL⁻ nos indivíduos com síndromes coronárias agudas (IAM, AI) ou crônica (AE) produzidos na presença ou ausência de quatro dos tradicionais fatores de risco para a aterosclerose são mostrados na tabela 6. Indivíduos com colesterol total e/ou colesterol LDL elevados produziram as maiores concentrações de LDL⁻, seguidos por tabagistas, portadores de diabetes mellitus e hipertensos. Por sua vez, os níveis mais elevados de autoanticorpos anti LDL⁻ foram encontrados em indivíduos que não portavam hipertensão arterial seguidos por não tabagistas, não portadores de diabetes e não portadores de colesterol total e/ou colesterol LDL elevados. Apesar das diferentes concentrações de LDL⁻ e níveis de autoanticorpos anti LDL⁻ encontrados entre portadores e não portadores dos fatores de risco abordados, não foi possível demonstrar significância estatística para estas variações.

As concentrações de LDL⁻ e títulos de autoanticorpos anti LDL⁻ associadas ao número de fatores de risco presentes em indivíduos com síndromes coronárias agudas ou crônica, conforme mostrado na tabela 7, não apresentaram variações significativas. Os maiores valores para LDL⁻ foram determinados em indivíduos com dois fatores de risco enquanto que os níveis de autoanticorpos anti LDL⁻ mostraram maior elevação em indivíduos sem identificação de qualquer um dos fatores de risco abordados. A variação da LDL⁻ foi marginalmente significativa enquanto que para os autoanticorpos não foi verificada significância.

Tabela 6 . Comparação das Concentrações de LDL⁻ ou dos Níveis de Autoanticorpos Anti LDL⁻ entre Indivíduos com Síndromes Coronárias Agudas ou Crônica Portadores ou Não Portadores de Fatores de Risco para Aterosclerose.

	n	LDL ⁻ (µg/ml)	Anti LDL ⁻ (ABS 405 nm)		
			p*	p*	
Hipertensos	27	38,3(18,7-107,9)	0,6475	0,722(0,331-1,573)	0.3036
Não Hipertensos	21	36,1(20,2-104,2)		0,931(0,304-1,583)	
Tabagista	7	43,9(22,6-104,2)	0.2486	0,803(0,37-1,403)	0.5340
Não Tabagista	41	36,06(18,7-107,9)		0,896(0,304-1,583)	
Diabético	10	40,5(19,3-104,2)	0.5508	0,841(0,441-1,567)	0.8380
Não Diabético	38	36,1(18,7-107,9)		0,849(0,304-1,583)	
CT e/ou c-LDL elevados	4	47,0(22,6-107,9)	0.6528	0,727(0,493-1,238)	0,8714
CT e/ou c-LDL não elevados	44	36,2(18,7-104,2)		0,836(0,157-1,583)	

Resultados expressados como mediana (mínimo-máximo). n: número de indivíduos analisados. CT: colesterol total, c-LDL: colesterol LDL. CT e/ou c-LDL elevados: CT \geq 240 mg/dl e c-LDL \geq 160 mg/dl. *(em relação aos não portadores do fator de risco).

Tabela 7. Associação do Número de Fatores de Risco com as Concentrações de LDL⁻ ou Níveis de Autoanticorpos Anti LDL⁻ em Indivíduos com Síndromes Coronárias Agudas e Crônica.

Nº de Fatores de Risco	n	LDL ⁻ (µg/ml)	Anti LDL ⁻ (ABS 405 nm)
		p= 0,0984	p= 0,3988
0	9	34,4(20,2-19,9)	0,946(0,304-1,583)
1	16	35,4(18,7-69,7)	0,594(0,331-1,573)
2	11	57,4(19,3-107,9)	0,896(0,157-1,467)
3	12	30,7(22,6-42,6)	0,775(0,441-0,803)

Resultados expressados como mediana (mínimo-máximo). n: número de indivíduos analisados.

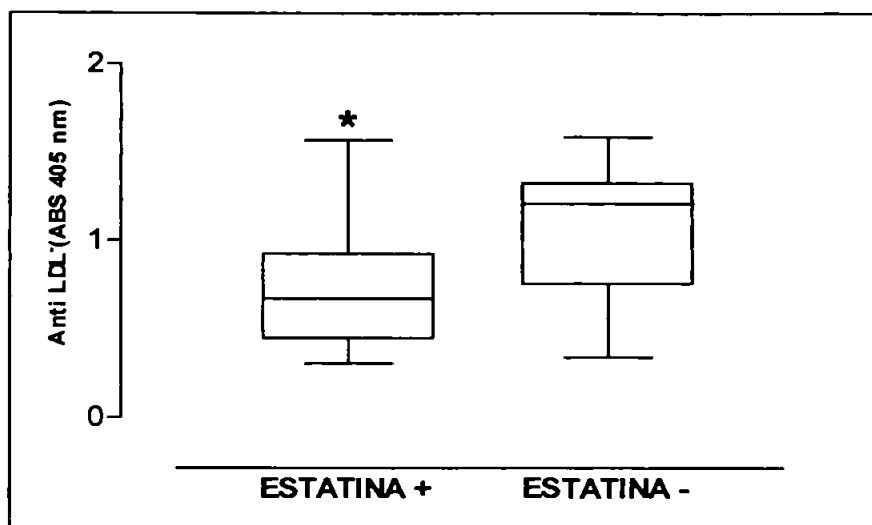


Figura 7. Comparação dos níveis de autoanticorpos anti LDL⁻ entre indivíduos com síndromes coronárias agudas ou crônica usuários e não usuários de estatinas. Resultados expressados como mediana (mínimo-máximo) ESTATINA+: Indivíduos com síndromes coronárias agudas ou crônicas usuários de estatinas. ESTATINA-: Indivíduos com síndromes coronárias agudas ou crônicas não usuários de estatinas. * $p < 0,01$ (em relação a indivíduos não usuários de estatinas).

Como mostram a figura 7 e a tabela 8, a comparação das concentrações de LDL⁻ entre indivíduos com síndromes coronárias agudas ou crônica que faziam ou não uso atual de estatinas não mostrou variação significativa, porém, os níveis de autoanticorpos anti LDL⁻ dos usuários de estatinas mostraram níveis significativamente menos elevados em relação aos não usuários.

Tabela 8. Comparação das Concentrações de LDL⁻ ou dos Níveis de Autoanticorpos Anti LDL⁻ entre Indivíduos com Síndromes Coronárias Agudas ou Crônica Usuários e Não Usuários de Estatinas

	LDL ⁻ (µg/ml)		Anti LDL ⁻ (ABS 405 nm)		
	n	p^*	p^*	p^*	
Usuários de Estatinas	20	37,3 (20,2-107,9)	0,7144	0,672 (0,304-1,567)	0,0022
Não Usuários de Estatinas	28	34,9 (18,7-104,2)		1,211 (0,340-1,583)	

Resultados expressados como mediana (mínimo e máximo). *(em relação aos não usuários de estatinas). n: número de indivíduos analisados.

As concentrações de LDL⁻ e níveis de autoanticorpos anti LDL⁻ também foram analisadas em relação ao tempo de evolução das síndromes coronárias agudas, para isso foram estabelecidos intervalos de tempo levando em consideração o tempo estimado em horas decorrido entre o início do evento clínico e a coleta da amostra analisada. Desta maneira, conforme mostrado na tabela 9, os indivíduos com diagnóstico para infarto agudo do miocárdio ou angina instável foram subdivididos em intervalos de tempo variando entre “até 12” (≤ 12 horas) a “48 horas ou mais” (>48 horas) em relação ao início dos sintomas. Tanto para a LDL⁻ como para os autoanticorpos, os menores valores foram verificados naqueles pacientes que tiveram suas amostras coletadas “após 24 até 36 horas” ($>24 \leq 36$ horas) de evolução das síndromes coronária agudas. Nestes indivíduos, a concentração de LDL⁻ e os níveis de autoanticorpos estavam, respectivamente, 15% e 36% menores em relação àqueles com até “12 horas” (≤ 12 horas) de evolução da doença. Por sua vez, as maiores concentrações de LDL⁻ e os níveis mais elevados de autoanticorpos anti LDL⁻ foram respectivamente atingidos nos intervalos “após 36 até 48 horas” ($>36 \leq 48$ horas) e “após 12 até 24 horas” ($>12 \geq 24$ horas) do início do evento, produzindo aumentos de 85 % para a LDL⁻ e 18 % para os autoanticorpos, quando comparados às amostras obtidas no intervalo de tempo mais precoce (≤ 12 horas). Após 48 horas (>48 horas) do início dos eventos, a concentração de LDL⁻ ainda encontrava-se elevada em 28% em relação ao primeiro intervalo de tempo enquanto que os níveis de autoanticorpos mostravam uma elevação de 6 %.

Entretanto, pesar dos diferentes valores de LDL⁻ e autoanticorpos nos intervalos de tempo avaliados, tais variações não mostraram significância estatística. Uma análise simultânea destas variações é apresentada pela figura 8 e mostra que até 48 horas após o início das síndromes coronárias agudas foi possível observar perfis similares no comportamento para as concentrações de LDL⁻ e níveis de autoanticorpos. Após este tempo, o comportamento da LDL⁻ nos indivíduos

analisados mostrou uma tendência para redução dos valores, enquanto que os níveis de autoanticorpos sugeriram um padrão de elevação.

Tabela 9. Concentrações de LDL⁻ ou Níveis de Autoanticorpos Anti LDL⁻ em Relação ao Tempo de Evolução das Síndromes Coronárias Agudas .

Tempo de Evolução*	n	LDL ⁻ (µg/ml)	Anti LDL ⁻ (ABS 405 nm)
		p= 0,3025	p= 0,8255
≤ 12 horas	6	32,8(18,7-104,2)	1,033(0,489-1,573)
>12 ≤ 24 horas	10	40,8(22,4-107,9)	1,215(0,340-1,567)
>24 ≤ 36 horas	4	27,8(19,3-69,2)	0,658(0,531-1,583)
>36 ≤ 48 horas	3	60,6(56,2-73,6)	0,963(0,960-1,231)
> 48 horas	4	42,0(34,3-50,5)	1,093(0,906-1,304)

Valores expressados como mediana (mínimo-máximo). *Intervalos de tempo (horas) decorridos entre o início da síndrome coronária aguda (infarto agudo do miocárdio ou angina instável) e o momento da coleta da amostra para análise. n: número de indivíduos analisados

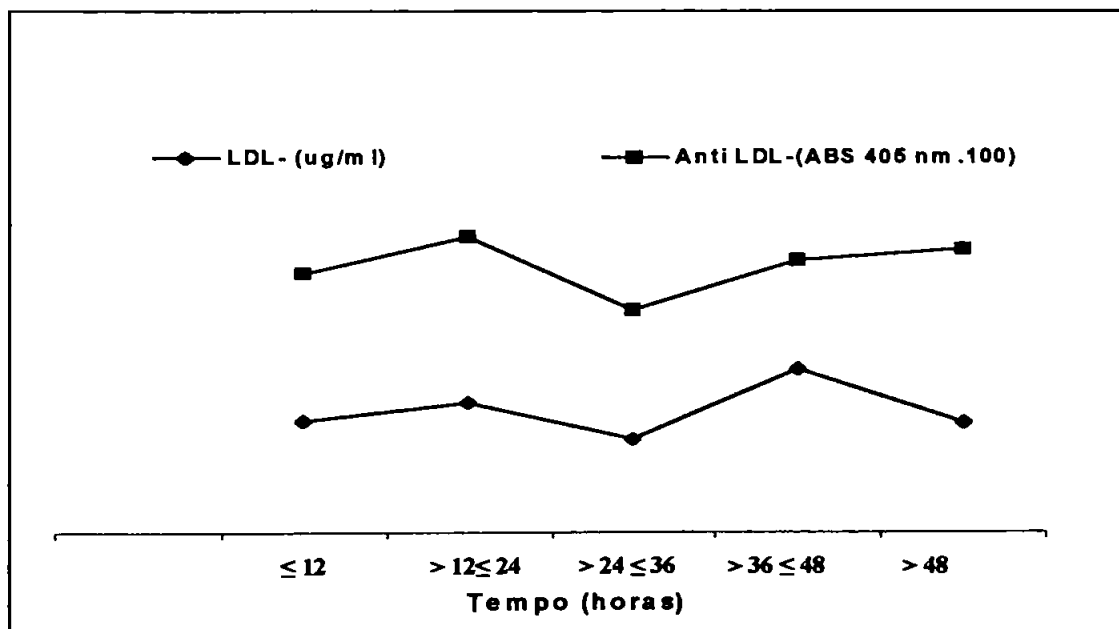


Figura 8. Variação das concentrações de LDL⁻ (µg/ml) e níveis de autoanticorpos anti LDL⁻ (ABS 405 nm) durante o tempo de evolução (horas) das síndromes coronária agudas (IAM e AI) nos tempos de (≤ 12 hs), (>12 ≤ 24 hs), (>24 ≤ 36 hs), (>36 ≤ 48 hs) e (> 48hs) após o início das síndromes coronárias agudas (IAM e AI). Resultados expressados como mediana. LDL⁻: p= 0,3025; Anti LDL⁻: p= 0,8255.

5. DISCUSSÃO

A determinação da LDL⁻ plasmática tem despertado interesse quanto à possibilidade de sua utilização como uma forma de avaliação da oxidação de LDL *in vivo* (MORO et al., 1999; SANCHEZ-QUEZADA et al., 2002), um processo de importância reconhecida em várias etapas da doença aterosclerótica (STEINBERG, 1997; NAVAB et al., 2002). Para estudar o comportamento da LDL⁻ em indivíduos com síndromes coronária agudas e crônica foi utilizado um ELISA baseado no anticorpo monoclonal murino mAb3D1036, dirigido contra epítomos da LDL⁻ (DAMASCENO, 2001). Adicionalmente, os níveis séricos de autoanticorpos anti LDL⁻ também foram determinados através de um segundo ELISA, que utilizou como antígeno a LDL⁻ isolada a partir de plasma humano. Ambos ensaios foram realizados diretamente no plasma obtido dos indivíduos estudados sem isolamento prévio da fração de LDL.

