

Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo

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

Possíveis Conexões entre Hipertensão e Hipercolesterolemia, em  
Relação a Aterosclerose: Vias de Inativação do Óxido Nítrico e  
Oxidação das Lipoproteínas

PATRICIA MORIEL

Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientadora :  
Profa. Associada Dulcineia S. P. Abdalla

São Paulo  
2001

16.830

**DEDALUS - Acervo - CQ**



30100003900



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

Possíveis Conexões entre Hipertensão e Hipercolesterolemia, em  
Relação a Aterosclerose: Vias de Inativação do Óxido Nítrico e  
Oxidação das Lipoproteínas

PATRICIA MORIEL

Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientadora :  
Profa. Associada Dulcineia S. P. Abdalla

São Paulo  
2001

---

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

M855p Moriel, Patricia  
Possíveis conexões entre hipertensão e hipercolesterolemia,  
em relação a aterosclerose : vias de inativação do óxido nítrico  
e oxidação das lipoproteínas / Patricia Moriel. -- São Paulo,  
2001.  
126p.

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

Orientador: Abdalla, Dulcineia Saes Parra

1. Análise clínica : Medicina 2. Bioquímica I. T. II.  
Abdalla, Dulcineia Saes Parra, orientador

616.0756-9 CDD



*Patricia Moriel*

Possíveis Conexões entre Hipertensão e Hipercolesterolemia, em  
Relação a Aterosclerose: Vias de Inativação do Óxido Nítrico e  
Oxidação das Lipoproteínas

Comissão julgadora  
Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR

Profa. Dra. Dulcineia S. P. Abdalla  
Orientador/Presidente

Dr. Marcelo C. Bertolami  
1º. Examinador

Prof. Dra Maria Tereza Zanella  
2º. Examinador

Prof. Dr. Roberto Zatz  
3º. Examinador

Prof. Dr. Joel Heimann  
4º. Examinador

São Paulo, 10 de abril de 2001

A Deus por ter me dado a chance de conhecer o maior mistério: a vida.

Aos meus pais Antônio e Judite, que me ajudaram a construir o que sou hoje, por todo o carinho, incentivo, estímulo, amor.....

Ao meu esposo Eder, pelo amor, paciência, ensinamentos, ajuda, compreensão, infindável apoio, e por fazer parte da minha história.

À minha irmã Gisele por momentos de extremo carinho, ajuda, diversão e distração.

À minha orientadora Dulcineia pelo apoio, compreensão, paciência e orientação.

---

**Se eu pudesse deixar algum presente a você,  
deixaria aceso o sentimento de amar a vida  
dos seres humanos.**

**A consciência de aprender tudo o que foi  
ensinado pelo tempo a fora. Lembraria os  
erros que foram cometidos para que não  
mais se repetissem. A capacidade de  
escolher novos rumos.**

**Deixaria para você, se pudesse, o respeito  
àquilo que é indispensável: Além do pão, o  
trabalho.**

**Além do trabalho, a ação.**

**E, quando tudo mais faltasse, um segredo:  
O de buscar no interior de si mesmo a  
resposta  
e a força para encontrar a saída."**

**(Gandhi)**

---

## Agradecimentos

Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, pois cada pessoa é única. E nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, mas não vai só e nem nos deixa sós; levam um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito, mas há os que não levam nada, há os que deixam muito, há os que não deixam nada. Essa é a maior responsabilidade das nossas vidas e a prova evidente que duas almas não se encontram ao acaso.

Gostaria de agradecer à dra. Ana Campa por sua alegria de viver, pelo incentivo, idéias e pelas conversas descontraídas no laboratório; ao Dr. Marcelo C. Bertolami, que guardo muita admiração e carinho, não apenas pela triagem e encaminhamento dos pacientes, mas pela forma admirável de exercer a medicina, pela gentileza e confiança em ceder seu laboratório e pela excelente pessoa que é. Ao Dr. Sérgio Ajzen, pela realização das ultrassonografias e ajuda na compreensão das mesmas. À Dra. Maria T. Zanella e dra. Frida Plavinik pela triagem e encaminhamento dos pacientes hipertensos. À Dra. Marina Tavares pelos valiosos ensinamentos em eletroforese capilar. A todos os professores e responsáveis pelos laboratórios da FCF e IQ da USP, InCor, Int. Dante Pazzanezze (em especial a Yara), UNIFESP, Hemocentro entre outros, pelos ensinamentos, pela gentileza e confiança em ceder seus laboratórios e equipamentos. Agradeço a ótima convivência com todos professores do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP.

A todos voluntários (pais, sogra, tios, orientadora, amigos etc..) e pacientes que confiaram e tiveram a gentileza de participarem dessa tese doando sangue e fazendo os exames necessários.

Agradeço também aos alunos de pós-graduação Nágila, Isabela, Yi Hsin, Joelma, Alvorita, Luiz, Liliete e Edson pela saudável convivência, pelas conversas, muitas risadas, outras vezes lágrimas, e tenham certeza que a maior saudade deste período da pós-graduação será nossa amizade.

Aos alunos de pós graduação Selma, Boni, Ivanise, Rosângela, Célio, Lia, Marcelo, Edlaine, Diana, Teresa, Edimar, Emerson, Daniela, Arício; aos alunos de iniciação científica Fábio, Paula, Karin, Vanessa, Elaine, Aléxis, Juliana, Fabiana, Fernanda, Cristina e Márcia; ao ex-técnico do laboratório Flávio, a todos esses e a

outros infindáveis nomes pela divertida convivência, indispensável amizade e parceria; às secretárias Sofia, Márcia, Sueli, Benedita, Elaine e ao secretário Jorge, pela atenção e amizade.

Devo ainda gratidão à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de seu Diretor, Prof. Titular Jorge Mancini Filho; ao departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo, em nome de sua chefe, prof. Associada Dulcineia S. P. Abdalla; à coordenadoria de pós-graduação em Farmácia – área de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de sua presidente, prof. Dra. Primavera Borelli.

---

## 1. SUMÁRIO

1 – SUMÁRIO.....	vii
2 - INTRODUÇÃO.....	01
2.1 - Conceitos gerais sobre o metabolismo das lipoproteínas.....	01
2.2 - Aterosclerose.....	03
2.3 - Modificações oxidativas das lipoproteínas e aterosclerose.....	08
2.4 - Hipertensão e aterosclerose.....	15
3 - OBJETIVOS.....	28
3.1 - Objetivo geral.....	28
3.2 - Objetivos específicos.....	28
4 – METODOLOGIA.....	29
4.1 - Padronizações.....	29
4.1.1- Padronização da determinação de nitrato.....	29
4.1.2 - Padronização da determinação de S-nitrosotióis.....	30
4.1.3 - Avaliação do Kit de isoprostanos por ELISA.....	30 →
4.1.4 - Avaliação da determinação de endotelina por ELISA.....	31
4.1.5 - Padronização do ELISA para determinação de nitrotirosina.....	32
4.2 - Pacientes.....	37
4.3 - Coleta.....	39
4.4 - Isolamento de lipoproteínas.....	40
4.5 - Determinação de colesterol total, proteínas e triacilgliceróis no plasma e do colesterol nas lipoproteínas.....	41
4.6 - Determinação dos hidroxí/hidroperóxidos de éster de colesterol (CE-OOH), triacilglicerol (TL-OOH) e fosfolípides (PL-OOH).....	41
4.7 - Determinação de ascorbato, urato, $\alpha$ -tocoferol, $\beta$ -caroteno e licopeno.....	42
4.8 - Cinética de oxidação da LDL.....	42
4.9 - Determinação de nitrato.....	43
4.10 - Determinação da espessura do complexo medial - intimal do endotélio das artérias carótidas e braquial e da presença de placa aterosclerótica.....	43
4.11 - Determinação do relaxamento vascular dependente do endotélio (RDE).....	44
4.12 - Nitrotirosina plasmática.....	45

---

4.13 - Nitrotirosina ligada à LDL .....	45
4.14 – Nitrotirosina na albumina plasmática.....	46
4.15 - Determinação de nitrito no plasma e nos eritrócitos.....	46
4.16 - S-nitrosotióis no plasma .....	47
4.17 - Determinação das apolipoproteínas, Cerulolasmina, Lpa, fibrinogênio, plasminogênio e proteína C reativa (PCR).....	47
4.18 - Determinação da paraoxonase.....	47
4.19 – Determinação da endotelina.....	48
4.20 – Determinação dos isoprostanos.....	48
4.21 – Determinação dos óxidos de colesterol.....	48
4.22 - Análise estatística.....	52
5. RESULTADOS.....	53
5.1 - Padronizações.....	53
5.1.1 - Padronização da determinação de nitrato .....	53
5.1.2 - Padronização da determinação de S-nitrosotióis.....	54
5.1.3 - Avaliação da determinação de isoprostanos por ELISA.....	55
5.1.4 - Avaliação da determinação de endotelina por ELISA.....	55
5.1.5 - Padronização do ELISA para determinação de nitrotirosina.....	58
5.2 - Pacientes.....	63
5.3 – Perfil lipídico, ceruloplasmina, fibrinogênio, PCR e plasminogênio.....	63
5.4 – Antioxidantes.....	66
5.5 – Hdroxi/hidroperóxidos lipídicos, lag time, óxidos de colesterol e isoprostanos....	71
5.6 – Relaxamento derivado do endotélio e endotelina.....	76
5.7 – Nitrato, nitrito, nitrotirosina e S-nitrosotióis.....	81
5.8 – Correlações.....	86
6. – DISCUSSÃO e CONCLUSÕES .....	91
6.1 – Discussão.....	91
6.2 – Conclusões.....	105
7. – RESUMO e ABSTRACT.....	108
7.1 – Resumo.....	108
7.2 – Abstract.....	110
8. - BIBLIOGRAFIA.....	112