As concentrações de LDL⁻ estavam significativamente elevadas em indivíduos com síndromes coronária agudas e crônica, principalmente naqueles acometidos por infarto agudo do miocárdio, já que o valor mediano da LDL⁻ deste subgrupo foi praticamente o dobro daquele dos controles. Estes dados sugerem uma provável associação da LDL⁻ com tais eventos clínicos e podem contribuir para reforçar as evidências já existentes do envolvimento de partículas de LDL modificadas na doença cardiovascular e auxiliar na diferenciação entre indivíduos com e sem doença arterial coronária.

Em relação às síndromes coronárias, os mecanismos de produção, assim como os locais de formação da LDL⁻ ainda estão indefinidos e os resultados obtidos neste estudo sugerem a ausência de vínculos diretos de um ou de outro com o metabolismo lipídico, no que diz respeito aos níveis plasmáticos de lipídeos e lipoproteínas, uma vez que não foi possível demonstrar qualquer correlação entre a concentração de LDL⁻

com o colesterol total, colesterol-LDL, colesterol-HDL, triacilgliceróis ou Apo B. Além disso, o uso de estatinas, que atuam inibindo o metabolismo do colesterol (LIBBY & AIKAWA, 2003), aparentemente não produziu efeito redutor significativo sobre as concentrações plasmáticas da LDL⁻.

É digno de nota que parte do efeito anti-aterogênico da HDL tem sido atribuído à sua capacidade em inibir a oxidação da LDL devido à ação da ApoA1 e de enzimas associadas, como a paraoxonase e a acetil-hidrolase do fator ativador de plaquetas, entre outras (WATSON et al., 1995; NAVAB et al., 1996; NAVAB et al., 2002). De fato, experimentos têm mostrado que estes componentes da HDL podem inibir a oxidação de fosfolipídeos da LDL e evitar a formação de LDL minimamente oxidada (MM-LDL) (BERLINER et al., 1995), que é a contrapartida *in vitro* da LDL⁻ (SANCHEZ-QUEZADA et al., 2002). No presente estudo, no entanto, esta atividade protetora da HDL não foi evidenciada, considerando-se que uma correlação inversa entre as concentrações de LDL⁻ e colesterol HDL não foi demonstrada. Dados semelhantes foram obtidos por SHOJI et al., 2000 em um estudo abordando a Ox-LDL em indivíduos saudáveis. Portanto, mesmo considerando as limitações do estudo em relação ao número de indivíduos estudados, é possível supor que pelo menos parte da LDL⁻ tenha sido produzida fora da circulação sanguínea com tráfego posterior até o compartimento vascular, uma vez que as evidências para uma produção sistêmica de LDL⁻ baseadas em suas correlações com os lipídeos sanguíneos não puderam ser demonstradas. Observações similares têm sido feitas em relação à Ox-LDL (HOLVOET et al., 1999), e como a LDL⁻ aparentemente representa um estágio inicial de modificação da Ox-LDL (TSIMIKAS & WITZTUM, 2001), parece possível aplicar a mesma interpretação em relação à LDL⁻.

Além da parede arterial, considerado o local mais indicado da ocorrência de alterações da LDL (SANCHEZ-QUEZADA et al., 2002), outras prováveis fontes de LDL oxidativamente modificadas podem ser as placas ateroscleróticas rotas ou permeáveis, as lesões isquêmicas do miocárdio ou mesmo sítios remotos de produção, sendo que, pelo menos

nas síndromes coronárias agudas, parece provável que exista a contribuição simultânea de todos estes locais (TSIMIKAS & WITZTUM, 2001). Condições adversas potencializadas em tais locais, como inflamação e oxidação, por exemplo, poderiam contribuir para a produção de LDL^o, principalmente via produção de radicais livres. Deste modo, a LDL^o plasmática, que tem sido considerada uma forma circulante de LDL minimamente oxidada (TSIMIKAS & WITZTUM, 2001), poderia ser entendida como um "reflexo" plasmático dos processos de modificação da LDL em ação nos locais previamente citados.

As elevações das atividades plasmáticas da CK e CKMB contribuíram para o diagnóstico da maioria dos casos (76%) de infarto agudo do miocárdio e somente 5 entre 21 pacientes não mostraram resultados compatíveis com a suspeita clínica. Destes, 1 paciente teve sua amostra coletada com aproximadamente 6 horas de evolução do evento, período onde a atividade enzimática pode ainda estar não estar elevada acima dos valores de referência (APPLE & HENDERSON, 1999), enquanto outros 2 pacientes, ao contrário, tiveram suas amostras coletadas depois de 72 horas do provável início do infarto agudo do miocárdio, quando os níveis de atividade já poderiam ter retornado para valores considerados normais (APPLE & HENDERSON, 1999). Para os outros 2 pacientes infartados sem as esperadas elevações da CK ou CKMB, não foram evidenciadas possíveis interferências temporais sobre os resultados e outros fatores devem ter contribuído para os níveis enzimáticos normais, mesmo na vigência de um quadro de infarto agudo do miocárdio.

A correlação entre a atividade plasmática de CKMB, um marcador bioquímico clássico de lesão miocárdica (APPLE & HENDERSON, 1999), e a LDL^o poderia indiretamente demonstrar a relação entre a extensão do infarto e as concentrações de LDL^o, porém, no estudo atual, não foi verificada associação significativa entre estes parâmetros e apenas uma tendência de correlação entre CKMB e LDL^o foi constatada, deixando, pelo menos por esta abordagem, ainda obscura uma possível relação entre a LDL^o e a lesão do miocárdio. É possível que a utilização de um marcador de

necrose miocárdica com melhor desempenho em termos de sensibilidade e especificidade, como a Troponina I (APPLE & HENDERSON, 1999; KEARNEY, 2000), talvez lograsse êxito em estabelecer tal correlação. De fato, um estudo prévio de HOLVOET, COLLEN & VAN de WERF, (1999), demonstrou que determinações simultâneas das concentrações de Ox-LDL e Troponina I tiveram sensibilidade e especificidade adequadas para diagnosticar síndromes coronárias agudas.

Indivíduos com síndromes coronárias agudas (infarto agudo do miocárdio e angina instável), aos quais se atribui instabilidade e ruptura de placas (DAVIES, 1996), não apresentaram diferenças significativas nos níveis de LDL⁻ em relação aos indivíduos com síndrome coronária crônica (angina estável), onde as placas possuem maior estabilidade e rupturas não são comuns (DAVIES, 1996). Além disso, quando comparados individualmente, os subgrupos de indivíduos com infarto agudo do miocárdio, angina instável ou angina estável também não se diferenciaram significativamente quanto às concentrações plasmáticas de LDL⁻. A falta de diferenciação entre as síndromes coronárias agudas e a síndrome coronária crônica no que diz respeito à LDL⁻ não permitiu, pelos dados obtidos neste estudo, que fosse estabelecida uma associação entre o aumento da concentração de LDL⁻ e uma hipotética liberação súbita de LDL⁻ devido ao rompimento e/ou "surto" de atividade das placas instáveis que ocorrem no infarto agudo do miocárdio e angina instável, mas não na angina estável (LIBBY, 2001).

A proteína C reativa (PCR) é um marcador sensível de inflamação e dano tecidual (KINLAY & SELWYN, 2003; PEPYS & HIRSCHFELD, 2003) e, no que diz respeito à aterosclerose, representa a integração de toda uma cadeia de ativação de citocinas, principalmente IL 1, TNF α e IL 6, envolvidas tanto com a aterogênese como com as manifestações clínicas da doença (YU & RIFAI, 2000; LIBBY, RIDKER & MASERI, 2002). Apesar de seu caráter inespecífico, devido aos avanços metodológicos no seu doseamento (PEPYS & HIRSCHFELD, 2003), assim como características de estabilidade, meia vida, independência do ciclo

cardiano, sexo e idade entre outras, a PCR têm sido considerada um marcador biológico com bom valor preditivo para o risco de eventos cardiovasculares iniciais ou recorrentes (HAMM, 2001; PLENGE et al, 2002; PEPYS & HIRSCHFIELD, 2003; YEH & WILLERSON, 2003). Além disso, esta proteína de fase aguda parece ter participação direta nos processos aterogênicos a partir da produção de peptídeos imunomodulatórios (YU & RIFAI, 2000; YEH & WILLERSON, 2003). No presente estudo não foi verificada associação significativa entre as concentrações de PCR e LDL⁻, não sendo possível, portanto, estabelecer uma correlação entre a produção de LDL⁻ com fatores locais ou sistêmicos através de uma abordagem pelo quadro agudo ou inflamatório representados pelos valores de PCR. Entretanto, estudos prévios têm relatado a importância da inflamação intra e extraplaca em acelerar a evolução do ateroma e de eventos coronários (LIBBY, RIDKER & MASERI, 2002) assim como a presença de LDL oxidativamente modificadas em placas de indivíduos com síndromes coronárias agudas (EHARA et al., 2001). Portanto, deve-se aqui igualmente considerar o pequeno número de indivíduos estudados como provável fator responsável pela ausência de correlação entre os parâmetros analisados, assim como a complexidade nas relações entre PCR e a LDL⁻. Por exemplo, na presença de um estímulo de fase aguda, como nas síndromes coronárias agudas, a PCR sofre elevações que podem chegar a 10.000 vezes o seu valor basal, atingindo o pico em 48 horas e decaindo rapidamente depois de cessada a agressão (PEPYS & HIRSCHFIELD, 2003). A LDL⁻, por sua vez, mostrou variações muito mais discretas entre os menores e os maiores valores nos indivíduos estudados e, apesar de significativamente elevada nas síndromes coronárias agudas, a sua produção, ao contrário da PCR, aparentemente não está submetida a alterações drásticas e ocorre de forma mais contínua, considerando-se que, como citado anteriormente, parecem não ocorrer picos de liberação de LDL⁻. Isto parece atribuir características temporais diferentes a ambos quanto à sua utilidade como marcadores biológicos no estudo dos eventos

inflamatórios relacionados com as síndromes coronárias, principalmente nas suas formas agudas.

Quatro dos principais fatores de risco para a aterosclerose e eventos cardiovasculares resultantes são o tabagismo, a hipertensão arterial, o diabetes mellitus e altas taxas de colesterol. A associação entre o tabagismo e a aterosclerose está bem estabelecida e foi demonstrada já na década de 60. Vários mecanismos de ação têm sido propostos desde então, a maioria relacionados a efeitos deletérios ao endotélio arterial de fumantes incluindo a hipóxia causada pela formação de carboxi-hemoglobina, o aumento da permeabilidade à LDL, lesões mediadas pela liberação de catecolaminas, aumento da atividade protrombótica do plasma e modificações oxidativas da LDL (PECH-AMSELLEM et al., 1996; GIANNINI, 1998). PECH-AMSELLEM et al., (1996) relataram que células endoteliais de fumantes oxidaram a LDL mais intensamente que células endoteliais de não fumantes o que resultou em aumento significativo na fração de LDL com maior eletronegatividade (39% em média comparado com 14% em média nos não fumantes). No presente estudo, com apenas 7 indivíduos entre 63 sendo identificados como fumantes, a presença do tabagismo como fator capaz de alterar a concentração de LDL⁻ não pode ser evidenciada, uma vez que não ocorreu diferença significativa das concentrações de LDL⁻ no tabagismo em relação à LDL⁻ produzida na ausência deste fator de risco.

A hipertensão arterial, outro importante fator de risco, correlacionado com a aterosclerose, parece participar não apenas da aterogênese mas também da desestabilização e ruptura das placas (FALK, SHAH & FUSTER, 1995; GIANNINI, 1998). Hipertensão e hiperlipidemia são fatores freqüentemente associados em indivíduos portadores de aterosclerose e parecem compartilhar, pelo menos em parte, de mecanismos comuns para iniciar e potencializar o processo aterosclerótico. Um destes mecanismos aparentemente envolve a produção de estresse oxidativo na parede arterial, levando à indução de um grupo de genes pró-inflamatórios sensíveis às alterações do estado de oxido-redução nas células endoteliais. Tal resposta do endotélio em combinação com a própria

hiperlipidemia pode dar origem à placa aterosclerótica (ALEXANDER, 1995). Apesar de ainda não bem estabelecido, parece provável que o estresse oxidativo favoreça a produção de LDL⁻, considerando-se que as proporções de LDL⁻ encontraram-se aumentadas após o exercício físico e em indivíduos com doença cardiovascular (SEVANIAN, ASATRYAN & ZIOUZENKOVA, 1999). No entanto, nos indivíduos analisados neste estudo, não foi possível demonstrar associação entre a hipertensão e a produção de LDL⁻, pelo fato de não ter sido demonstrado aumento das concentrações de LDL⁻ nos indivíduos portadores deste fator de risco. Porém, deve-se considerar que aproximadamente metade dos indivíduos hipertensos estudados (13 em 27) encontravam-se no subgrupo de pacientes portadores de angina estável que, devido às características evolutivas da doença, foi composto em sua maioria por indivíduos sob acompanhamento médico mais prolongado, principalmente no que diz respeito às terapias anti-hipertensiva e hipolipemiante (84% utilizavam estatinas), as quais poderiam ter efeitos diretos ou indiretos sobre aqueles mecanismos de produção de LDL⁻ possivelmente relacionados com a hipertensão e a hiperlipidemia. De fato, vários autores têm relatado a existência de efeitos adicionais ou pleiotrópicos das estatinas baseados principalmente em evidências experimentais em animais e em estudos *in vitro* (PLENGE et al., 2002; LIBBY & AIKAWA, 2003). Independente de sua origem, medicamentosa ou dietética, os efeitos da redução do colesterol sobre a doença aterosclerótica aparentemente vão além do seu aspecto sistêmico relacionado ao metabolismo lipídico. LIBBY & AIKAWA, (2003) relataram que a diminuição dos níveis de colesterol provocou alterações quantitativas discretas nas lesões ateroscleróticas estabelecidas em animais, porém, foram observadas mudanças qualitativas importantes relacionadas principalmente ao aumento de estabilidade das placas. Segundo os autores, contribuíram para isto: (1) a redução da atividade proteolítica das metaloproteinases da matriz e o aumento do colágeno intersticial; (2) a diminuição do número de macrófagos e a maior maturação de células de músculo liso; (3) diminuição da expressão de fator tecidual e

seu indutor (ligante do CD40) por macrófagos e células de músculo liso e (4) diminuição do estresse oxidativo levando à menor liberação de mediadores inflamatórios, como a VCAM e o MCP-1, relacionados com o recrutamento de leucócitos.

O diabetes mellitus é um fator de risco independente para a aterosclerose, aumentando o risco para o desenvolvimento da doença e suas seqüelas em 2 a 3 vezes nos indivíduos portadores e mais ainda em mulheres (GIANNINI, 1998). Pelo menos em parte, isto têm sido relacionado à produção de LDL mais aterogênica nos diabéticos, onde estas partículas têm mostrado catabolismo mais lento, reconhecimento por receptores *scavenger* e aumento da fração menor e mais densa da LDL (GIANNINI, 1998; SANCHEZ-QUESADA et al., 2000). A hiperglicemia tem sido responsabilizada por modificações na LDL não só através da glicação não enzimática da ApoB, mas também pela oxidação resultante do estresse oxidativo gerado pela autooxidação da glicose. Ambos, glicação e oxidação da LDL, foram relacionados ao aumento da proporção de LDL^o encontrada em diabéticos (MORO et al., 1999). De fato, um estudo de SANCHEZ-QUESADA et al. (2001) demonstrou que a produção de LDL^o em indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 deveu-se provavelmente à glicação não enzimática, enquanto que no diabetes mellitus tipo 2 a causa predominante teria sido a lipoperoxidação. No entanto, no presente estudo, cujo grupo de diabéticos foi constituído por apenas 10 indivíduos com diabetes mellitus tipo 2, não foi possível atribuir a este fator de risco a capacidade de potencializar a produção de LDL^o em seus portadores.

Conforme descrito em nossa Casuística, as amostras dos indivíduos com síndromes coronária agudas foram obtidas sem a realização de jejum prévio. Para avaliar a possível interferência desta condição sobre o perfil lipídico, uma segunda amostra foi coletada após um período médio de internação de 5 dias com a observação de 12 horas de jejum. Ocorreram diminuições significativas entre o colesterol total, colesterol LDL e ApoB da primeira em relação à segunda amostra (dados não mostrados), no entanto, independente do jejum, tais reduções são esperadas após as síndromes

isquêmicas e as concentrações costumam se restabelecer somente após 8 semanas do evento (FALUDI, 2001; MARANHÃO, 2001). Por outro lado, as concentrações de triacilgliceróis, colesterol HDL e colesterol VLDL não mostraram variação significativa entre as amostras obtidas na ausência ou presença de jejum (dados não mostrados). Desta maneira, pelo menos no que diz respeito aos lipídeos plasmáticos, a ausência de jejum aparentemente não provocou interferência significativa.

A relação entre colesterol e aterosclerose há muito já foi estabelecida e portadores de colesterol total e/ou LDL-colesterol (c-LDL) elevados são mais susceptíveis ao desenvolvimento da doença (GIANNINI, 1998). No atual estudo, os indivíduos com taxas de colesterol total e/ou c-LDL elevadas produziram as maiores concentrações de LDL⁻ em valores absolutos, no entanto estas não se diferenciaram significativamente daquelas dos indivíduos normolipêmicos ou com valores limítrofes de colesterol total e c-LDL. Deste modo, a partir dos dados disponibilizados, não foi evidenciada a influência de níveis de colesterol total ≥ 240 mg/dl e c-LDL ≥ 160 mg/dl na produção de LDL⁻. Da mesma forma, CAZZOLATO, AVOGARO & BITTOLO-BOM (1991), trabalhando com indivíduos normolipêmicos também relataram a ausência de associação significativa entre as concentrações de colesterol total e c-LDL com as proporções relativas de LDL⁻. No entanto, embora os estudos citados não tenham evidenciado uma ligação entre o colesterol total e c-LDL plasmáticos com a concentração relativa de LDL⁻, esta relação parece importante e poderia ir além daquela que diz respeito apenas aos mecanismos de produção da LDL⁻. Considerando-se o caráter pró-inflamatório da LDL⁻ em induzir a liberação de IL-8 e MCP-1 por células endoteliais (SANCHEZ-QUEZADA et al., 2002), a combinação de concentrações aumentadas desta lipoproteína junto aos níveis elevados de colesterol total e/ou c-LDL poderiam de alguma forma potencializar tanto a aterogênese como o risco de eventos cardiovasculares, visto que estes eventos têm sido associados à inflamação. De fato, indivíduos com níveis de colesterol aumentados devido à hipercolesterolemia familiar, e que são reconhecidamente submetidos a um

maior risco aterosclerótico, mostraram proporções de LDL⁻ três vezes maiores que indivíduos normolipêmicos (SANCHEZ-QUESADA et al., 1999; SANCHEZ-QUEZADA et al, 2002). Quando tratados com estatinas, estes indivíduos mostraram uma rápida redução de 40% da proporção de LDL⁻ em relação à LDL total depois do primeiro mês de tratamento mas com uma diminuição contínua até o sexto mês quando a redução chegou a 60%. No estudo atual, porém, as concentrações de LDL⁻ em indivíduos com síndromes coronárias agudas e crônicas aparentemente não sofreram alteração devido ao uso de estatinas. A presença ou ausência do medicamento produziram concentrações de LDL⁻ que diferiram em 6% apenas, não permitindo portanto, a suposição de uma ação efetiva das estatinas em reduzir a produção de LDL⁻, considerando-se os dados obtidos.

Como citado anteriormente, parte dos efeitos antiaterogênicos da terapia com estatinas aparentemente devem-se a mecanismos não relacionados com a redução do colesterol. Tais efeitos, denominados pleiotrópicos, têm sido atribuídos ao fato de que a inibição da HMG-CoA redutase pelas estatinas resulta, além da redução da síntese de colesterol, na modulação de outras substâncias produzidas pela mesma via biossintética (LIBBY, 2001.). Entre outras, têm sido relatado a provável inibição da síntese dos intermediários isoprenóides pirofosfato de farnesil e pirofosfato de geranylgeranyl, que são compostos envolvidos com reações de sinalização intracelular. Os efeitos pleiotrópicos relacionados com estas ações das estatinas incluíram melhoria da função endotelial pela indução da óxido nítrico sintetase endotelial, ação antiinflamatória e ação antitrombótica (LIBBY & AIKAWA, 2003). No entanto, ainda existem muitas controvérsias sobre este tema principalmente no que diz respeito às suas aplicações clínicas, uma vez que a maioria dos dados sobre tais efeitos foram obtidos em experimentos delineados com concentrações de estatinas muito acima daquelas de uso terapêutico atual (LIBBY, 2001; LIBBY & AIKAWA, 2003).

O número de fatores de risco é importante para a estratificação do risco em pacientes submetidos à avaliação clínica para o diagnóstico e/ou tratamento da aterosclerose e suas complicações

(GIANNINI, 1998; LOURES, 2001). No entanto, entre os indivíduos com síndromes coronárias agudas ou crônica estudados, o acúmulo de fatores de risco não evidenciou a ocorrência de um possível efeito sinérgico sobre a produção de LDL⁻, considerando-se que a presença concomitante de até 3 fatores de risco não resultou em valores de LDL⁻ significativamente diferentes daqueles encontrados em indivíduos sem qualquer fator de risco identificado.

Considerando o doseamento da LDL⁻ como uma avaliação direta da presença desta lipoproteína no plasma, a determinação dos níveis de autoanticorpos anti LDL⁻, por sua vez, mede indiretamente este tipo de LDL modificada circulante. Em certas circunstâncias, os autoanticorpos também podem permitir o estudo de um determinado processo de interesse mesmo que este tenha ocorrido além dos limites da circulação sanguínea, fazendo com que desta maneira os autoanticorpos também sejam considerados marcadores da modificação da LDL inclusive no nível de tecidos ou células (INOUE et al., 2001).

Os níveis de autoanticorpos mostraram-se significativamente mais elevados em indivíduos acometidos de síndromes coronárias agudas do que em indivíduos com síndrome coronária crônica (AE) e controles. Além disso, considerados em conjunto, os níveis de autoanticorpos em indivíduos infartados ou com angina instável estavam 107% mais elevados que aqueles encontrados em indivíduos com angina estável permitindo, por esta abordagem, a diferenciação entre os quadros agudos ou crônico das síndromes coronárias. Isto parece sugerir que a ativação do sistema imune pela LDL⁻ ocorre de maneira mais intensa durante a instabilidade ou ruptura das placas devido provavelmente à maior produção e/ou maior exposição dos epítopos relacionados à LDL⁻ que resultam na produção de autoanticorpos. Além da própria LDL⁻, epítopos de fosfolípídeos oxidados presentes nas membranas celulares de miócitos necróticos ou apoptóticos poderiam contribuir como estímulo adicional para a produção de autoanticorpos (TSIMIKAS et al., 2003). O número de lesões angiograficamente identificáveis em indivíduos com síndromes coronárias

agudas e crônicas aparentemente não influenciou o nível de autoanticorpos. Estes resultados foram semelhantes àqueles relatados por um estudo dos títulos de autoanticorpos anti Ox-LDL realizado em pacientes com doença arterial coronária por INOUE et al., (2001). Estas informações aparentemente sugerem que os aspectos qualitativos da lesão, mais do que a quantidade destas, contribuem de forma importante para a indução de autoanticorpos anti LDL⁻ e, sob estes aspectos, os autoanticorpos anti LDL⁻ poderiam ser utilizados como marcadores da instabilidade das placas ateroscleróticas.

Os tipos de modificação da LDL, assim como a natureza bioquímica dos epítomos que induzem a autoimunidade *in vivo*, ainda não foram totalmente esclarecidas. Por isso, várias formas de LDL modificadas *in vitro*, geralmente por reações oxidativas, assim como vários de seus constituintes alterados, têm sido eleitos como antígenos para a captura de autoanticorpos anti LDL⁻ ou para produção dos anticorpos utilizados na determinação da LDL⁻. Estudos prévios têm postulado que os epítomos da LDL minimamente modificada (MM-LDL) provavelmente são constituídos por fosfolipídeos oxidados (TSIMIKAS & WITZTUM, 2001) e para estudar os níveis de MM-LDL em pacientes com síndromes coronárias agudas, TSIMIKAS et al., (2003) utilizaram o anticorpo E06, um autoanticorpo clonado a partir de camundongos deficientes em ApoE e que é direcionado contra epítomos de fosfolipídeos oxidados contendo o grupo polar fosforilcolina (GETZ, 2001). Em contraste com os demais epítomos analisados em um estudo de indivíduos com infarto agudo do miocárdio, estes foram os únicos que se encontraram aumentados já nos primeiros dias do infarto, sugerindo uma liberação e/ou produção contínua destes epítomos possivelmente a partir das placas e/ou do miocárdio lesado (TSIMIKAS et al., 2003). Produtos oxidados derivados de fosfolipídeos e ésteres de colesterol oxidados contendo ácidos graxos poliinsaturados têm sido encontrados na LDL⁻ e conferido propriedades pro-inflamatórias a esta partícula (HIROSHI et al., 1998; EHARA et al., 2001; TSIMIKAS & WITZTUM, 2001; NAVAB et al., 2002). Além da porção lipídica, alterações

da ApoB ocorridas na LDL⁻, suficientes para promover a formação de novos epítomos, também parecem prováveis. De fato, GREILBERGER et al., (1999) relataram que a transformação *in vitro* da LDL nativa (nLDL) em MM-LDL provocou o aparecimento de novos epítomos em consequência da oxidação. Isto foi atribuído ao efeito imunogênico das alterações estruturais da ApoB provocada por interações com malonaldeído (MDA) ou 4-hidroxinonenal (4-HNE), dois aldeídos muito reativos produzidos pela fragmentação de peróxidos lipídicos. A importante participação do MDA na constituição de epítomos que induzem autoanticorpos anti LDL modificada também foi demonstrada por SHAW et al., (2001) através da clonagem do primeiro autoanticorpo humano anti Ox-LDL a partir de um indivíduo com doença cardiovascular que expressou altos níveis de autoanticorpos anti MDA-LDL.

A ausência de correlações demonstráveis entre as concentrações do colesterol total, c-LDL, c-HDL, triacilgliceróis e ApoB em relação aos níveis de anti LDL⁻ não permitiram o estabelecimento de uma relação de causa e efeito entre o metabolismo lipídico avaliado por estes parâmetros e a promoção ou prevenção da formação de autoanticorpos, ou seja, neste aspecto, os autoanticorpos anti LDL⁻ foram similares ao seu provável antígeno indutor, a LDL⁻.

Apesar da presença de autoanticorpos por si só não provar a existência de um determinado antígeno, ela é uma forte sugestão para tal e, de fato, neste estudo, uma correlação positiva significativa entre as concentrações de LDL⁻ e os níveis de autoanticorpos anti LDL⁻ foi demonstrada. No entanto, esta correlação não foi muito forte, como indicado pelo valor de 0,3860 para o coeficiente de correlação Spearman, sugerindo que, além da LDL⁻, outros fatores podem estar envolvidos no controle dos processos que determinam os níveis plasmáticos dos autoanticorpos anti LDL⁻. Ainda existem controvérsias sobre o papel antiaterogênico ou próaterogênico dos autoanticorpos dirigidos contra a LDL modificada (SHOJI et al., 1999; TSIMIKAS et al., 2003). Em indivíduos saudáveis, autoanticorpos dirigidos para fosfolípidos oxidados na LDL se

correlacionaram inversamente com a Ox-LDL e aparentemente têm função protetora (SHOJI et al., 1999), enquanto que em indivíduos com doença arterial coronária parecem se associar positivamente com a gravidade da doença (TSIMIKAS et al., 2003), sugerindo desta maneira uma modulação complexa e dependente das fases da aterosclerose. No presente estudo, uma grande similaridade foi observada no padrão de variação das concentrações de LDL⁻ e dos níveis de autoanticorpos anti LDL⁻ em relação ao tempo de evolução das síndromes coronárias agudas. Quando comparados, os perfis delineados por tais variações mostraram um interessante paralelismo que se manteve até 48 horas após o início do evento coronário. No entanto, as variações de concentração de LDL⁻ e níveis de autoanticorpos dentro do período avaliado, apesar da aparente oscilação mostrada, não demonstraram diferenças significativas. Considerados no conjunto, estes dados parecem reforçar a relação entre LDL⁻ e anti LDL⁻, assim como sugerir um certo equilíbrio entre mecanismos que determinam os níveis plasmáticos de ambos nesta fase da doença arterial coronária, ao menos dentro do período de tempo estudado.