**Principais abreviações:**

Apo – Apoproteína;

CE-OOH – Hidroxi/hidroperóxidos de éster de colesterol;

CG – cromatografia gasosa;

Cos – óxidos de colesterol;

ET – endotelina;

H – grupo hipertenso normocolesterolêmico;

HC – grupo normotenso hipercolesterolêmico;

HDL – Lipoproteína de alta densidade;

HPLC – cromatografia líquida de alta performance;

LDL – Lipoproteína de baixa densidade;

LDLox - LDL oxidada;

N – grupo normotenso normocolesterolêmico;

NOS \_ óxido nítrico sintase;

PCR – proteína C-reativa;

PL-OOH - Hidroxi/hidroperóxidos de fosfolípidos;

RDE – Relaxamento dependente do endotélio;

RSNO – S-nitrosotióis;

TG – Triacilglicerol;

TL-OOH - Hidroxi/hidroperóxidos de triacilglicerol;

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade;

---



## ***2. INTRODUÇÃO***

---

## 2.1 - CONCEITOS GERAIS SOBRE O METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS

As lipoproteínas são os transportadores dos lípidos na circulação sanguínea e linfática. São constituídas por uma parte central (*core*) contendo lípidos apolares (triacilgliceróis e ésteres de colesterol), a qual é envolvida por uma camada superficial formada por lípidos anfílicos (colesterol não esterificado e fosfolípidos) e proteínas (apolipoproteínas). A classificação dessas partículas baseia-se nas suas densidades e migrações eletroforéticas, que dependem da composição lipídica e protéica das mesmas.

O transporte dos lípidos é dividido em dois ciclos: exógeno e endógeno. O ciclo exógeno tem início com a absorção do material lipídico proveniente da alimentação e a síntese dos quilomícrons pelas células intestinais. Estes entram na circulação linfática e atingem a corrente sanguínea pelo ducto torácico. Os **quilomícrons** são lipoproteínas ricas em triacilgliceróis, que apresentam principalmente as apolipoproteínas B<sub>48</sub>, A-I e A-II. Os triacilgliceróis dos quilomícrons são hidrolisados pela Lipase Lipoproteica (LPL, E.C. 3.1.1.34), que se encontra ligada às células endoteliais dos tecidos periféricos. A hidrólise dos triacilgliceróis pela LPL resulta na liberação de ácidos graxos, que são armazenados nas células dos tecidos periféricos ou transportados ao fígado ligados à albumina (Tan e cols., 1977). As partículas resultantes desse processo metabólico denominam-se **remanescentes de quilomícrons** e são captadas principalmente por receptores hepáticos, que reconhecem especificamente a apolipoproteína (apo) E (Hui e cols., 1986).

O ciclo endógeno inicia-se com a síntese hepática da **Lipoproteína de Densidade Muito Baixa (VLDL)**. A VLDL é composta principalmente de triacilgliceróis e apresenta principalmente as apolipoproteínas B<sub>100</sub>, C-I, C-II, C-III e E na sua superfície. Na circulação capilar a VLDL entra em contato com a lipase lipoproteica e é hidrolisada dando origem à **Lipoproteína de Densidade Intermediária (IDL)**. Esta pode seguir dois caminhos: ser captada pelo fígado através do receptor B/E ou da proteína relacionada ao receptor da LDL (Dergunov e Rosseneu, 1994), ou transformar-se finalmente em **Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL)**, que é uma partícula mais rica em ésteres de colesterol e apresenta quase que 100% de apo B<sub>100</sub> em sua superfície. A LDL tem como principal função o transporte de colesterol para os

tecidos extra-hepáticos. No interior das células, a LDL é fragmentada e libera o colesterol livre e aminoácidos. O colesterol livre é utilizado imediatamente ou armazenado após esterificação. O colesterol intracelular é utilizado na síntese de novas membranas celulares, ou na formação de hormônios esteróides pela córtex da supra-renal e gônadas. A síntese do receptor B/E é regulada pelo conteúdo intracelular de colesterol. Alterações estruturais das LDL, ou mais especificamente da apo-B100, bem como alterações que resultem na diminuição da afinidade de ligação ou da produção dos receptores celulares, podem ser importantes causas dos processos ateroscleróticos (Rapacz e cols., 1986).

A HDL nascente é sintetizada e secretada pelo fígado e intestino delgado, ou produzida extracelularmente (Johnson e cols., 1991), na forma de partículas discoidais contendo fosfolípidos. Seus principais componentes protéicos são apo A-I, A-II e E. Na circulação, estas partículas tornam-se enriquecidas com colesterol de outras lipoproteínas e das células dos tecidos extra-hepáticos. A HDL atua também como acceptora de fosfolípidos e colesterol livre liberados da VLDL e quilomícrons, durante a lipólise dessas lipoproteínas nos capilares dos tecidos periféricos (Gotto e cols., 1993 e Heinecke e cols., 1986). O colesterol livre na superfície da HDL é então esterificado pela ação da lecitina colesterol acil transferase (LCAT, E.C. 2. 3 .1 .43), que utiliza apo A-I presente na HDL como cofator. Os ésteres de colesterol mais apolares migram para o interior da partícula da HDL, tornando-a progressivamente esférica (HDL<sub>3</sub>) e com maior diâmetro (HDL<sub>2</sub>). A HDL<sub>2</sub> rica em ésteres de colesterol doa parte desses lípidos para as lipoproteínas contendo apo B (VLDL e LDL), recebendo triacilgliceróis. A HDL<sub>2</sub> rica em triacilgliceróis sofre a ação das lipases hepáticas (L.H., E.C. 3. 1. 1. 3) e lipoproteica, liberando parte de seu conteúdo lipídico para o fígado e convertendo-se novamente em HDL<sub>3</sub>. A principal função fisiológica da HDL seria sua participação nesse processo conhecido como **transporte reverso do colesterol**, que consiste na captação do colesterol efluente das células dos tecidos periféricos e seu transporte para o fígado onde é metabolizado e excretado pelas vias biliares (Brown e Goldstein, 1983). Altos níveis séricos de HDL estão associados à diminuição do risco de desenvolvimento da aterosclerose.

Outra importante lipoproteína envolvida no desenvolvimento de doenças cardiovasculares é a Lp(a). A Lp(a) não é derivada do catabolismo de outra

lipoproteína, sendo sintetizada no fígado (Hixson e cols., 1989). Essa lipoproteína tem tamanho e densidade semelhantes à LDL, mas apresenta uma apoproteína adicional, a apo (a), com alta homologia com o plasminogênio (McLean e cols., 1982) e que se liga à apo B<sub>100</sub> por uma ligação dissulfeto (Gaubatz e cols., 1982). Alguns estudos demonstram que a Lp(a) pode ligar-se aos receptores da LDL, porém com menor eficiência (Utermann, 1989). Um possível mecanismo aterogênico da Lp(a) seria a competição com o plasminogênio por receptores específicos, prejudicando a formação de plasmina e criando um estado pró-trombótico (Scanu, 1991).

## 2.2 - ATEROSCLEROSE

A aterosclerose é uma doença progressiva dos vasos sanguíneos caracterizada pelo depósito de lípidos na camada íntima das artérias, recrutamento de células inflamatórias (predominantemente monócitos e linfócitos T) para a íntima, proliferação de células musculares lisas e elaboração de colágeno e proteínas da matriz por estas células (O'Brien e Chait, 1994). As alterações ateroscleróticas começam a se desenvolver em estágios iniciais da vida. No entanto, a sintomatologia clínica da doença cardiovascular, como o acidente vascular cerebral e o infarto do miocárdio, manifesta-se apenas na fase adulta. As consequências específicas destas mudanças patológicas dependem, em parte, do tamanho da artéria envolvida. Grandes artérias elásticas, incluindo as artérias aorta e ilíaca, normalmente sofrem destruição da parede com dilatação aneurismal, enquanto que as artérias musculares de médio e pequeno tamanho, como as artérias coronárias, carótidas, femorais e tibiais, geralmente desenvolvem lesões oclusivas, resultando em complicações relacionadas à isquemia (Ross, 1986).