Diferente do observado em relação à LDL⁻, a utilização da CKMB como um marcador associado com a lesão do miocárdio permitiu o estabelecimento de uma correlação positiva entre a atividade da enzima e os níveis de autoanticorpos anti LDL⁻. Isto parece sugerir uma provável contribuição das condições adversas das áreas lesadas na geração de epítomos de autoimunidade contra a LDL⁻. Além do estresse oxidativo provocado pela isquemia durante o infarto agudo do miocárdio, a reperfusão do tecido lesado resulta em produção adicional de radicais livres que potencializam a peroxidação de lipídeos na região afetada (SHOJI et al., 1999). Conseqüentemente, considerando que uma das possíveis origens de LDL⁻ é oxidativa (SEVANI, ASATRYAN & ZIOUZENKOVA, 1999), um incremento na indução dos autoanticorpos correspondentes poderia ser postulado.

De maneira similar ao que ocorreu com a CKMB, a demonstração de correlação positiva entre a concentração da PCR com os

níveis de autoanticorpos anti LDL⁻ em indivíduos com síndromes coronárias agudas ou crônicas e controles, poderia, ao menos circunstancialmente, sugerir a ocorrência de eventos comuns que resultaram em aumentos tanto da síntese hepática daquela proteína de fase aguda como da produção de LDL⁻, além de uma participação da PCR nos mecanismos moduladores da produção de autoanticorpos. De fato, como citado anteriormente, a PCR tem gerado discussão não só quanto à sua utilidade no diagnóstico e/ou prognóstico das síndromes coronária agudas e crônica, mas também devido às suas ações próinflamatórias, pelo menos parcialmente dependentes do complemento, que têm sido relatadas contribuírem tanto com a aterogênese como para a gravidade da lesão isquêmica do miocárdio (LIBBY, RIDKER & MASERI, 2002; PEPYS & HIRSCHFIELD, 2003; YEH & WILLERSON, 2003). Desta maneira, a correlação observada entre autoanticorpos anti LDL⁻ e a PCR poderia indicar, além de uma condição próinflamatória associada à produção de autoanticorpos, uma provável contribuição direta da PCR com mecanismos envolvidos no processo aterosclerótico e também com a antigenicidade da LDL, visto que a PCR tem sido mostrada com capacidade de ligar-se à LDL, especialmente à LDL modificada (PEPYS & HIRSCHFIELD, 2003).

Os fatores de risco tradicionais da aterosclerose abordados junto aos indivíduos com síndromes coronárias agudas e crônicas aparentemente não contribuíram, isolada ou coletivamente, para diferenciar significativamente os níveis de autoanticorpos anti LDL⁻ entre portadores e não portadores, apesar de que em números absolutos, os não portadores do fator de risco sempre mostrarem medianas mais elevadas dos níveis de autoanticorpos que os portadores. Em função do número de indivíduos avaliados, houve limitações para interpretações mais conclusivas. Entretanto, SHERER et al. (2001), têm postulado que a resposta humoral dirigida à LDL modificada pode variar dependendo da fase da doença e que em pacientes com aterosclerose avançada, como é o caso do grupo em estudo, tal resposta imune já estaria potencializada independente dos

fatores de risco, de modo que a presença ou ausência destes não resultaria em alterações detectáveis nos níveis de autoanticorpos.

A associação verificada entre o uso de estatinas e níveis mais baixos de autoanticorpos anti LDL⁻ em indivíduos com síndromes coronárias agudas ou crônica parece sugerir uma possível ação modulatória sobre a produção de anticorpos independente da redução do antígeno. Isto talvez tenha ocorrido pelo fato da diminuição dos níveis de autoanticorpos aparentemente não ter sido provocada pela redução da concentração de LDL⁻, visto que esta não mostrou valores significativamente inferiores em usuários de estatinas. Os diversos relatos apontando os efeitos pleiotrópicos das estatinas (LIBBY, 2001; LIBBY & AIKAWA, 2003), assim como o trabalho de PLENGE et al., (2002), onde foi demonstrado que o uso de estatinas durante apenas 14 dias reduziu a PCR independente de efeitos no c-LDL, parecem de fato indicar a capacidade antiinflamatória como um dos efeitos adicionais destes medicamentos. No atual estudo também foi possível verificar uma concentração mediana de PCR 22% menor em usuários de estatinas (dados não mostrados), entretanto, para o número de indivíduos analisados, tais valores não foram significativamente diferentes em relação aos dos não usuários.

6. CONCLUSÃO

Um estudo direto e indireto da LDL⁻ plasmática mostrou que, apesar de indivíduos sem aterosclerose clinicamente identificada também produzirem LDL⁻ assim como autoanticorpos anti LDL⁻, indivíduos com síndromes coronárias, principalmente infarto agudo do miocárdio e angina instável têm níveis mais elevados desta fração de LDL modificada e de seus respectivos autoanticorpos. Os dois parâmetros variaram paralelamente na

circulação por pelo menos 48 horas e mantiveram níveis estáveis, sendo que a correlação com certos componentes da doença aterosclerótica, como lesão tecidual, inflamação e instabilidade das placas, foi mais bem demonstrada através da resposta imune dirigida para a LDL⁻, via produção de autoanticorpos, em comparação ao próprio antígeno. Fatores de risco tradicionais da aterosclerose e número de lesões não foram diferenciais e esta independência pode ser uma característica interessante para um marcador biológico relacionado com aterosclerose. Devido a estes aspectos, o doseamento da LDL⁻ e/ou determinação dos níveis de anti LDL⁻ poderiam auxiliar na diferenciação entre a presença ou ausência de síndromes clínicas da aterosclerose assim como contribuir para o entendimento dos processos envolvidos no seu início e progressão. Estudos com maior número de indivíduos, avaliação simultânea com outros marcadores e aperfeiçoamento nos métodos analíticos utilizados deverão dar uma melhor definição da utilidade da LDL⁻ e de seus autoanticorpos como marcadores biológicos para síndromes coronárias agudas e crônicas.

7. ANEXOS

Anexo 1. Características Gerais do Grupo Estudado

A. Características gerais de pacientes com infarto agudo do miocárdio

Amostra	Idade (a)	Sexo	Tempo	Lesões	TB	HA	DM	EST
7	82	M	24	1	N	N	N	N
8	50	M	168	3	N	N	S	S
9	46	F	120	1	N	N	N	S
14	79	F	120	3	N	N	N	N
18	78	M	48	5	N	S	N	N
19	68	M	7	6	S	N	S	N
21	77	M	42	2	N	N	N	N
22	45	M	16	3	S	S	N	N
23	52	F	4	5	N	N	N	N
31	73	F	48	3	N	N	N	S
32	63	M	10	1	N	S	N	N
38	77	M	21	2	N	S	S	N
39	74	F	24	2	N	S	N	S
47	41	M	18	2	N	N	N	N
53	58	M	28	1	N	S	N	N
56	70	F	36	2	N	N	N	N
62	73	M	6	3	N	N	S	S
64	82	F	9	1	N	S	N	N
65	33	F	36	3	N	S	S	N
70	64	M	24	4	S	S	N	S
80	60	M	24	2	N	N	N	N

Tempo: horas a partir do início dos sintomas

Lesões: nº de lesões angiograficamente detectáveis

TB: tabagismo atual

HA: hipertensão arterial

DM: diabetes mellitus

EST: uso de estatinas

N: ausência do fator avaliado

S: presença do fator avaliado

B. Características gerais dos pacientes com angina instável

Amostra	Idade (a)	Sexo	Tempo	Lesões	TB	HA	DM	EST
5	78	M	24	2	N	S	S	S
6	85	M	20	3	S	S	N	S
10	38	M	NE	4	N	S	N	N
11	81	F	NE	2	N	N	N	S
20	77	F	240	4	N	S	N	S
49	82	F	24	5	N	S	S	N
74	51	M	33	3	N	N	N	S
78	59	F	9	4	N	N	N	S

Tempo: horas a partir do início dos sintomas

Lesões: nº de lesões angiograficamente detectáveis

TB: tabagismo atual

HA: hipertensão arterial

DM: diabetes mellitus

EST: uso de estatinas

N: ausência do fator avaliado

S: presença do fator avaliado

NE: não estabelecido

C. Características gerais dos pacientes com angina estável

Amostra	Idade (a)	Sexo	Tempo	Lesões	TB	HA	DM	EST
1	47	M	NA	1	N	S	N	S
2	65	M	NA	2	N	S	N	S
3	50	M	NA	2	N	S	N	S
4	50	M	NA	2	N	S	N	S
5	55	F	NA	3	N	S	S	S
6	64	M	NA	1	N	S	N	S
7	49	M	NA	ND	S	S	S	S
8	65	M	NA	2	S	S	N	S
9	50	M	NA	3	N	N	N	N
10	54	M	NA	3	N	S	N	S
11	51	M	NA	2	N	N	N	S
12	73	F	NA	3	S	S	S	N
12	59	F	NA	3	N	S	N	S
13	50	M	NA	1	N	S	N	S
15	55	M	NA	3	N	N	N	S
16	63	M	NA	3	N	N	N	S
17	80	F	NA	4	N	S	N	S
35	72	M	NA	2	N	N	N	N
44	72	M	NA	2	N	N	N	S

Lesões: nº de lesões angiograficamente detectáveis

TB: tabagismo atual

HA: hipertensão arterial

DM: diabetes mellitus

EST: uso de estatinas

N: ausência do fator avaliado

S: presença do fator avaliado

NA: não avaliado

ND: não disponível

D. Características gerais do grupo controle

Amostra	Idade (a)	Sexo	Lesões	TB	HA	DM	EST
13	67	M	0	N	N	N	N
14	66	M	0	N	N	N	N
15	55	F	0	N	N	N	N
18	53	F	0	N	N	N	N
20	55	M	0	N	N	N	N
21	58	M	0	N	N	N	N
22	58	F	0	N	N	N	N
23	51	F	0	N	N	N	N
24	63	F	0	N	N	N	N
25	68	F	0	N	N	N	N
27	56	F	0	N	N	N	N
29	52	M	0	N	N	N	N
30	57	M	0	N	N	N	N
31	65	M	0	N	N	N	N
32	58	M	0	N	N	N	N

Lesões: nº de lesões angiograficamente detectáveis

TB: tabagismo atual

HA: hipertensão arterial

DM: diabetes mellitus

EST: uso de estatinas

N: ausência do fator avaliado

S: presença do fator avaliado

Anexo 2. Parâmetros Bioquímicos do Grupo Estudado

A. Parâmetros bioquímicos dos pacientes com infarto agudo do miocárdio

Amostras	CPK (U/l)	CKMB (U/l)	AST (U/l)	LDH (U/l)	COL mg/dl	c-HDL mg/dl	c-VLDL mg/dl	c-LDL mg/dl	TRIG mg/dl	ApoB µg/ml	PCR mg/l	LDL µg/ml	Anti LDL ⁻ ABS 405 nm
7	1004	98	295	522	121	32	10,4	78,6	52	750	35,6	37,06884	1,1915
8	174	2	24	128	202	35	13,8	153,2	69	1147	47,2	47,56562	0,906
9	44	1	26	260	101	25	9,2	66,8	46	634	9,44	36,34807	0,9175
14	1834	129	283	550	210	63	14,8	132,2	74	932	7,28	50,46695	1,304
18	901	29	108	204	94	22	11	61	55	617	1,48	56,2468	1,231
19	1237	92	138	274	158	39	30,2	88,8	151	802	0,85	104,1826	1,4035
21	85	5	51	179	184	47	25,6	111,4	128	947	19	73,62283	0,963
22	7649	351	638	1090	132	23	53	56	265	760	15,5	78,02956	1,315
23	249	9	28	159	177	50	22,2	104,8	111	854	2,78	30,82825	1,289
31	1218	58	264	826	189	30	24,6	134,4	123	1129	128,7	60,63528	0,9605
32	3010	80	78	519	113	20	47	46	235	558	299,9	41,84508	1,5735
38	2193	123	323	670	168	30	27,8	110,2	139	901	13,6	72,69221	1,07
39	1477	90	375	928	237	41	22,6	173,4	113	1290	3,76	107,905	1,238
47	640	27	75	244	172	29	42,6	100,4	213	1087	4,53	22,42535	1,3315
53	660	31	31	330	190	44	10,6	135,4	53	864	5,12	35,41289	0,5945
56	2259	193	193	404	179	34	28	117	140	885	7,91	69,18872	1,5835
62	70	2	2	120	238	15	48,8	174,2	244	1280	2,22	34,82441	0,493
64	1767	181	231	355	212	69	19,4	123,6	97	932	3,55	18,74394	0,4895
65	250	6	53	195	174	29	44	101	220	1020	2,27	19,29136	0,7225
70	783	46	115	359	262	36	32,8	193,2	164	1465	17,2	22,63148	0,803
80	189	7	111	497	165	17	26	122	130	999	171,1	26,75909	0,3405