### **Etiologia**

Muitos fatores de risco estão associados com a aterosclerose. Os mais importantes fatores até agora identificados são as dislipidemias, o diabetes, o tabagismo e a hipertensão. A tabela 1 mostra os efeitos propostos para estes fatores de risco sobre a aterogênese (O'Brien e Chait, 1994). Além destes, muitos outros fatores de risco para

doenças cardiovasculares são propostos, tais como fatores psico-sociais e estresse (Manuck e cols., 1986), obesidade, sexo e idade (Hopkins e Willians, 1981).

**Tabela 1** - Efeitos propostos dos fatores de risco da aterosclerose sobre a aterogênese (O'Brien e Chait, 1994).

<b>DISLIPIDEMIA</b>	<b>DIABETES</b>
Dano endotelial	Lipoproteínas
Indução da expressão endotelial do gene para lipoproteínas minimamente oxidadas	dislipidemias ( ↑ triacilgliceróis; ↓HDL; LDL é mais densa) resultando em um aumento da deposição lipídica
Aumento da susceptibilidade de oxidação das lipoproteínas	↑ da susceptibilidade de oxidação
Acúmulo de lípidos	Efeitos pró-coagulantes
acúmulo intracelulares de lipoproteínas modificadas	↑ da atividade dos fatores VII, X e PAI-1
ligação de lípidos extracelular à matriz	↑ aumento da agregação plaquetária
Efeitos pró-coagulantes	Efeitos mediados pela hiperinsulinemia
indução do fator tecidual e de PAI-1 pela LDL oxidada	↑ da proliferação de células musculares e síntese da matriz
↑ de atividade do fator VII, X e PAI-1 na hipertrigliceridemia	↑ da atividade do receptor para LDL
Redução do efluxo de colesterol das células	↑ da síntese endógena de colesterol
	↑ da esterificação do colesterol intracelular
	↓ da remoção de colesterol mediada pela HDL
<b>HIPERTENSÃO</b>	<b>TABAGISMO</b>
Endotélio	Dano endotelial
↑ aderência e infiltração de monócitos	↑ permeabilidade endotelial
Disfunção imune	↑ retenção de proteínas plasmáticas na íntima
↓ proliferação de macrófagos	Efeitos pró-coagulantes
↓ resposta do β-receptor de linfócitos	↑ agregação plaquetária
Efeitos mediados pela angiotensina II	↑ níveis de fibrinogênio
↑ síntese de proteínas da matriz das células musculares lisas (ex. α-actina)	↑ produção de tromboxano A <sub>2</sub>
↑ síntese de citocinas ( ex. PDGF, TGF-β )	Lipoproteínas
↑ expressão de citocinas de macrófagos	↓ HDL
	↑ LDL, VLDL
	↑ oxidação das lipoproteínas

## A parede arterial

As artérias são o sítio predominante das lesões ateroscleróticas. A parede arterial é dividida histologicamente em 3 camadas: a íntima, a média e a adventícia. A íntima é a camada interna que reveste a parede do vaso. Ela consiste em uma camada contínua de células endoteliais que separam o fluxo sanguíneo das poucas células musculares lisas no espaço subendotelial e da pequena quantidade de tecido conjuntivo, os quais fazem parte da íntima. É separada da média por uma camada fenestrada de elastina, chamada lâmina elástica interna. A camada média é constituída quase que inteiramente por células musculares lisas e por uma matriz extracelular contendo substâncias produzidas pelas células musculares lisas, como os proteoglicanos e o colágeno. Essa camada é separada da adventícia pela lâmina elástica externa. A adventícia é a camada mais externa da parede do vaso e é composta de tecido conjuntivo contendo fibras elásticas, vasos sanguíneos (*vasa vasorum*) que carregam nutrientes para as células musculares lisas, fibroblastos e alguns macrófagos (Rhodin, 1980). As células endoteliais revestem a parede dos vasos sanguíneos e, assim, constituem uma importante barreira mecânica. Tem sido determinado a espessura do complexo medial-intimal das artérias carótidas, onde o aumento desta espessura tem-se relacionado com o aumento da propensão ao desenvolvimento da aterosclerose (Pignoli e cols., 1986). Tem sido demonstrado que a medida da espessura medial-intimal está correlacionada às concentrações de colesterol total, LDL-colesterol, apo B e apo E, sendo assim utilizada como uma determinação do desenvolvimento precoce da aterosclerose (Hodis e cols., 1996).

## Lesão aterosclerótica

As lesões ateroscleróticas formam-se inicialmente na íntima, sendo que as mudanças na camada média são secundárias. As lesões ateromatosas acumulam-se na íntima principalmente nas bifurcações e ramificações das artérias. A localização das placas é determinada principalmente pelo *shear stress* (força de cisalhamento) na parede arterial (Reinhart, 1994). O *shear stress* modula várias alterações funcionais dos vasos, podendo induzir a liberação de prostaciclina (Frangos e cols., 1984) e óxido nítrico (Rubanyi e cols., 1986), além de promover a formação do radical ascorbil (Laurindo e



cols., 1994). As alterações funcionais e morfológicas das células endoteliais precedem a formação das lesões, mas os eventos iniciais da aterogênese não levam necessariamente à denudação do endotélio e as lesões iniciais desenvolvem-se em locais com endotélio íntegro. Um importante evento inicial no desenvolvimento da aterosclerose é a adesão de monócitos ao endotélio (Gerrity, 1981). A adesão de monócitos ao endotélio vascular é um dos principais fenômenos detectados na aterosclerose experimental. Essa adesão de monócitos pode ser considerada como uma alteração funcional do endotélio, que expressa certas proteínas de superfície chamadas "athero-elams" que pertencem à grande família das moléculas de adesão intercelular (Cybulski e Gimbrone, 1991). Os linfócitos T também aderem e penetram no endotélio nas lesões iniciais. A expressão das moléculas de adesão é modulada por citocinas, tais como a IL-1 (interleucina 1), IL-4 (interleucina 4), IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ) e TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ ) liberadas por monócitos/macrófagos e linfócitos T (Regnström e Nilsson, 1994). Após a adesão à superfície endotelial, os monócitos migram para o espaço subendotelial e diferenciam-se em macrófagos.

São conhecidos três estágios principais no processo de formação da placa aterosclerótica: 1) a estria gordurosa, 2) a placa fibrosa e, por último, 3) a lesão complicada.

A estria gordurosa é o estágio inicial do processo da aterosclerose, caracterizada pela formação e acúmulo de células espumosas (*foam cell*) na íntima. A estria gordurosa é uma lesão rica em lípidos e de superfície plana (Ross, 1986). Vários tipos de lipoproteínas e de receptores podem levar à formação de células espumosas (Haberland e Steinbrecher, 1992). Tanto os macrófagos como as células musculares lisas acumulam colesterol na lesão vascular de uma maneira não controlada por retroalimentação negativa para formar as células espumosas - o marco celular da aterosclerose. A lipoproteína nativa (não oxidada), não promove a formação de células espumosas, pois estas partículas são captadas pelo receptor B/E, cuja atividade é regulada pelo conteúdo de colesterol intracelular por um mecanismo de *feedback* negativo. Ao contrário do receptor B/E, o receptor *scavenger* não sofre contra-regulação pelo colesterol intracelular, o que permite uma captação exacerbada das lipoproteínas e a conseqüente formação de *foam cells* (Haberland e Steinbrecher, 1992). Estudos recentes demonstraram que a LDL oxidada tem alta afinidade por várias

proteínas de membrana das células, além do clássico receptor *scavenger*. Uma característica comum destas proteínas é a habilidade de se ligar a estruturas variadas, recebendo uma designação de receptores multiligantes (Krieger e cols., 1993). As funções primárias destes receptores não estão bem estabelecidas, muitas funções tem sido propostas. A classificação atual destes receptores é baseada na sua seqüência homóloga e nas similaridades estruturais, mas também estes podem ser agrupados em relação a especificidade da ligação e ao tipo celular envolvido. Os receptores *scavengers* são classificados em três classes: 1) Classe A SR, composta pelos receptores SR-AI/II (macrófagos) e MARCO (macrófagos do baço); 2) Classe B SR, composta pelos receptores SR-B1/CLA-1 (fígado, gônadas e células adrenais) e CD36 (plaquetas, monócitos, células endoteliais); 3) Outros receptores, composto pelos receptores SR-C1 (macrófagos), Microsialin/CD68 (macrófagos e células de Kupffer), Fcγ (macrófagos), SR EC (células endoteliais), LOX-1 (células endoteliais) (revisado por Steinbrecher, 1999).

Posteriormente, os macrófagos ativados e as células endoteliais produzem fatores de crescimento e outros moduladores celulares, que estimulam a produção de colágeno e a proliferação das células musculares lisas, que vão formar a placa fibrosa. A transformação das células musculares lisas de um fenótipo contrátil para um fenótipo secretor é considerada um importante passo neste estágio de progressão da doença (Nilsson, 1986 e Thyberg e cols., 1990). A lesão complicada se manifesta por calcificação, hemorragia e fissura da placa com consequente trombose local (Chesebro e Fuster, 1991).