B. Parâmetros bioquímicos dos pacientes com angina instável

Amostras	CPK (U/l)	CKMB (U/l)	AST (U/l)	LDH (U/l)	COL mg/dl	c-HDL mg/dl	c-VLDL mg/dl	c-LDL mg/dl	TRIG mg/dl	ApoB µg/ml	PCR mg/l	LDL µg/ml	Anti LDL ⁻ ABS 405 nm
5	109	3	23	183	213	29	28,6	155,4	143	1290	10,8	55,72218	0,1567
6	74	7	20	147	132	30	30,6	71,4	153	825	0,67	43,88422	1,143
10	174	2	24	128	202	35	13,8	153,2	69	1228	5,51	34,30437	1,269
11	14	1	32	227	164	22	32,6	109,4	163	1004	135	40,70918	1,364
20	60	1	63	178	173	43	48	82	240	844	6,33	69,6672	1,0945
49	99	33	28	156	186	31	25,6	129,4	128	973	3,53	33,44218	1,467
74	81	7	28	163	223	41	30,8	151,2	154	1040	6,7	20,19461	0,531
78	15	1	10	87	137	21	22,8	93,2	114	812	136	26,66785	0,7765

C. Parâmetros bioquímicos dos pacientes com angina estável

Amostras	CPK (U/l)	CKMB (U/l)	AST (U/l)	LDH (U/l)	COL mg/dl	c-HDL mg/dl	c-VLDL mg/dl	c-LDL mg/dl	TRIG mg/dl	ApoB µg/ml	PCR mg/l	LDL µg/ml	Anti LDL ⁻ ABS 405 nm
1	68	4	34	121	206	42	NC	NC	457	1186	1,11	28,54277	0,527
2	84	2	27	204	217	43	28,8	145,2	144	1118	13,2	36,09717	0,3645
3	82	8	48	180	168	42	29,8	96,2	149	802	2,41	29,25441	0,394
4	89	5	21	139	152	42	19,2	90,8	96	644	9,1	35,01601	0,6925
5	34	1	6	148	179	40	25,6	113,4	128	797	1,23	38,28685	0,543
6	117	4	21	142	150	29	25,8	95,2	129	797	1,05	50,94594	0,331
7	245	1	23	148	149	36	23	90	115	750	2,25	42,63884	0,4415
8	118	4	18	166	205	52	30,8	122,2	154	880	0,74	65,1515	0,37
9	187	6	27	102	201	37	19,4	144,6	97	1097	1,01	31,56726	0,688
10	91	6	35	138	195	33	NC	NC	457	1082	0,7	26,80471	0,52
11	160	1	31	158	225	39	65,2	120,8	326	1327	3,5	36,06523	0,8965
12	105	6	19	139	201	36	22	143	110	1097	0,48	30,73245	0,7755
12	91	5	16	162	274	30	57	187	285	1644	3,9	59,11619	0,6515
13	52	1	16	134	193	28	63,8	101,2	319	989	3,8	54,55892	0,3805
15	96	4	27	145	145	34	27,6	83,4	138	650	0,82	33,01793	0,428
16	110	3	27	115	216	32	25,2	158,8	126	1181	0,24	79,86342	0,3045
17	85	5	17	186	191	46	26,4	118,6	132	885	5,7	24,21815	0,755
35	71	3	29	147	180	57	19	104	95	776	2,65	22,96364	1,0525
44	97	3	30	151	174	43	16,4	114,6	82	937	0,88	25,62775	0,931

NC: não calculado (Triacilgliceróis > 400 mg/dl).

D. Parâmetros bioquímicos do grupo controle

Amostras	CPK (U/l)	CKMB (U/l)	AST (U/l)	LDH (U/l)	COL mg/dl	c-HDL mg/dl	c-VLDL mg/dl	c-LDL mg/dl	TRIG mg/dl	ApoB µg/ml	PCR mg/l	LDL µg/ml	Anti LDL ⁻ ABS 405 nm
13E	39	1	23	148	158	37	16,4	104,6	82	802	2,83	49,31737	0,25
14E	115	2	12	159	215	59	24,4	131,6	122	984	0,47	29,15862	0,4785
15E	32	1	26	167	190	37	32,6	120,4	163	1.030	37,6	30,07554	0,4755
18E	100	2	18	159	207	70	18,2	118,8	91	776	0,82	17,53962	0,5195
20E	146	1	31	182	160	26	22	112	110	921	1,97	17,63542	0,5735
21E	105	1	22	152	172	27	26,8	118,2	134	916	0,22	17,63542	0,3565
22E	81	1	20	191	206	63	13	130	65	921	1,91	19,90721	0,6605
23E	34	1	12	131	216	34	27,4	154,6	137	1.269	2,56	29,40495	0,5285
24E	98	1	17	181	210	39	13,4	157,6	67	1.020	10,03	16,9922	0,2365
25E	139	2	21	188	213	41	39,2	132,8	196	1.144	12,5	15,80156	0,369
27E	186	1	24	225	204	55	27,4	121,6	137	885	1,41	22,16532	0,4015
29E	188	4	20	176	170	20	30,8	119,2	154	1.035	1,23	21,6179	0,467
30E	100	3	16	168	179	25	33	121	165	1.092	5,3	22,19269	0,5715
31E	52	5	11	109	161	30	34,8	96,2	174	916	1,78	17,49856	0,3685
32E	76	5	11	130	194	30	21	143	105	1.144	1,47	27,77638	0,4585

Anexo 3. Perfil Lipídico dos Pacientes com Síndromes Coronárias Agudas (2ª Amostra)

A. Perfil Lipídico dos pacientes com infarto agudo do miocárdio (2ª amostra)

Amostras*	COL mg/dl	c-HDL mg/dl	c-VLDL mg/dl	c-LDL mg/dl	TRIG mg/dl	ApoB µg/ml
7	116	26	23,6	66,4	118	702
8	187	25	37,4	123,6	187	1004
9	96	22	16,8	57,2	84	634
14	108	55	11	42	55	452
18	123	24	20,6	78,4	103	792
19	158	22	39,2	96,8	196	1092
21	162	47	22,8	92,2	114	802
22	115	20	32	63	160	0,864
23	174	52	23,2	98,8	116	823
31	159	23	23,4	112,6	117	1066
32	173	25	39,4	108,6	197	973
38	139	40	27,8	71,2	139	776
39	159	33	20	106	100	906
47	148	28	57,4	62,6	287	885
53	127	32	14	81	70	639
56	119	29	17,4	72,6	87	458
62	209	45	39,4	124,6	197	1108
64	153	46	21	86	105	574
65	206	32	45,6	128,4	228	1149
70	195	34	28,6	132,4	143	968
80	126	26	22,4	77,6	112	828

B. Perfil Lipídico dos pacientes com angina instável (2ª amostra)

Amostras*	COL mg/dl	c-HDL mg/dl	c-VLDL mg/dl	c-LDL mg/dl	TRIG mg/dl	ApoB µg/ml
5	206	30	27,8	148,2	139	1370
6	134	22	38,2	73,8	191	885
10	184	30	28,8	125,2	144	994
11	182	26	24,2	131,8	121	1170
20	151	45	39	67	195	776
49	131	26	16,6	88,4	83	708
74	152	33	26	93	130	729
78	176	23	30,6	122,4	153	-

* Amostras coletadas após jejum de 12 horas

Anexo 4. Valores de Referência

Teste	Método	Amostra	Valores de Referência
CPK (U/l)	Cinético-UV (DGKCh)	plasma	35-232 (H) 21-215 (M)
CKMB (U/l)	Cinético-UV (DGKCh)	plasma	≤ 6
AST (U/l)	Cinético-UV (IFCC)	plasma	15-37
LDH (U/l)	Cinético-UV (LDU-P)	plasma	100-190
Col Total (mg/dl)*	Enzimático (esterase-oxidase)	soro	< 200 ótimo 200-239 limítrofe ≥ 240 alto
c-HDL (mg/dl)*	Precipitação (fosfotungstato)	soro	<40 baixo >60 desejável
c-LDL (mg/dl)*	Cálculo (Equação de Friedwald)	soro	<100 ótimo 100-129 desejável 130-159 limítrofe 160-189 alto ≥ 190 muito alto
TG (mg/dl)*	Cinético-UV (Lipase-GLDH)	soro	< 150 ótimo 150-200 limítrofe 201-499 alto ≥ 500 muito alto
ApoB (µg/ml)	Nefelométrico	soro	0,550-1,400 (H) 0,550-1,250 (M)
hs-PCR (mg/l)	Nefelométrico	soro	≤ 3 Risco cardiovascular** < 1 baixo risco 1-3 risco intermediário 3-10 alto risco >10 repetir em 30 dias para exclusão diagnóstica

* III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia.

**YEH & WILLERSON, 2003.

Anexo 5. Lista de Medicamentos Utilizados pelos Pacientes

Nome Comercial	Nome genérico	Mecanismo de ação
AAS, Somalgin	Ácido acetil salicílico	Antiagregante plaquetário, antitrombótico
Adalat	Nifedipina	Antihipertensivo, antianginoso
Amaril	Glimepirida	Antidiabético
Anafranil	Clomipramina	Antidepressivo, antinevrálgico
Ancoron, Atlansil	Amiodarona	Antiarrítmico
Antak, ziliun	Ranitidina	Antiúlcera
Aprovel	Irbesartana	Antihipertensivo
Atenol, Ablok	Atenolol	Beta-bloqueador, antiarrítmico
Atensina	Clonidina	Antihipertensivo
Atropina	Atropina	Antiarrítmico, antiespasmódico
Berotec	Fenoterol	Broncodilatador
Capoten	Captopril	Antihipertensivo, vasodilatador
Cardizem	Diltiazem	Antiarrítmico, antihipertensivo
Clorana	Hidroclorotiazida	Antihipertensivo
Cozaar	Losartan	antihipertensivo
Daonil	Glibenclamida	Antidiabético
Diabinese	Clorpropamida	Antidiabético
Dimorf	Morfina	Hipnoanalgésico
Diovan	Valsartan	Antihipertensivo
Divelol	Carvediol	antihipertensivo
Dolantina	Petidina	Hipnoanalgésico
Dramin	Diminidrato	Antiemético, antiverigem, sedativo
Eufilin	Aminofilina	Adjuvante no tratamento de ICC
Fluimucil	Acetilcisteína	Mucolítico
Fraxiparina	Nadroparina	Heparina de baixo PM, trombolítico
Frontal	Alprazolam	Ansiolítico
Glifage	Metformina	Antidiabético oral
Higroton	Clortalidona	Diurético, antihipertensivo
Inoeral	Propranolol	Beta-bloqueador
Isordil	Dinitrato de Isossorbida	Antianginoso
Keflin	Cefalotina	Antibiótico (cefalosporina)
Lasix	Furosemida	Diurético, antihipertensivo
Levaquin	Levofloxacina	Antibiótico
Lipitor	Atorvastatina	Hipolipemiante
Liquemine	Heparina	Anticoagulante
Livial	Tibolona	Hormônio p/ menopausa
Losartec	Losartan	Antihipertensivo
Losec	Omeprazol	Antiúlcera
Losec	Omeprazol	Antiúlcera
Ludiomil	Maprotilina	Antidepressivo
Luftal	Dimeticona	Antifisético

Nome Comercial	Nome genérico	Mecanismo de ação
Marevan	Varfarina	Anticoagulante
Monocordil	Mononitrato de Isosorbida	Antianginoso
Naprix	Ramipril	Antihipertensivo
Nitradisc, Triol	Nitroglicerina	Antianginoso, vasodilatador coronário
Norvasc	Amlodipina	Antihipertensivo, antianginoso
Novalgina	Dipirona, metamizol	Analgésico, antiperético
Novolin	Insulina	Hipoglicemiante
Pantozol	Pantoprazol	Antiúlcera
Plamet	Bromoprida	Antiemético
Plasil	Metroclorpramida	Antiemético
Plavix	Clopidogrel	Antitrombótico
Pravacol	Pravastina	Hipolipemiante
Precortil, Meticortem	Prednisona	Corticóide
Pressat	Amlodipina	Antihipertensivo
Prozac	Fluoxetina	Antidepressivo
Puran T4, Tetroid	Levotiroxina sódica	Hormônio tireoidiano
Renitec	Enalapril	Antihipertensivo, vasodilatador
Revivan	Dopamina	Estimulante cardíaco e vasopressor
Seloken	Metoprolol	β-bloqueador (antiarrítmico, antihipertensivo)
Sinteroid	Clofibrato	Hipolipemiante
Sustrate	Propatilnitrato	Antianginoso
Tagamet	Cimetidina	antiúlcera
Ticlid	Ticlopidina	Antiagregante plaquetário
Tryptanol	Amitriptilina	Antidepressivo, antinevrálgico
Valium	Diazepam	Ansiolítico, sedativo hipnótico, miorelaxante
Voltaren	Diclofenaco Sódico	Antiinflamatório
Xylocaina	Cloridrato de Lidocaína	Anestésico, antiarrítmico
Zestril	Lisinopril	Antihipertensivo
Zocor	Sinvastatina	Hipolipemiante

Anexo 6. Reagentes e Soluções

A. Antioxidantes para preservação de amostras

Solução de Fenil metil sulfonil fluoreto (PMSF) 0,5M em metanol.

- Dissolver 0,871 g de PMSF ($C_7H_7FO_2S$, PM: 174,2) em 10 ml de metanol (CH_3OH) PA. Armazenar em geladeira (4-8°C).
- Acrescentar 2 μ l/ml de plasma (concentração final no plasma= 1mM).

Solução de Benzamidina 1M em metanol

- Dissolver 1,566 mg de Benzamidina ($C_7H_9ClN_2$, PM: 156,6) em 10 ml de metanol PA. Armazenar em geladeira (4-8°C).
- Acrescentar 2 μ l/ml de plasma (concentração final no plasma= 2mM).

Solução de Hidroxitolueno Butilado (BHT) 0,01M em metanol

- Dissolver 22,04 mg de BHT ($C_{15}H_{24}O$, PM: 220,4) em 10 ml de metanol PA. Armazenar em geladeira (4-8°C).
- Acrescentar 1 μ l/ml de plasma (concentração final no plasma= 20mM).