Além da proliferação das células musculares lisas, da formação das células espumosas, da lesão endotelial e do depósito de tecido conectivo, o depósito de lipoproteínas (infiltração através do endotélio) contribui para complicar a lesão aterosclerótica. O crescimento progressivo da placa leva à necrose celular e à deterioração da *vasa vasorum*, o que impede a reabsorção das lipoproteínas da placa. Toda esta combinação de eventos nos estágios finais leva à ruptura hemorrágica da placa e à trombose vascular (Chesebro e Fuster, 1991). Tem sido mostrado que o centro necrótico tem um papel importante na ruptura da placa. A causa da morte de células espumosas na lesão aterosclerótica não é ainda muito clara, mas existem algumas evidências que estas células morrem por apoptose (Geng e Libby, 1995).



A ruptura ou a fissura da placa aterosclerótica estimula a formação de trombina local pela via intrínseca e extrínseca da coagulação. De acordo com a severidade da lesão, a trombina ou o colágeno facilita a agregação plaquetária. As plaquetas na placa secretam tromboxano A<sub>2</sub>, serotonina e ADP, que ampliam a agregação plaquetária. A formação de fibrina mediada por trombina e a agregação plaquetária conduzem à trombose arterial (Chesebro e Fuster, 1991).

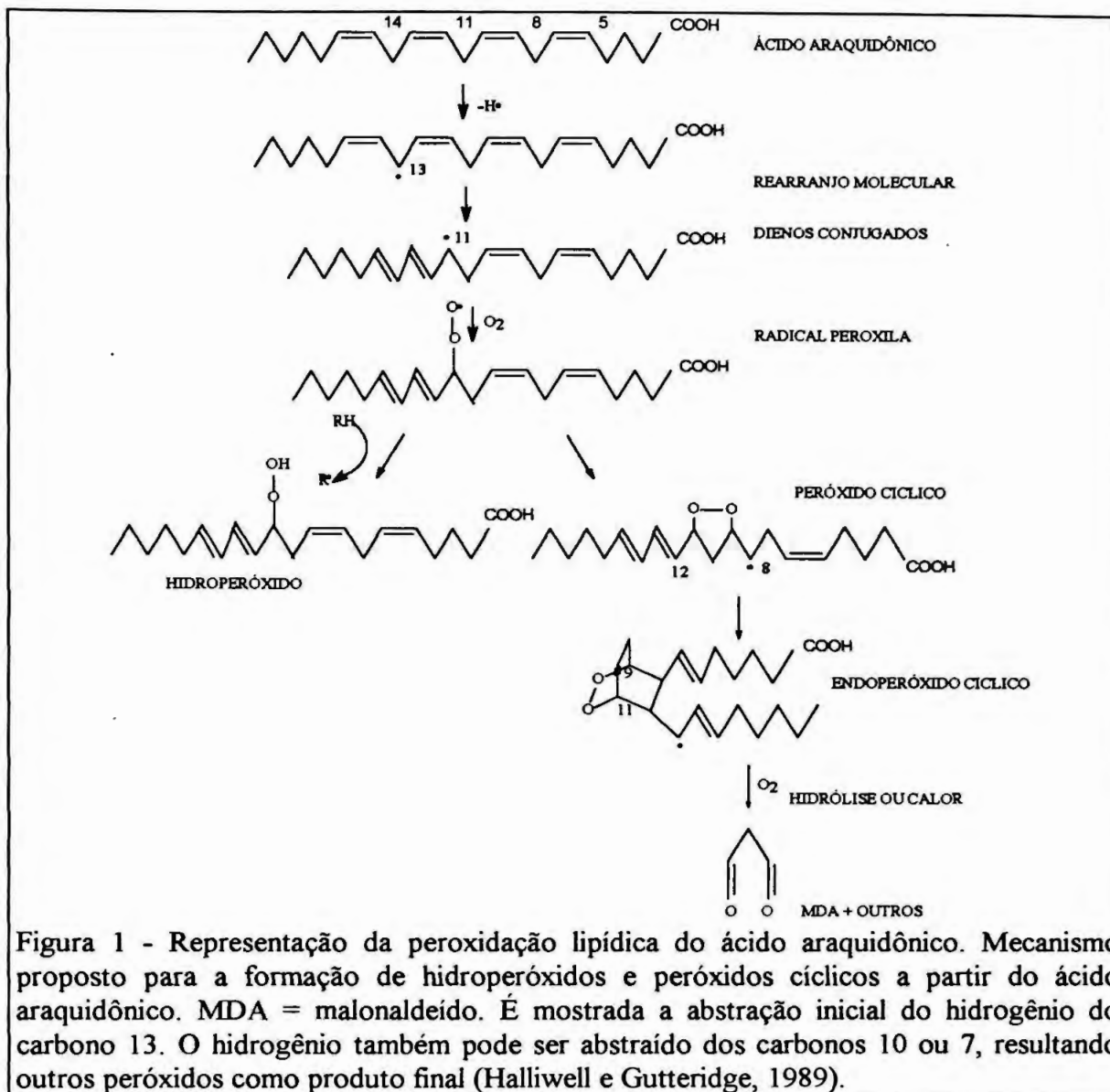
### 2.3 - MODIFICAÇÕES OXIDATIVAS DAS LIPOPROTEÍNAS E ATEROSCLEROSE

As lipoproteínas plasmáticas VLDL, LDL e HDL são passíveis de sofrerem modificações oxidativas. A suscetibilidade dessas lipoproteínas à oxidação depende do equilíbrio entre a geração de espécies oxidantes e os antioxidantes hidrossolúveis, nos compartimentos onde as mesmas estão presentes, e, principalmente, pela quantidade de antioxidantes lipossolúveis transportados por essas partículas. A formação de hidroperóxidos lipídicos no plasma ocorre assim que os antioxidantes hidrossolúveis são consumidos. Após o consumo dos antioxidantes lipossolúveis contidos nas lipoproteínas, a oxidação dos ácidos graxos insaturados ocorre exponencialmente. Além dos antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis, outro importante fator de proteção envolvido na proteção da modificação oxidativa da LDL é a paraoxonase. A paraoxonase é uma enzima que está associada à HDL e hidrolisa os peróxidos lipídicos prevenindo, assim, a modificação oxidativa da LDL (Watson e cols., 1995).

No plasma sanguíneo, as reações de peroxidação podem, potencialmente, ser iniciadas por metais de transição, tais como cobre e ferro (Harman, 1986), pela oxidação da homocisteína (Proctor e McGinness, 1984) ou por espécies reativas de oxigênio geradas por neutrófilos (Sarks e cols., 1978), plaquetas (Freeman e Crapo, 1982), células endoteliais e de músculo liso (Morel e cols., 1984).

O processo da peroxidação lipídica pode ser dividido em três etapas: a fase de iniciação, a fase de propagação e a fase de terminação. A fase de iniciação representa o início da peroxidação, onde o ácido graxo poliinsaturado sofre ataque de uma espécie que é suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio a partir do grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-), formando um radical de carbono. Este radical é estabilizado por um

rearranjo molecular para formar um dieno conjugado. Os dienos conjugados podem sofrer várias reações. Em meio aeróbico o radical de carbono se combina com  $O_2$  formando o radical peroxila, o qual pode abstrair um hidrogênio alílico de um outro ácido graxo e gerar um outro radical de carbono, promovendo a etapa de propagação (figura 1) (Halliwell e Gutteridge, 1989). Na decomposição dos hidroperóxidos lipídicos a radicais peroxila e alcoxila, os íons metálicos em ambos os estados de valência (ex.  $Fe^{+++}/Fe^{++}$  ou  $Cu^+/Cu^{++}$ ) podem catalisar a decomposição do hidroperóxido lipídico, onde a reação com  $Fe^{++}$  e com  $Cu^+$  é favorecida termodinamicamente (Esterbauer e cols., 1992). Na fase de terminação, os radicais peroxila e alcoxila podem: a) sofrer uma clivagem  $\beta$  formando aldeídos, que podem formar uma ligação covalente com resíduos de aminoácidos na apo-B; b) levar à fragmentação da apo B (principalmente o radical alcoxila) e c) sofrer um rearranjo formando produtos secundários da lipoperoxidação (ex. derivados hidroxi-, ceto-, ceto-hidroxi- e epoxi-hidroxi-ácido graxo) (Esterbauer e cols., 1992).