Solução de Aprotinina 0,1% em metanol

- Solução estoque (0,2%): Reconstituir um frasco com 10g de aprotinina ($C_{284}H_{432}N_{84}O_{79}S_7$, PM: 6511,92) liofilizada com 5,0 ml de metanol PA.
- Armazenar em geladeira (4-8°C)
- Solução de Uso (0,1%): Diluir a solução estoque 1:2 com metanol PA.
- Armazenar em geladeira (4-8°C).
- Acrescentar 2 μ l/ml de plasma (concentração final no plasma= 2 μ g/ml).

B. Tampões e substratos para ELISA

PBS (salina tamponada - fosfato) – solução estoque

Na_2HPO_4	20,9 g
KH_2PO_4	3,0 g
NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
H_2O qsp	1000 ml

PBS – solução de uso

- Diluir o PBS – solução estoque 1:10

Tampão citrato-fosfato 0,1M pH 4,2

NaH ₂ PO ₄ .12H ₂ O	21,2 g
H ₂ O qsp	1000 ml

Tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9,6

Na ₂ CO ₃	0,795 g
NaHCO ₃	1,465 g
NaN ₃	0,1 g
H ₂ O qsp	1000 ml

Tampão Tris (PM121,1)-HCl 0,05M pH 7,6

HCl 1N	37 ml
TRIS (Hidroximetil)-aminometano	6,1 g
H ₂ O qsp	1000 ml

Solução de leite-PBS a 5%

Leite em pó desnatado	5,0 g
PBS - solução de uso	100 ml

- Aquecer até a fervura e resfriar em água corrente antes do uso.

Solução de leite-PBS a 1%

- Diluir a solução de leite-PBS a 5% 1:5 com PBS - solução de uso

ABTS (2,2'- azino-bis (ácido3-etil benzotiazolino-6-sulfônico)

- Preparar no momento do uso

Tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 4,2	5,0 ml
ABTS (C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₆ S ₄ .(NH ₃) ₂)	2,65 g
H ₂ O ₂	1,25 ml

Solução de PBS-TWEEN 0,05%

TWEEN 20 (polioxietilenosorbitan)	0,5 ml
Solução PBS de uso qsp	1000 ml

TBS (salina tamponada-TRIS) pH 7,4 – solução estoque

TRIS	6,055 g
NaCl	8,775 g
H ₂ O qsp	1000 ml

TBS pH 7,4 – solução de uso

- Diluir a solução estoque 1:10

Solução de leite-TBS a 5%

Leite em pó desnatado	5,0 g
TBS - solução de uso	100 ml

- Aquecer até a fervura e resfriar em água corrente antes do uso.

Solução de leite-TBS a 1%

- Diluir a solução de leite-TBS a 5% 1:5 com Tampão PBS de uso.

Solução TBS – TWEEN 0,05%

TWEEN	0,5 ml
TBS - solução de uso qsp	1000 ml

Solução de Luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-fitalazinediona)

Luminol (C ₈ H ₇ N ₃ O ₂)	208,75 mg
p-iodofenol	91,0 mg
Tampão TRIS – HCl pH 8,5 qsp	500 ml

Substrato de Luminol

Preparar no momento do uso

Solução de Luminol	0,5 ml
H ₂ O	2,5 ml
H ₂ O ₂	0,75 ml

C. Conjugado (Anticorpo biotilado)**Reagentes**

Biotina (C₂₀H₃₀N₄O₆, PM; 454,5): éster N-hidroxisuccinimida do ácido D.biotinoil-e-aminocaprílico (ROCHE[®], Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, IN, USA).

Solução de biotina-DMSO (dimetilsulfóxido)	10 mg/ml
C ₂₀ H ₃₀ N ₄ O ₆	2 mg
DMSO (C ₂ H ₆ SO)	0,2 ml

Tampão borato de sódio (Na₂B₄O₇, PM: 201,22) 0,1M, pH 8,8

Na ₂ B ₄ O ₇	20,12 g
H ₂ O qsp	1000 ml

Solução de Cloreto de Amônio (NH₄Cl, PM: 53,5) 1M

NH ₄ Cl	0,535 g
H ₂ O qsp	100 ml

Biotinilação do mAb3D1036

- Dialisar o anticorpo monoclonal em tampão borato de sódio
- Determinar a concentração do anticorpo dialisado (em mg/ml de proteínas)

$\text{Proteínas (mg/ml)} = \frac{\text{Absorbância em 280 nm} \times \text{coeficiente de extinção molar}}{\text{Coeficiente de extinção molar} = 0,625}$
--

- Adicionar 250 µg de biotina em DMSO para cada mg do anticorpo (em mg de proteínas)
- Incubar 4 horas em temperatura ambiente
- Adicionar 20 µl de NH₄Cl 1M para cada 250 µg de biotina
- Dialisar em PBS pH 7,2 durante 24 horas, com trocas após 12 horas e em seguida a cada 6 horas.

D. Tampão de diálise – solução estoque

NACl	175,32 g
EDTA	7,44 g
TRIS	12,11 g
NaN ₃	1,95 g
H ₂ O qsp	2000 ml

- Acertar em pH 7,4 com HCl.
- Solução de uso: diluir a solução estoque 1:10.

E. Solução de NaCl 1M

NaCl	58,5 g
H ₂ O	1000 ml

F. Tampão TRIS 20 mM pH 7,8

TRIS	2,422 g
H ₂ O qsp	1000 ml

- Ajustar o pH com HCL e filtrar com filtro de 0,22 μ .

G. Tampão TRIS-NaCl 20 mM/1M pH 7,8

TRIS	2,422 g
NaCl	58,44 g
H ₂ O qsp	1000 ml

- Ajustar o pH com HCL e filtrar com filtro de 0,22 μ .

Anexo 7. Método de Lowry (J. Biol. Chem. 193:265, 1951)**Solução A**

Na ₂ CO ₃	20 g
NaOH	4 g
H ₂ O qsp	1000 ml

Solução B

CuSO ₄ .5H ₂ O	2 g
H ₂ O qsp	100 ml

Solução C

Tartarato de sódio	4 g
H ₂ O qsp	100 ml

Mistura reativa

Solução A	100 ml
Solução B	1,0 ml
Solução C	1,0 ml

Reativo de Folin-Ciocalteu – solução de uso

- Diluir a solução estoque 1:3.

Solução de albumina bovina 20%

Padrões: soluções de albumina 20, 40, 60, 80 e 100 µg/ml a partir da solução de albumina 20 %.

Procedimento

Tubos	Branco	Amostra	
H2O	100		µl
Amostra		100	µl
Mistura reativa	1,0	1,0	ml
Misturar, incubar 10 min. em TA			
Reativo de Folin de uso	100	100	µl
Misturar, incubar 10 min. em TA. Ler em 600 nm			

Cálculos

Proteínas (µg/ml)= ABS x fator de calibração (F)

Fator de calibração

Determinar as absorvâncias(ABS) dos padrões de acordo com **Procedimento**.

$$F = (20/ABS + \dots\dots\dots 100/ABS)/5$$

Anexo 8. TERMO DE CONSETIMENTO ESCLARECIDO

PROJETO DE PESQUISA: Determinação da Lipoproteína de Baixa Densidade Eletronegativa (LDL⁻) e de seus Auto-anticorpos em Pacientes Portadores de Síndromes Coronarianas Estáveis (Angina Estável) e Síndromes Coronarianas Agudas (Angina Instável e Infarto Agudo do Miocárdio)

I. Justificativa e Objetivo

Recentemente foi descoberto um tipo especial de colesterol chamado lipoproteína de baixa densidade eletronegativa (LDL⁻). Este colesterol tem maior capacidade de iniciar e desenvolver a aterosclerose, uma doença que pode afetar vasos sanguíneos, o coração e o cérebro.

A proposta deste trabalho é realizar exames no sangue de pessoas com problemas no coração causados pela aterosclerose para determinar as quantidades deste tipo especial de colesterol e dos anticorpos que o organismo produz contra ele. Através destes resultados poderá ser determinado se exames laboratoriais destas substâncias poderão ajudar o médico a descobrir e tratar este tipo de doença.

II. Procedimentos a serem utilizados

Se concordar, o paciente participará desta pesquisa durante a sua internação no hospital, durante o qual serão realizadas duas coletas de sangue. A primeira coleta será feita quando o paciente for internado e a segunda será feita quando o paciente tiver alta. Em cada uma das coletas serão retirados cerca de 20 ml de sangue no total. A coleta será sempre realizada por pessoal treinado, incluindo funcionários do laboratório, médicos

ou bioquímicos ligados a este projeto. Estas amostras deverão ser obtidas, sempre que possível, juntamente com os demais exames laboratoriais solicitados normalmente pelo médico para não provocar desconforto adicional ao paciente. A coleta da amostra inicial deverá ocorrer antes de qualquer tipo de medicação, sempre que isso for possível e desde que não interfira com o tratamento ou traga qualquer tipo de prejuízo para o paciente. Estas amostras serão levadas para o Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná onde ficarão congeladas e em seguida para Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP em São Paulo-SP, onde serão analisadas. Outros resultados de exames que o paciente tenha feito durante o seu internamento poderão ser analisados para as conclusões finais deste trabalho.

III. Desconforto e riscos

A coleta de sangue e os materiais utilizados não oferecem nenhum risco de contaminação aos pacientes, uma vez que todo material é descartável. Após a coleta alguns pacientes podem vir a apresentar manchas roxas, inflamação ou dor no local de onde o sangue foi retirado. De maneira menos comum, podem ocorrer tonturas ou desmaios durante o procedimento. Tais imprevistos serão prontamente atendidos pelo pessoal responsável pela coleta e não representam risco para o paciente.

IV. Confiabilidade

A participação neste estudo é voluntária, tendo o (a) paciente liberdade para recusar ou retirar seu consentimento para fazer parte do mesmo no momento que desejar, sem que haja prejuízo ao seu atendimento.

Não ocorrerá qualquer tipo de custo adicional com os exames ou procedimentos de coleta relacionados com o projeto.

Os pacientes que participarem do projeto, em hipótese alguma terão sua identidade divulgada. Também serão mantidas em sigilo todas as informações obtidas e que estejam relacionadas com a privacidade dos pacientes.

V. Acesso às informações

Os pesquisadores e o Comitê de Bioética que aprovaram este estudo se comprometem a fornecer todas as informações que venham a obter durante a pesquisa.

A.TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: Determinação da Lipoproteína de Baixa Densidade Eletronegativa (LDL⁻) e de seus Auto-anticorpos em Pacientes Portadores de Síndromes Coronarianas Estáveis (Angina Estável) e Síndromes Coronarianas Agudas (Angina Instável e Infarto Agudo do Miocárdio)

Responsável pelo projeto: Jair Aparecido de Oliveira

Eu, _____ RG _____
internado na Irmandade da Santa Casa de Londrina, declaro que
em ___/___/___ concordei em participar como grupo de estudo do projeto
acima nomeado.

O responsável pelo projeto explicou-me o seguinte:

1. O estudo implica em colher amostras de sangue para análises bioquímicas.
2. Resultados de exames laboratoriais e outros exames complementares realizados rotineiramente poderão ser utilizados no estudo.
3. A minha participação neste estudo é voluntária, tendo a liberdade para recusar ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo ao meu atendimento.
4. O sigilo da minha participação, assim como todas as informações obtidas serão preservadas.

Londrina, _____ de _____ de 200____.

Assinatura do Paciente

Assinatura do Responsável

B.TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: Determinação da Lipoproteína de Baixa Densidade Eletronegativa (LDL⁻) e de seus Auto-anticorpos em Pacientes Portadores de Síndromes Coronarianas Estáveis (Angina Estável) e Síndromes Coronarianas Agudas (Angina Instável e Infarto Agudo do Miocárdio)

Responsável pelo projeto: Jair Aparecido de Oliveira

Eu, _____ RG _____, internado no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná, declaro que em ___/___/___ concordei em participar como grupo de estudo do projeto acima nomeado.

O responsável pelo projeto explicou-me o seguinte:

5. O estudo implica em colher amostras de sangue para análises bioquímicas.
6. Resultados de exames laboratoriais e outros exames complementares realizados rotineiramente poderão ser utilizados no estudo.
7. A minha participação neste estudo é voluntária, tendo a liberdade para recusar ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo ao meu atendimento.
8. O sigilo da minha participação, assim como todas as informações obtidas serão preservadas.

Londrina, _____ de _____ de 200____.

Assinatura do Paciente

Assinatura do Responsável

Anexo 9. RELATÓRIO

Nome: _____ sexo () Idade ___ N° ___

RG/Prontuário: _____

Endereço:

1º coleta (A) -

Local: _____ data: ___/___/___ hora: _____

2º coleta (B) -

Local: _____ data: ___/___/___ hora: _____

H.D.: () IAM () AI () AE

Hora de início da dor pré-cordial: _____

Exames Laboratoriais

Dia/hora	/	/	/	/
CPK				
CKMB				
AST				
LDH				
COL				
HDL				
LDL				
TRIG				
ApoB				
PCR				
LDL*				
Anti LDL*				

Tabagismo () Hipertensão () Diabetes ()

Medicamentos pré-utilizados: _____

Quadros clínicos associados: _____

Data de alta: ___/___/___

Observações: _____

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, R. W.; DZAU, V. J. Vascular Biology: The Past 50 Years. *Circulation*. v. 102. n. 20, p. IV-112-IV-116, 14 nov. 2000.

ANBER, V. MILLAR, J.S.; McCONNELL, M.; SHEPERD, J.; PACKARD, C.J. Interaction of Very-Low-Density, Intermediate-Density, and Low-Density Lipoproteins With Human Arterial Wall Proteoglycans. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. v. 17. n. 11, p. 2507-2514, nov. 1997.

APPLE, F. S.; HENDERSON, R. A. Cardiac Function In **BURTIS, Carl A; ASHWOOD, Edward R. Tietz Textbook of Clinical Chemistry**, 3. ed. Philadelphia: Saunders, 1999,. p. 1178-1200.

AVOGARO, P; BITTOLO-BON, G; CAZZOLATO, G. Presence of a Modified Low Density Lipoprotein in Humans. *Atherosclerosis*. v.8, p.79-87, 1988.