Os hidroperóxidos lipídicos aumentam a permeabilidade de monocamadas de células endoteliais à albumina e à LDL, *in vitro* (Henning e cols., 1986). A oxidação da LDL promovida por células endoteliais e musculares lisas, macrófagos e fibroblastos é dependente da produção de superóxido por essas células (Steinbrecher e cols., 1987). O radical superóxido é importante para a iniciação da modificação oxidativa da LDL, mas a propagação e amplificação do processo envolve outros radicais livres, provavelmente radicais peroxila derivados da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados (Steinbrecher e cols., 1990) (figura 1). Neutrófilos e monócitos estimulados apresentam um “burst oxidativo”, dependente do sistema da NADPH oxidase, com grande produção de radical superóxido, que pode induzir a oxidação da LDL (Cathcart e cols., 1985). Se esse

processo ocorrer na presença de ferro ou cobre, a oxidação da LDL é exacerbada (Abdalla e cols., 1990). De fato, tem sido relatado que neutrófilos e monócitos de pacientes hipercolesterolêmicos e hipertrigliceridêmicos apresentam maior produção de radical superóxido, quando estimulados (Keaney e cols., 1994, Hiramatsu e Arimori, 1988 e Abdalla e cols., 1994). A modificação oxidativa da LDL resulta na alteração de várias propriedades físico-químicas dessa partícula, dentre as quais o aumento de sua carga negativa que facilita seu reconhecimento pelo receptor “scavenger” dos macrófagos. Esses receptores são os responsáveis pela captação de partículas modificadas de LDL pelos macrófagos por uma via não saturável, levando à formação das células espumosas no processo de aterogênese (Brown e cols., 1980). Outras alterações estruturais e na composição da partícula de LDL também ocorrem, tais como: o aumento da densidade, da mobilidade eletroforética (Jürgens e cols., 1987), e do conteúdo de lisolecitina; a diminuição dos aminoácidos histidina, lisina e prolina (Steinberg e cols., 1989) e a hidrólise da fosfatidilcolina à lisofosfatidilcolina, que apresenta propriedades quimiotáticas para monócitos (Quinn e cols., 1988). Importantes evidências indicam a formação de LDL modificada oxidativamente (LDLox), *in vivo*: a) presença de autoanticorpos que reconhecem a LDLox (mas não a LDL nativa) no plasma de pacientes com aterosclerose (Parums e cols., 1990) e b) anticorpos anti-LDL oxidada reagem com componentes das lesões ateroscleróticas e com a LDL extraída dessas lesões (Yla-Herttuala e cols., 1989). Tem-se sugerido que nos estágios mais iniciais da aterosclerose, primeiramente a LDL minimamente oxidada poderia ser gerada, já a LDL oxidada poderia ser formada em estágios mais avançados da aterosclerose onde existe uma intensa reação inflamatória (Sellmayer e cols., 1999).

A LDL modificada oxidativamente pode contribuir para a aterogênese por diferentes mecanismos (figura 2):

- a) recrutando monócitos circulantes através de fatores quimiotáticos presentes somente na LDL oxidada (Quinn e cols., 1988);
- b) inibindo a motilidade dos macrófagos residentes da camada íntima (Steinberg e cols., 1989);
- c) aumentando a captação da LDL oxidada pelos macrófagos residentes, levando à formação de *foam cells* (Henriksen e cols., 1982);
- d) alterando a integridade da camada endotelial (Jürgens e cols., 1987).



e) indução das células de adesão para leucócitos no endotélio (revidado por Jialal e Devaraj, 1996);

f) aumentando a secreção de proteína quimiotática para monócito (MCP-1) e de fatores estimuladores de colônia de macrófagos (revidado por Jialal e Devaraj, 1996);

g) quimiotáxia para monócitos e potente inibidor da mobilidade de macrófagos;

h) indução da liberação de interleucina-1;

i) inibição do vasorrelaxamento endotelial.

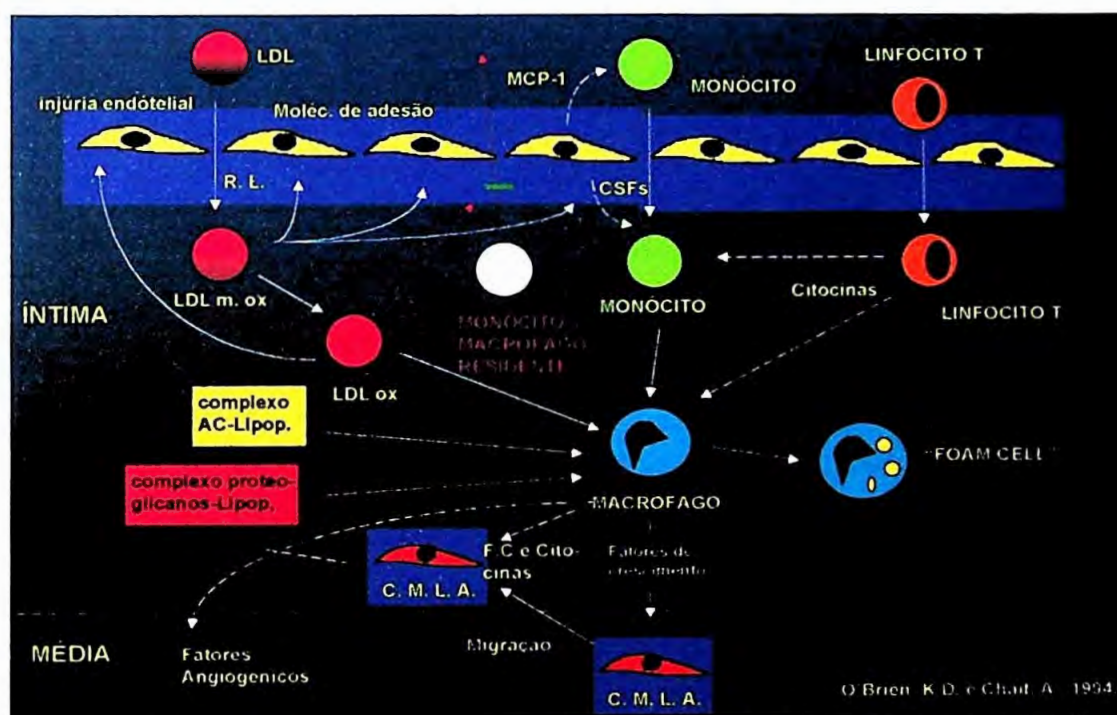


Figura 2 - Mecanismos propostos da participação da LDL oxidada no processo de aterogênese. LDL m. ox. - LDL minimamente oxidada; LDL ox LDL oxidada. C.M.L.A. - células musculares lisas arteriais; F.C. - fatores de crescimento; MCP-1 - proteína quimiotática para monócito; CSFs - Fatores estimuladores de colônia.

Os efeitos vasculares tanto da LDL extensivamente oxidada quanto da LDL minimamente oxidada estão sendo claramente elucidados, contudo os componentes presentes nestas partículas responsáveis pelos efeitos fisiopatológicos das lesões ateroscleróticas continuam ainda incertos. A tabela 2 resume os efeitos vasculares dos diferentes componentes lipídicos da LDL modificada oxidativamente.

Tabela 2 - Efeitos vasculares dos diferentes componentes presentes na LDL modificada oxidativamente (revidado por Sellmayer e cols., 1999)

Lípídeos oxidados	Efeitos vasculares
Óxidos de colesterol	Apoptose das células endoteliais
Aldeídos (4-hidroxinonenal)	Mitogênico para as células musculares lisas; citotóxico para as células endoteliais; quimiotático para monócitos e macrófagos; estimula a agregação plaquetária e a formação de "foam cells".
19- ou 20 - HETE	Vasoconstrição
9- ou 13- HODE	Aumento da expressão da NOS; vasorrelaxamento
Epóxidos	vasodilatação; indução do crescimento celular; aumento da adesão de monócitos
Isoprostanóides	Vasoconstrição; indução do crescimento das células musculares lisas e fibroblastos; estimulação da ativação plaquetária
Liso-fosfatidilcolina	Aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais; aumento da expressão de CD11b em monócitos; quimiotático para monócitos; indução do crescimento das células musculares lisas
Fosfatidilcolina oxidada	Aumento da adesão de monócitos às células endoteliais

HETE - ácido hidroxi-eicosatetraenóico; HODE - ácido hidroxi-octadecadienóico;

### Óxidos de colesterol

Embora seja sugerido que a hipercolesterolemia possa causar lesão arterial, estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que o colesterol puro *per se* não é tóxico para as células da parede vascular (Peng e cols., 1979; Imai e cols., 1980). Em contraste, pequenas quantidades de oxisteróis, ou óxidos de colesterol (COs), apresentam efeitos tóxicos para diversos tipos de células (Peng e cols., 1992), incluindo fibroblastos (Sevanian & Peterson, 1986), monócitos/macrófagos (Baranovski e cols., 1982), células endoteliais (Sevanian e cols., 1991) e de músculo liso (Peng e cols., 1979). Portanto, existem fortes evidências de que o colesterol puro não é citotóxico e aterogênico, enquanto que os COs seriam altamente citotóxicos e aterogênicos em diversos modelos celulares estudados (Sevanian e cols., 1995).

Os óxidos de colesterol podem ser absorvidos pelo intestino como contaminantes dos alimentos que contêm colesterol, mas também podem ser formados

intracelularmente por reações enzimáticas. Os óxidos de colesterol se incorporam às membranas e às lipoproteínas e podem, potencialmente, modular a atividade enzimática de muitas proteínas ligadas à membrana ou à superfície das lipoproteínas.