BERLINER, J. A.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A.M.; FRANK, J.S.; DEMER, L.L.; EDWARDS, P.A.; WATSON, A.D.; LUSIS, A.J. Atherosclerosis: Basic Mechanisms: Oxidation, Inflammation, and Genetics. *Circulation*. v. 91, n. 9, p. 2448-2496, may 1995.

BERLINER, J. A.; HEINECKE, J. W. The Role of Oxidized Lipoproteins in Atherogenesis. *Free Medical Biology & Medicine*. v. 20, n. 5, p. 707-727, 1996.

BERLINER, J.; SUBBANAGOUNDER, G.; LEITINGER, N.; WATSON, A.D.; VORA, D. Evidence for a Role of Phospholipid Oxidation Products in Atherogenesis. *Trends in Cardiovascular Medicine*. v. 11, n. 3/4, p.142-147, 2001.

BUI, M. N.; SACK, M.N.; MOUTSATSOS, G.; LU, D.Y.; KATZ, P.; McCOWN, R.R.N.; BREAL, J.A.; RACKLEY, C.E. Autoantibody Titers to Oxidized Low-Density Lipoprotein in Patients with Coronary Atherosclerosis. *American Heart Journal*. v. 131, n. 4, p. 663-667, apr. 1996.

BUJA, M. L.; WILLERSON, J. T. Role of Inflammation in Coronary Plaque Disruption. *Circulation*. v. 89, n. 1, p. 503-505, jan. 1994.

CAZZOLATO, G; AVOGARO, P.; BITTOLO-BOM, G. Characterization of a More Electronegatively Charged LDL Subfraction By Exchange HPLC. *Free Radical Biology & Medicine*. v. 11, p. 247-253, 1991.

CHAIT, A.; BRAZG, R.L.; TRIBBLE, D.L.; KRAUSS, R.M. Susceptibility of Small, Dense, Low-Density Lipoproteins to Oxidative Modification in Subjects With the Atherogenic Lipoprotein Phenotype, Pattern B. **The American Journal of Medicine.** v. 94, n. 4, p. 350-356, apr. 1993.

CHANCHARME, L.; THEROND, P.; NIGON, F.; LEPAGE, S.; COUTURIER, M.; CHAPMAN, M.J. Cholesteryl Ester Hydroperoxide Lability is a Key Feature of the Oxidative Susceptibility of Small, Dense LDL. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.** v.19, n. 3, p. 810-820, mar. 1999.

CHANG, Y. H.; ABDALLA, D.S.P.; SEVANIAN, A. Characterization of Cholesterol Oxidation Products Formed By Oxidative Modification of Low Density Lipoprotein. **Free Radical Biology & Medicine.** v. 23, n. 2, p. 202-214, 1997.

CHAPMAN, J. M.; BRUCKERT, E. The atherogenic role of triglycerides and small, dense low density lipoproteins: impact of ciprofibrate therapy. **Atherosclerosis.** s. 124, S21-S28, 1996.

CHAPPEY, B.; MYARA, I.; BENOIT, M., MAZIÈRE, C.; MAZIÈRE, J.; MOATTI, N. Characteristics of Ten Charge-differing Subfractions Isolated from Human Native Low-Density Lipoproteins (LDL). No Evidence of Peroxidative Modifications. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1259, p. 261-270, 1995.

DAMASCENO, N.R.T. **Influência das Isoflavonas Extraídas da Soja na Hipercolesterolemia e na Aterosclerose Experimental Induzida pela Caseína.** São Paulo: USP. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2001. Tese (doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos e Nutrição Experimental. Área de Nutrição Experimental. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

DAVIES, M.J. Stability and Instability: Two Faces of Coronary Atherosclerosis: The Paul Dudley Lecture 1995. **Circulation.** v. 94, n. 8, p. 2013-2020, 15 oct. 1996.

DE CASTELLARNAU, C.; SÁNCHEZ-QUESADA, J.L.; BENÍTEZ, S.; ROSA, R.; CAVEDA, L.; VILA, L.; ORDÓÑES-LLANOS, J. Electronegative LDL From Normolipemic Subjects Induces IL-8 and Monocyte Chemotactic Protein Secretion By Human Endotelial Cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.** v. 20, p. 2281-2287, 2000.

DEMUTH, K.; MYARA, I.; CHAPPEY, B.; VEDIE, B.; PECH-AMSELLEM, A.; HABERLAND, M.E.; MOATTI, N. A Cytotoxic Electronegative LDL Subfraction is Present in Human Plasma. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.** v. 16, p. 773-783, 1996.

EHARA, S.; UEDA, M.; NARUKO, T.; HAZE, K.; ITOH, A.; OTSUKA, M.; KOMATSU, R.; MATSUO, T.; ITABE, H.; TAKANO, T.; TSUKAMOTO, Y.; YOSHIYAMA, M.; TAKEUCHI, K.; YOSHIKAWA J.; BECKER, A.E. Elevated Levels of Oxidized Low Density Lipoprotein Show a Positive Relationship with the Severity of Acute Coronary Syndromes. **Circulation**. v. 103, p. 1955-1966, apr. 2001.

FABJAN, J. S.; ABUJA, P.M.; SCHAUR, R.J.; SEVANIAN, A. Hypochlorite Induces the Formation of LDL-, a Potentially Atherogenic Low Density Lipoprotein Subspecies. **FEBS Letters**. v. 499, p. 69-72, 2001.

FALK, E.; SHAH, P.K; FUSTER, V. Coronary Plaque Disruption. **Circulation**. v. 92, n. 3, p. 657-671, aug 1995.

FALUDI, A.A. Dislipidemias em Grupos Especiais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. v. 77, suplemento III, p. 40-44, nov. 2001.

FUSTER, VALENTIN. Elucidation of the Role of Plaque Instability and Rupture in Acute Coronary Events. **The American Journal of Cardiology**. v. 76, p. 24C-33C.

SALGADO, W.F. Classificação das Dislipidemias. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. v. 77, suplemento III, p. 15-18, nov. 2001.

GABAY, C.; KUSHNER, I.; Mechanism of Disease: Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. **The New England Journal of Medicine**. v. 340, n. 6, p. 448-454, 11 feb. 1999.

GETZ, G.S. The First Human Monoclonal Antibody to Oxidized LDL. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v. 2, n. 8, p. 1254-1255, aug. 2001.

GIANNINI, S.D. Aterosclerose In: **Aterosclerose/Dislipidemias-Clinica e Terapêutica: Fundamentos Práticos**. São Paulo: BG Cultural, 1998, p. 1-101.

GREILBERGER, J.; WANG, X.; LEDINSKI, G.; CHEN, Q.; JÜRGENS, G. Presence of Aldehydic Epitopes on a Minor Low-Density Lipoprotein Fraction. **Free Medical Biology & Medicine**. v. 26, n. 11/12, p. 1494, 1999.

GRIFFIN, B. A.; CASLAKE, M.J.; YIP, B.; TAIT, G.W.; PACKARD, C.J.; SHEPERD, J. Rapid Isolation of Low Density Lipoprotein (LDL) Subfractions from Plasma by Density Gradient Ultracentrifugation. **Atherosclerosis**. v. 83, p. 59-67, 1990.

GRUNDY, S.M. Hypertriglyceridemia, Atherogenic Dyslipidemia, and the Metabolic Syndrome. **American Journal of Cardiology**. v. 81, n. 4A (suppl.), p. 18B-25B, 1988.

GRUNDY, S.M. Small LDL, Atherogenic Dyslipidemia, and the Metabolic Syndrome. **Circulation**. v. 95, n. 1, p. 1-4, 7 jan. 1997.

HALLIWELL, B.; MURCIA, M.A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O.I. Free Radicals and Antioxidantes in Food and *In Vivo*: What They do and How They Work. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 35, n. 1/2, p. 7-20, 1995.

HAMILTON, C.A. Low-Density Lipoprotein and Oxidized Low-Density Lipoprotein: Their Role in the Development of Atherosclerosis. **Pharmacology Therapy**. v. 74, n.1, p. 55-72, 1997.

HAMM, C.W. Cardiac Biomarkers for Rapid Evaluation of Chest Pain. **Circulation**. v. 104, p. 1454-1456, 2001.

HANSSON, Göran K. Immune Mechanisms in Atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Trombosis and Vascular Biology**. v. 21, p. 1876-1890, 2001.

HANSSON, G. K.; LIBBY, P.; SCHÖNBECK U.; YAN, Z. Innate and Adaptive Immunity in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Circulation**. v. 91, p. 281-291, 2002.

HODIS, H.N.; KRAMSCH, D.M.; AVOGARRO, P.; BITTOLO-BON, G.; CAZZOLATO, G.; HWANG, J.; PETERSON, H.; SEVANIAN, A. A. Biochemical and Citotoxic Characteristic of an *in vivo* Circulating Oxidized Low Density Lipoprotein (LDL). **Journal of Lipid Research**., v.35, p. 669-677, 1994.

HOLVOET, P; COLLEN, D. Oxidation of Low Density Lipoproteins in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Atherosclerosis**. v. 137(suppl.), p. s33-s38, 1998.

HOLVOET, P. Oxidative Modification of Low-Density Lipoproteins in Atherothrombosis. **Acta Cardioly**. v. 53, n. 5, p.253-260, 1998.

HOLVOET, P.; VANHAECKE, J.; JANSSENS, S.; VAN de WERF, F.; COLLEN, D. Oxidized LDL and Malondialdehyde-Modified LDL in Patients with Acute Coronary Syndromes and Stable Coronary Artery Disease. **Circulation**. v. 98, p. 1487-1494, 1998.

HOLVOET, P.; VAN CLEEMPUT, J.; COLLEN, D.; VANHAECKE, J. Oxidized Low Density Lipoprotein Is a Prognostic Marker of Transplant-Associated Coronary Artery Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v.20, n. 3, p. 698-702, mar. 2000.

HORKKO, S.; MILLER, E.; DUDL, E.; REAVEN, P.; CURTISS, L.K.; ZVAIFLER, N.J.; TERKELTAUB, R.; PIERANGELI, S.S.; BRANCH, D.W.; PALINSKI, W.; WITZTUM, J.L. Antiphospholipid Antibodies are Directed against Epitopes of Oxidized Phospholipids of Oxidized Low Density Lipoprotein. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 98(3), p. 815-825, Aug 1996.

HULTHE, J.; FAGERBERG, B. Circulating Oxidized LDL is Associated with Subclinical Atherosclerosis and Inflammatory Cytokines (AIR Study). **Arteriosclerosis, Trombosis and Vascular Biology**. v. 22, p. 1162-1167, 2002.

INOUE, T.; UCHIDA, T.; KAMISHIRADO, H.; TAKAYANAGI K.; HAYASHI, T.; MOROOKA, S. Clinical Significance of Antibody Against Oxidized Low Density Lipoprotein in Patients with Atherosclerotic Coronary Artery Disease. **Journal of the American Collage of Cardiology**. v. 37, n. 3, p. 775-779, mar. 2001.

KEARNEY, J.F. Immune Recognition of OxLDL in Atherosclerosis. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 105, n. 12, p. 1683-1685, june 2000.

KHRENOV, A. V.; ANANYEVA, N.M.; GRIFFIN, J.H.; SAENKO, E.L. Coagulation Pathways in Atherotrombosis. **Trends in Cardiovascular Medicine**. v. 12, n. 7, p. 317-324, 2002.

KINLAY, S.; SELWYN, A.P. Effects of Statins on Inflammation in Patients with Acute and Chronic Coronary Syndromes. **The American Journal of Cardiology**. v. 91, n. 4A(suppl), p. 9B-13B, feb. 20 2003.

KRAUSS, R.M. Atherogenicity of Triglyceride-Rich Lipoproteins. **American Journal of Cardiology**. v. 81(4A), p. 13B-17B, 1998.

LAMARCHE, B.; TCHERNOF, A.; MOORJANI, S.; CANTIN, B., DAGENAIS, G.R.; LUPIEN, P.J.; DESPRES, J. Small, Dense Low-Density Lipoprotein Particles as a Predictor of the Risk of Ischemic Heart Disease in Men: Prospective Results From the Quebec Cardiovascular Study. **Circulation**. v. 95. n. 1, p. 69-75, jan. 1997.

LEHTIMAKI, T.; LEHTINEN, S.; SOLAKIVI, T.; NIKKITA, M.; JAAKKOLA, O.; JOKELA, H.; YLA-HERTTUALA, S.; LUOMA, J.S.; KOIVULA, T.; NIKKARI, T. Autoantibodies Against Oxidized Low Density Lipoprotein in Patients with Angiographically Verified Coronary Artery Disease. **Arteriosclerosis, trombosis and Vascular Biology**. v. 19, n. 1, p. 23-27, jan. 1999.

LIBBY, P. Molecular Bases of the Acute Coronary Syndromes. **Circulation**. v. 91, n. 11, p. 2844-2850, 1 june 1995.

LIBBY, P. Current Concepts of Pathogênese of the Acute Coronary Syndromes. **Circulation**. v104, n. 3, p. 365-372, 17 july 2001.

LIBBY, P.; AIKAWA, M. Mechanims of Plaque Estabilization with Statins. **The American Journal of Cardiology**. v. 91, n. 4A (suppl), p. 4B-8B, feb. 20 2003.

LIBBY, P.; RIDKER, P.M.; MASERI, A. Inflammation and Atherosclerosis. **Circulation**. v. 105, p. 1135-1143, 2002.

LIMA, J.C. Determinações Laboratoriais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. v. 77, suplemento III, p. 10-15, nov. 2001.

LOURES, A.A. Estratificação de Risco e Metas Lipídicas para a Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. v. 77, suplemento III, p. 25-28, nov. 2001.

MERTENS, A.; HOLVOET, P. Oxidized LDL and HDL: Antagonists in Atherotrombosis. **The FASEB Journal**. v. 15, p. 2073-2084, Oct 2001.