O colesterol facilmente sofre autooxidação na presença de oxigênio molecular, luz e íons metálicos através de reações com radicais livres. Os 7-hidroperóxidos formados pela autooxidação do colesterol são instáveis sob certas condições, como calor e agentes redutores. Agentes redutores transformam os 7-hidroperóxidos nos correspondentes 7 $\alpha$ - e 7 $\beta$ -hidroxicolesterol. Na ausência de agentes redutores, a redução formal dos 7-hidroperóxidos aos 7-álcoois pode estar ocorrendo através de homólise térmica das ligações peróxido, ou, catalisada por metais de transição. A epoxidação da dupla ligação  $\Delta^5$  do colesterol é um dos processos de autooxidação, que produz os isômeros colesterol-5-epóxido e colesterol-6-epóxido (Chang, Y. H., e cols., 1997).

Pelo fato dos óxidos de colesterol serem tóxicos ao endotélio, eles podem destruir a integridade endotelial, resultando em uma alteração da permeabilidade vascular, que é um passo inicial para o desenvolvimento da aterosclerose (Peng e cols., 1991). Da mesma forma, os óxidos de colesterol também alteram várias funções relacionadas às membranas, alterando inclusive a função dos receptores de LDL, levando a uma alteração no metabolismo destas partículas em fibroblastos humanos pela diminuição da captação de LDL, mediada por receptor B/E (Brown e Goldstein, 1975).

Outro mecanismo possível de ação dos óxidos de colesterol na aterogênese pode estar relacionado ao estágio de acúmulo de éster de colesterol e formação de *foam cells*, uma vez que a fonte de LDL modificada oxidativamente pode ser tanto exógena, ou seja, pela absorção de óxidos de colesterol presentes na dieta; ou endógena, por ação de radicais livres (Morel e cols., 1984).

Recentemente, isolou-se do plasma humano uma subpopulação de partículas de lipoproteína de baixa densidade mais eletronegativa (LDL<sup>-</sup>), contendo uma mistura dos COs (Hodis e cols. 1994). Todos os COs isolados na LDL<sup>-</sup>, são citotóxicos nas concentrações presentes na LDL isolada de indivíduos hipercolesterolêmicos (Hodis e cols. 1994), os quais apresentam uma concentração de COs mais alta que os normolipidêmicos. Demonstrou-se que a purificação do colesterol previne sua aterogenicidade, quando adicionado à dieta de coelhos (Imai e cols., 1976). Em contraste, a administração de colesterol adicionado de uma pequena quantidade de COs promoveu lesão arterial severa (Taylor e cols., 1979).

Outros estudos demonstram um aumento das concentrações plasmáticas de 7 $\beta$ -hidroxicolesterol em populações com alto risco para doenças cardiovasculares, e sugerem que estas altas concentrações na população estudada é um indicador de lipoperoxidação *in vivo* (Zieden e cols., 1999).

## 2.4 - HIPERTENSÃO E ATEROSCLEROSE

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a hipertensão é um fator de risco adicional para a aterosclerose, mas o mecanismo relacionado a esse risco é complexo e ainda controverso. A sensibilidade ao sal é uma característica importante demonstrada em pacientes com hipertensão e os fatores relacionados à mesma também influenciam na hipertrofia e proliferação das células musculares lisas, o que torna este processo importante também para a aterosclerose (figura 3). A resistência à insulina também está envolvida na relação entre hipertensão e aterosclerose. Diversos estudos indicam que a resistência à insulina tem um papel central em pacientes com hipertensão, intolerância à glicose e dislipidemias. Vasoconstritores como a angiotensina II, a vasopressina e a endotelina também promovem a proliferação de células musculares lisas. Substâncias vasodilatadoras, como por exemplo o óxido nítrico ( $^{\circ}\text{NO}$ ), atuam não só no vasorrelaxamento, mas também na proliferação das células musculares lisas (Kobayashi e Uesugi, 1995).

### Oxido Nítrico

O  $^{\circ}\text{NO}$  é sintetizado a partir da L-arginina por uma família de enzimas denominadas  $^{\circ}\text{NO}$  sintases (NOS). Uma destas isoenzimas é dependente de cálcio e está presente em células endoteliais, plaquetas e no sistema nervoso central. Esta enzima (NOSc), é constitutivamente expressa em células endoteliais, sendo modulada pelo “shear stress” e uma variedade de agonistas. O  $^{\circ}\text{NO}$  sintetizado pela NOSc têm um papel crucial na regulação da pressão sanguínea, no tonus vascular e na agregação plaquetária. Outro tipo de NOS é independente de cálcio e indutível por estímulos imunológicos (NOSi) (figura 4).



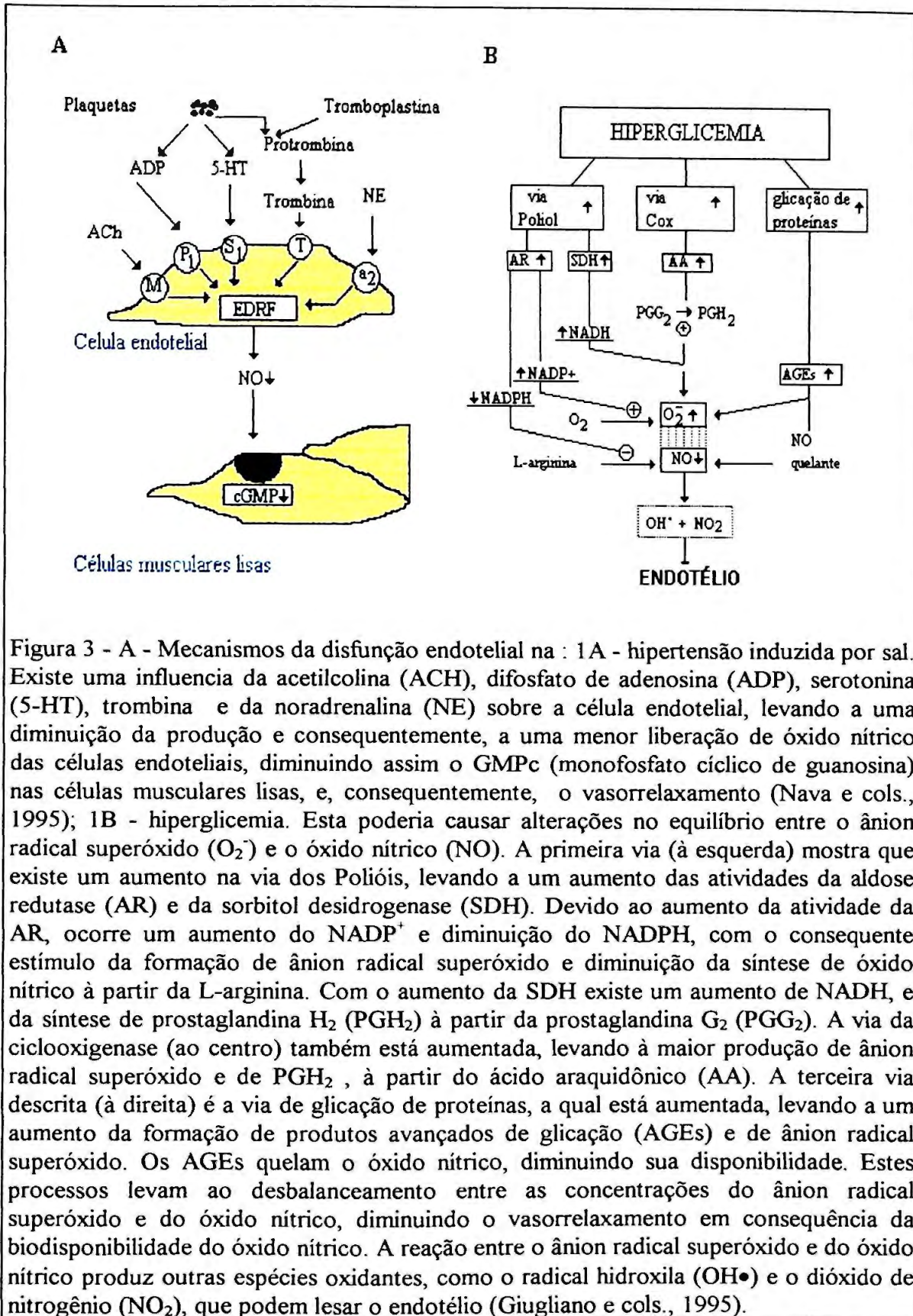


Figura 3 - A - Mecanismos da disfunção endotelial na : 1A - hipertensão induzida por sal. Existe uma influencia da acetilcolina (ACH), difosfato de adenosina (ADP), serotonina (5-HT), trombina e da noradrenalina (NE) sobre a célula endotelial, levando a uma diminuição da produção e conseqüentemente, a uma menor liberação de óxido nítrico das células endoteliais, diminuindo assim o GMPc (monofosfato cíclico de guanosa) nas células musculares lisas, e, conseqüentemente, o vasorrelaxamento (Nava e cols., 1995); 1B - hiperglicemia. Esta poderia causar alterações no equilíbrio entre o ânion radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e o óxido nítrico (NO). A primeira via (à esquerda) mostra que existe um aumento na via dos Polióis, levando a um aumento das atividades da aldose redutase (AR) e da sorbitol desidrogenase (SDH). Devido ao aumento da atividade da AR, ocorre um aumento do NADP<sup>+</sup> e diminuição do NADPH, com o conseqüente estímulo da formação de ânion radical superóxido e diminuição da síntese de óxido nítrico à partir da L-arginina. Com o aumento da SDH existe um aumento de NADH, e da síntese de prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) à partir da prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>). A via da ciclooxygenase (ao centro) também está aumentada, levando à maior produção de ânion radical superóxido e de PGH<sub>2</sub>, à partir do ácido araquidônico (AA). A terceira via descrita (à direita) é a via de glicação de proteínas, a qual está aumentada, levando a um aumento da formação de produtos avançados de glicação (AGEs) e de ânion radical superóxido. Os AGEs quelam o óxido nítrico, diminuindo sua disponibilidade. Estes processos levam ao desbalanceamento entre as concentrações do ânion radical superóxido e do óxido nítrico, diminuindo o vasorrelaxamento em conseqüência da biodisponibilidade do óxido nítrico. A reação entre o ânion radical superóxido e do óxido nítrico produz outras espécies oxidantes, como o radical hidroxila (OH•) e o dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>), que podem lesar o endotélio (Giugliano e cols., 1995).