MORO, E.; ALESSANDRINI, P.; ZAMBON, C.; PIANETTI, M.P.; CAZZOLATO, G.; BITTOLO-BON, G. Is Glycation of Low Density Lipoproteins in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus a LDL Pre-Oxidative Condition ? **Diabetic Medicine**. v. 16, p. 663-669, 1999.

NAPOLI, C.; LERMAN, L. Involvement of Oxidation-Sensitive Mechanims in the Cardiovascular Effects of Hipercholesterolemia. **Mayo Clinic Proceedings**. v. 76, n. 6, p. 619-631, june 2001.

NAVAB, M.; FOGELMAN, A.M.; BERLINER, J.A.; TERRITO, M.C.; DEMER, L.M.; FRANK, J.S.; WATSON D.; EDWARDS, P.A.; LUSIS, A.J. Pathogenesis of Atherosclerosis. A Symposium: Cholesterol-Lowering Trials: New Results and Emerging Issues. **The American Journal of Cardiology**. v. 76, n. 9, p.18C-23C, sep. 1995.

NAVAB, M.; BERLINER, J.; WATSON, A.D.; HAMA, S.Y.; TERRITO, M.C.; LUSIS, A.J.; SHIH, D.M.; Van LENTEN B.J.; FRANK, J.S.; DEMER, L.L.; EDWARDS, P.A.; FOGELMAN, A.M. The Yin and Yang of Oxidation in the Development of the Fatty Streak: A Review Based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v. 16, n. 7, p. 831-842, july 1996.

NAVAB, M.; HAMA, S.Y.; READY, S.T.; Ng J.C.; Van LENTEN, B.J.; LAKS, H.; FOGELMAN, A. Oxidized Lipids as Mediators of Coronary Heart Disease. **Current Opinion in Lipidology**. v. 13, p. 363-372, 2002.

PACKARD, C.; SHEPHERD, J. Lipoprotein Heterogeneity and Apolipoprotein B Metabolism. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 17, n. 12, p. 3542-3556, dec. 1997.

PACKARD, C.; CASLAKE, M.; SHEPHERD, J. The role of small, dense low density lipoprotein (LDL): a new look. **International Journal of Cardiology**. 74, S17-S22, 2000.

PALINSKI, W. Antisera and Monoclonal Antibodies Specific for Epitopes Generated During Oxidative Modification of Low Density Lipoprotein. **Arteriosclerosis**. v. 10, p. 325-335, 1990.

PARASSASI, T.; BITTOLO-BON, G.; BRUNELL, R.; CAZZOLATO, G.; KRASNOWSKA, E.K.; MEI, G.; SEVANIAN, A.; URSINI, F. Loss of ApoB-100 Secondary Structure and Conformation in Hydroperoxide Rich, electronegative LDL. **Free Medical Biology & Medicine**. v. 31, n. 1, p. 82-89, 2001.

PARHAMI, F.; FANG, Z.T.; FOGELMAN, A.M.; ANDALIBI, A.; TERRITO, M.C.; BERLINER, J.A. Minimally Modified Low Density Lipoprotein-induced Inflammatory Responses in Endothelial Cells Are Mediated by Cyclic Adenosine Monophosphate. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 92, n. 1, p. 471-478, july 1993.

PARTHASARATHY, S.; SANTANAN, N.; AUGÉ, N. Oxidized Low-Density Lipoprotein, a Two-Faced Janus in Coronary Artery Disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, p. 279-284, 1998.

PECH-AMSELLEN, M A.; MYARA, I.; STOROGENKO, M.; DEMUTH, K.; PROUST, A.; MOATTI, N. Enhanced Modifications of Low-Density Lipoproteins (LDL) by Endothelial Cells From Smokers: a Possible Mechanism of Smoking-Related Atherosclerosis. **Cardiovascular Research**. v. 31, p. 975-983, 1996.

PEPYS, M.B; HIRSCHFIELD, G.M. C-Reactive Protein: A Critical Update. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 111, n. 12, p. 1805-1812, june 2003.

PLENGE, J. K.; HENANDEZ, T.L.; WEIL, K.M.; POIRIER, P.; GRUNWALD, G.K.; MARCOVINA, S.M.; ECKEL, R.H. Simvastatin Lowers C-Reactive Protein Within 14 Days. An Effect Independent of Low-Density Lipoprotein Cholesterol Reduction. **Circulation**. v. 106, p. 1447-1452, 2002.

RAMOS, R. F.; MAGALHÃES, H. M. Infarto Agudo do Miocárdio: Novos Métodos Enzimáticos de Diagnóstico e Prognóstico In: **Manual de Cardiologia. Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo-SOCESP**. São Paulo. Atheneu, 2000, p. 147-151.

ROSNER, B. A. **Fundamentals of Biostatistics**. Belmont, London: Duxbury Press, 1995.

ROSS, R. Atherosclerosis-An Inflammatory Disease. **The New England Journal of Medicine**. v. 340, n. 2, p. 115-126. jan. 1999.

RYAN, M.; OWENS, D.; KILBRIDE, B.; COLLINS, P.; JOHNSON, A.; TOMKIN, G.H. Antibodies to Oxidized Lipoproteins and Their Relationship to Myocardial Infarction. **QJM**. v.91, n. 6, p. 411-415, june 1998.

SÁNCHEZ-QUESADA, J.L.; OTAL-ENTRAIGAS, C.; FRANCO, M.; JORBA, O.; GONZÁLES-SASTRE, F.; BLANO-VACA, F.; ORDÓÑES-LLANOS, J. Effect of Simvastatin Treatment on the Electronegative Low-Density Lipoprotein Present in Patients With Heterozygous Familial Hypercholesterolemia. **The American Journal of Cardiology**. v. 84, p. 655-659, sep. 1999.

SÁNCHEZ-QUESADA, J.L.; PÉREZ, A.; CAIXÁS, A.; RIGLA, M.; PAYÉS, A.; BENÍTEZ, S.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J. Effects of Glicemic Optimization on electronegative Low-Density Lipoprotein in Diabetes: Relation to Nonenzimatic Glycosylation and Oxidative Modification. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 85, n. 7, p. 3243-3249, 2001.

SÁNCHEZ-QUESADA, J.J.; CAMACHO, M.; ANTÓN, R.; BENÍTEZ, S.; VILA, L.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J. Electronegative LDL of FH Subjects: Chemical Characterization and Induction of Chemokine Release from Human Endotelial Cells. **Atherosclerosis**. v. 166, n. 2003, p. 261-270, 2002.

SCHOEN, F.J.; COTRAN, R.S. Vasos Sanguíneos. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000, p. 441-485.

SEVANI, A.; HWANG, J.; HODIS, H.; CAZZOLATO, G.; AVOGARRO, P.; BITOLLO-BON, G. Contribution of an in vivo Oxidized LDL to LDL Oxidation and Its Association with Dense LDL Subpopulations. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**. v. 16, n. 6, p. 784-793, jun. 1996.

SEVANIAN, A.; BITTOLO-BON, G.; CASZZOLATO, G.; HODIS, H.; HWANG., ZAMBURLINI.; MAIORINO, M.; URSINI, F. LDL⁻ is a Lipid Hydroperoxide-Enriched Circulating Lipoprotein. **Journal of Lipid Research.** v.38, p.419-428, 1997.

SEVANIAN, A.; ASATRYAN, L.; ZIOUZENKOVA, O. Low Density Lipoprotein (LDL) Modification: Basis Concepts and Relationship to Atherosclerosis. **Blood Purification.** v.17, p. 66-78, 1999.

SEVANIAN, A.; URSINI, F. Lipid Peroxidation in Membranes and Low-Density Lipoproteins: Similarities and Differences. **Free Radical Biology & Medicine.** v. 29, n. 3/4, p. 306-311, 2000.

SHAW, P.X.; HÖRKKO, S.; TSIMIKAS, S.; CHANG, M.; PALINSKI, W.; SILVERMAN, G.J.; CHEN, P.P.; WITZTUM. Human-Derived Anti-Oxidized LDL Autoantibody Blocks Uptake of Oxidized LDL by Macrophages and Localizes to Atherosclerotic Lesions In Vivo. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.** v. 21, p. 1333-1339, 2001.

SHOENFELD, Y.; SHERE, Y.; GEORGE, J.; HARATS, D. Autoantibodies Associated with Atherosclerosis. **Annals of Medicine.** v. 32, s. 1, p. 27-40, dec. 2000.

SHOJI, T.; NISHIZAWA, Y.; FUKUMOTO, M.; SHIMAMURA, K.; KIMURA, J.; KANDA, H.; EMOTO, M.; KAWAGISHI, T.; MORII, H. Inverse Relationship Between Circulating Oxidized Low Density Lipoprotein (oxLDL) and Anti-oxLDL Antibody Levels in Healthy Subjects. **Atherosclerosis.** v. 148, p. 171-177, 2000.

SHUMACHER, M.; EBER, B.; TATZBER, F.; KAUPMANN, P.; HALWACHS, G.; FRUHWALD, F.M.; ZWEIKER, R.; ESTERBAUER, H.; KLEIN, W. Transient Reduction of Autoantibodies Against Oxidized LDL in Patients with Acute Myocardial Infarction. **Free Radical Biology & Medicine.** v. 18, n. 6, p. 1087-1091, 1995.

STEINBERG, D. A Critical Look at the Evidence for the Oxidation of LDL in Atherogenesis. **Atherosclerosis.** s. 131, p. S5-S7, 1997.

STEINBERG, D. Low Density Lipoprotein Oxidation and Its Pathobiological Significance. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 272, n. 34, p. 20963-20966, aug. 1997.

STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T.E.; KHOO, J.C.; WITZTUM, J.L. Beyond Cholesterol. Modifications of Low-Density Lipoprotein that Increase Its Atherogenicity. **The New England Journal of Medicine.** v. 320, n. 14, p. 915-924, apr. 1989.

STEINBERG, D.; WITZTUM, J. L. Is The Oxidative Modification Hypothesis Relevant to Human Atherosclerosis ? Do The Antioxidant Trials Conducted to Date Refute the Hypothesis ? **Circulation**. v. 105, p. 2107-2111. 2002.

TERTOV, V.V.; KAPLUN, V.V.; SOBENIN, I.A.; OREKHOV, A.N. Low-density Lipoprotein Modification Occuring in Human Plasma Possible Mechanism of in vivo Lipoprotein Desialylation as a Primary Step of Atherogenic Modification. **Atherosclerosis**. 138, p.183-195, 1998.

TOSHIMA, S.I.; HASEGAWA, A.; KURABAYASHI, M.; ITABE, H.; TAKANO, T.; SUGANI, J.; SHIMAMURA, K.; KIMURA, J.; MICHISHITA, I.; SUZUKI, T.; NAGAI, R. Circulating Oxidized Low Density Lipoprotein Levels: A Biochemical Risk Marker for Coronary Heart Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v. 20, n. 10, p. 2243-2247, oct. 2000.

TRIBBLE, D. L.; RIZZO, M.; CHAIT, A.; LEWIS, D.M.; BLANCHE, P.J.; KRAUSS, R.M. Enhanced Oxidative Susceptibility and Reduced Antioxidant Content of Metabolic Precursors of Small, Dense Low-Density Lipoproteins. **The American Journal of Medicine**. v. 110, p. 1103-110, feb. 2001.

TSIMIKAS, S.; BERGMARK, C.; BEYER, R.W.; PATEL, R.; PATTISON, J.; MILLER, E.; JULIANO, J.; WITZTUM, J. Temporal Increases in Plasma Markers of Oxidized Low-Density Lipoprotein Strongly Reflect the Presence of Acute Coronary Syndromes. **Journal of the American College of Cardiology Foundation**. v. 41, .n. 3, p. 360-370, feb 2003.

TSIMIKAS, S.; WITZTUM, J.L. Measuring Circulating Oxidized Low-Density Lipoprotein to Evaluate Coronary Risk. **Circulation**. v. 103, p. 1930-1932, 2001.

URSINI, F.; DAVIES, K.J.A.; MAIORINO, M.; PARASASSI, T.; SEVANIAN, A. Atherosclerosis: Another Protein Misfolding Disease ?. **Trends in Molecular Medicine**. v.8, n. 8, p. 370-374, aug 2002.

VÉDIE, B.; JEUNEMAITRE, X.; MÉGNIEN, J.L.; MYARA, I.; TRÉBEDEN, H.; SIMON, A.; MOATTI, N. Charge Heterogeneity of LDL in Asymptomatic Hypercholesterolemic Men is Related to Lipid Parameters and Variation in the ApoB and CIII Genes. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v. 18, n. 11, p.1780-1789, 1998.

WANG, T.; HSU, C.; CHIN, Y.; LIN, Y. The Autoantibody Expression Against Different Source of Oxidized Low-Density Lipoprotein in Patients with Acute Myocardial Infarction. **Thrombosis Research**. v. 107, p. 175-179, 2002.

WATSON, A.D.; NAVAB, M.; HAMA, S.; SEVANI, A.; PRESCOTT, S.M.; STAFFORINI, D.; 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. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 95, n. 2, p. 774-782, feb. 1995.

YEH, E.T.H.; WILLERSON, J.T. Coming of Age of C-Reactive Protein. Using Inflammation Markers in Cardiology. **Circulation**. v. 107, p. 370-372, 2003.

YOSHIDA, H.; QUEHENBERGER, O.; KONDRANTENKO, N.; GREEN, S.; STEINBERG, D. Minimally Oxidized Low-Density Lipoprotein Increases Expression of Scavenger Receptor A, CD36, and Macrosialin in Resident Mouse Peritoneal Macrophages. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v. 18, n. 5, p. 794-802, may 1998.

YU, H.; RIFAI, N. High-Sensitivity C-Reactive Protein and Atherosclerosis: From Theory to Therapy. **Clinical Biochemistry**. v. 33, n. 8, p. 601-610, 2000.

ZAMAN, A.G.; HELFT, G.; WORTHLEY, J.J.; BADIMON, J.J. The Role of Plaque Rupture and Thrombosis in Coronary Artery Disease. **Atherosclerosis**. v. 140, p. 251-266, 2000.

III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial. **Rev. Bras. Clin. Terap.** v. 24, n.6, p. 231-272, 1998.