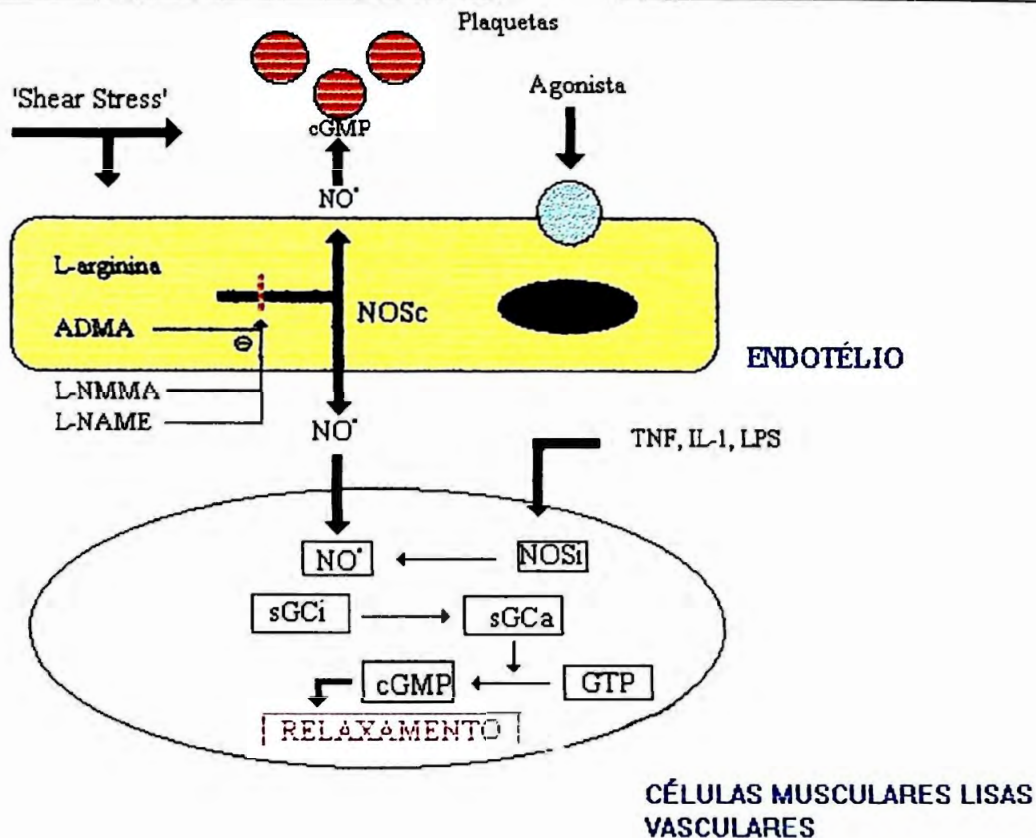


Figura 4 - L-arginina e as vias do óxido nítrico ( $^*NO$ ) na parede do vaso sanguíneo. No endotélio, o óxido nítrico é sintetizado, a partir da L-argina, pela óxido nítrico sintase constitutiva (NOSc). Esta síntese pode ser inibida pela dimetilarginina assimétrica (ADMA), monometil-L-arginina (L-NMMA) e pelo éster metílico da nitro-L-arginina (L-NAME). Por outro lado, o “shear stress” e alguns agonistas podem estimular a síntese de  $^*NO$ . O óxido nítrico é liberado do endotélio e inibe a adesão e a agregação plaquetárias. O óxido nítrico liberado também age nas células musculares lisas vasculares, atuando sobre a transformação da forma inativa da guanilato ciclase solúvel (sGCi) para sua forma ativa (sGCa), a qual atua sobre o GTP produzindo cGMP, o que induz o relaxamento muscular. Nas células musculares lisas vasculares, o  $^*NO$  também pode ser produzido à partir da L-arginina pela óxido nítrico sintase indutível (NOSi), a qual pode ser induzida por estímulos inflamatórios, tais como, TNF (fator de necrose tumoral), IL-1 (interleucina-1) e LPS (lipopolissacarídeos) (Nava e cols., 1995).

A NOSi está presente em uma variedade de tecidos (Nava e cols., 1995), incluindo células musculares lisas e macrófagos. O óxido nítrico produzido *in vivo* tem diversas funções. Além de mediar a vasodilatação, o  $^*NO$  inibe a adesão e a agregação plaquetária, regula vias de transdução de sinal, atua como um neurotransmissor e participa da regulação do sistema imune (Stamler e cols., 1992). O óxido nítrico tem um papel chave na regulação do tônus vascular. A parede vascular está em um estado de vasodilatação ativa mantida pelo  $^*NO$ . As ações fisiológicas do  $^*NO$ , incluindo a

vasodilatação e a promoção da excreção de sódio e água, estão diretamente relacionadas ao controle da pressão sanguínea (Tikkanen e Fyhrquist, 1995). Recentemente, tem-se demonstrado uma nova via de produção de  $\text{NO}$  em humanos (Lundberg e Wetzberg, 1998). Esta nova via envolve a redução química de nitrito inorgânico, em condições ácidas e redutoras. O  $\text{NO}$  produzido por este mecanismo tem um papel biológico similar ao do  $\text{NO}$  produzido pelas NOS. Esta produção não enzimática tem sido demonstrada no estômago, na superfície da pele e na isquemia cardíaca (Lundberg e Wetzberg, 1998).

O óxido nítrico, gerado em sistemas biológicos, reage com grupos tióis de proteínas específicas para formar S-nitrosotióis (Stamler e cols., 1992). Esta reação pode prolongar a vida média do  $\text{NO}$  e preservar sua atividade biológica (Stamler e cols., 1992). Os S-nitrosotióis também têm a propriedade de causar relaxamento do endotélio e inibir a agregação plaquetária (Stamler e cols., 1992). Outro ponto importante é que os S-nitrosotióis podem sofrer redução e, conseqüentemente, liberar  $\text{NO}$  na circulação sistêmica. Portanto, o  $\text{NO}$  poderia ser armazenado na forma de S-nitrosotióis e posteriormente liberado, exercendo suas funções biológicas. Alguns processos de ativação e de inibição de enzimas e receptores estão associados com esta reação (Girad e cols., 1993). No plasma, o principal composto S-nitroso é o aduto S-nitrosotiol da albumina (Stamler e cols., 1992), o qual pode atuar como um modulador da transferência do  $\text{NO}$  entre a parede vascular e a hemoglobina presente nos eritrócitos (Heuil e cols., 2000) (figura 5).



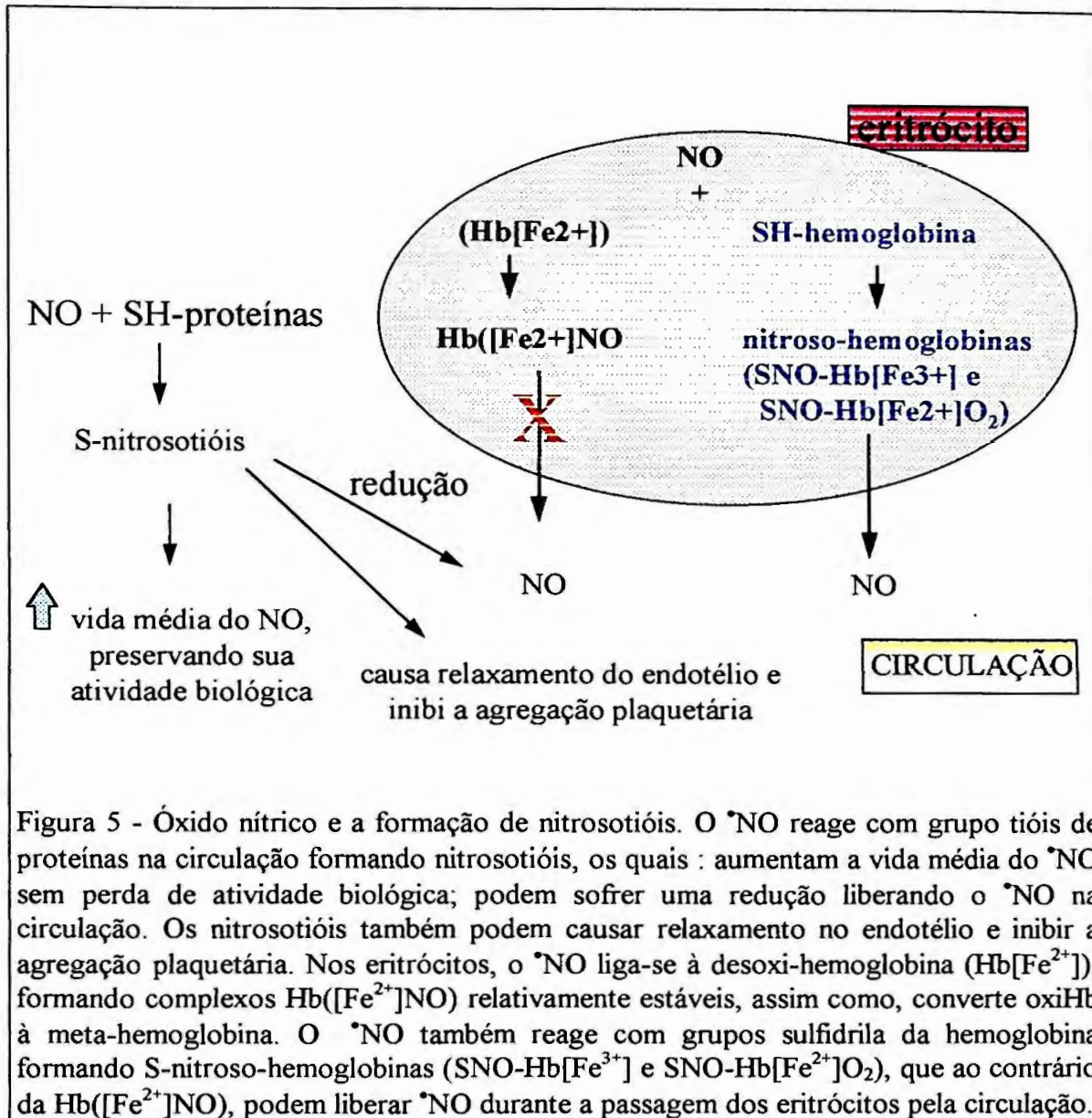
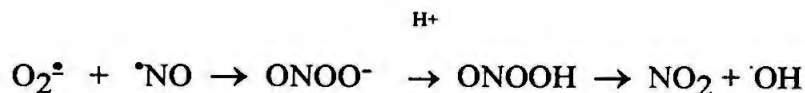


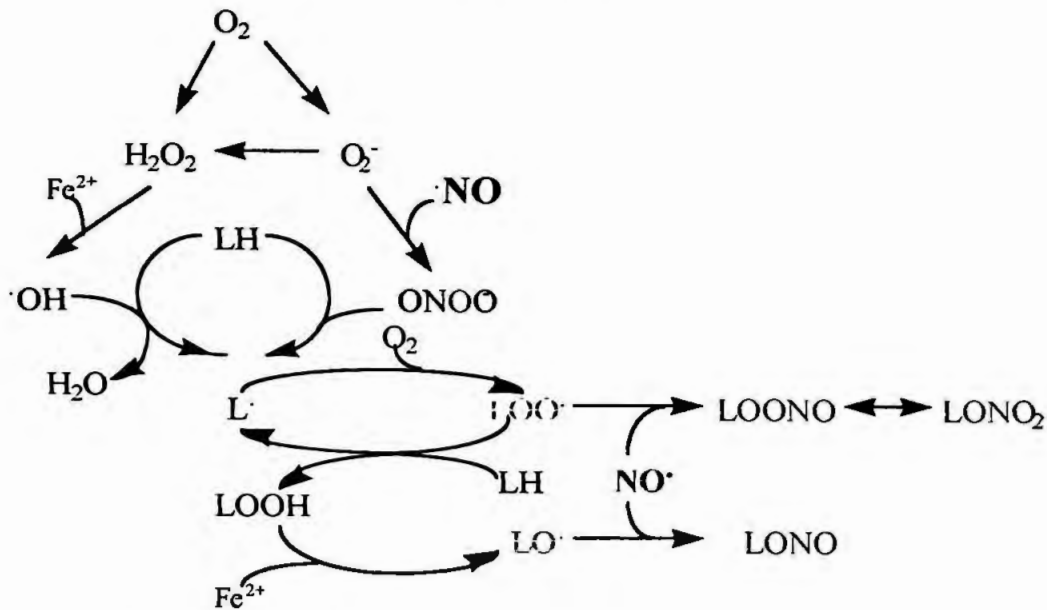
Figura 5 - Óxido nítrico e a formação de nitrosotióis. O  $\text{NO}$  reage com grupo tióis de proteínas na circulação formando nitrosotióis, os quais : aumentam a vida média do  $\text{NO}$  sem perda de atividade biológica; podem sofrer uma redução liberando o  $\text{NO}$  na circulação. Os nitrosotióis também podem causar relaxamento no endotélio e inibir a agregação plaquetária. Nos eritrócitos, o  $\text{NO}$  liga-se à desoxi-hemoglobina ( $\text{Hb}[\text{Fe}^{2+}]$ ), formando complexos  $\text{Hb}([\text{Fe}^{2+}]\text{NO})$  relativamente estáveis, assim como, converte oxiHb à meta-hemoglobina. O  $\text{NO}$  também reage com grupos sulfidríla da hemoglobina formando S-nitroso-hemoglobinas ( $\text{SNO-Hb}[\text{Fe}^{3+}]$  e  $\text{SNO-Hb}[\text{Fe}^{2+}]\text{O}_2$ ), que ao contrário da  $\text{Hb}([\text{Fe}^{2+}]\text{NO})$ , podem liberar  $\text{NO}$  durante a passagem dos eritrócitos pela circulação.

Tanto o  $\text{O}_2^{\bullet -}$  como o  $\text{NO}$  são radicais livres e reagem entre si com uma constante de velocidade de  $6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , em soluções aquosas, para formar o ânion peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). O ânion peroxinitrito pode sofrer protonação e formar ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ), uma espécie instável, com decomposição espontânea com  $T_{1/2} = 1,0 \text{ s}$  em pH 7.4, a  $37^\circ\text{C}$ . O ácido peroxinitroso pode sofrer um rearranjo dando como produto nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), ou se decompor homoliticamente formando  $\text{OH}^\bullet$  e  $\text{NO}_2$ .

A formação do ânion peroxinitrito [ $\text{pK}_2 = 6.8$ ] e sua decomposição para  $\text{O}_2^{\bullet -}$  e  $\text{NO}_2$  estão demonstradas na equação abaixo (Radi e cols., 1991):



O peroxinitrito, ou os produtos derivados da sua decomposição, podem oxidar grupos SH de proteínas, promover a nitração de resíduos de tirosina, inativar  $\alpha_1$ -antiproteínase pela reação com metionina, induzir peroxidação lipídica e reagir com aminoácidos aromáticos em proteínas para formar nitroadutos (van der Vliet e cols., 1994). Uma importante característica desta reação é que ela não requer a participação de metais de transição (Beckman e cols., 1990). A exposição da lipoproteína de baixa densidade (LDL) ao peroxinitrito ou, simultaneamente, ao ânion radical superóxido e óxido nítrico, resulta em várias reações que poderiam contribuir para a oxidação da LDL e para a aterogenicidade desta partícula (Darley-Usmar e cols., 1992, Hogg e cols., 1993 e Graham e cols. 1993). Inicialmente, o  $\alpha$ -tocoferol é oxidado à  $\alpha$ -tocoferolquinona, produzindo uma LDL mais suscetível à oxidação induzida por agentes pró-oxidantes (Hogg e cols., 1993). Posteriormente, ocorre a oxidação da fase lipídica da partícula de LDL, com a concomitante formação de aldeídos reativos, e a transformação da LDL em uma forma que é reconhecida por receptores *scavenger* dos macrófagos (Harrison e cols., 1987 e Schini e Vanhoutte, 1991). Portanto, o peroxinitrito e espécies reativas dele derivadas podem mediar alguns dos efeitos deletérios do  $\text{}^{\cdot}\text{NO}$ , como por exemplo, a oxidação da LDL e de grupos sulfidríla, assim como a depleção de antioxidantes do plasma. Quando a relação estequiométrica entre o  $\text{}^{\cdot}\text{NO}$  e o radical superóxido for maior que um, ou seja, um excesso do primeiro em relação ao segundo, o  $\text{}^{\cdot}\text{NO}$  atua como antioxidante, reagindo com os radicais alcóxila e peróxila derivados da oxidação dos ácidos graxos e inibindo a oxidação da LDL (Malo-Ranta e cols., 1994 e Goss e cols., 1995). Porém, em condições nas quais a produção de radical superóxido é maior que a de  $\text{}^{\cdot}\text{NO}$  a oxidação da LDL é favorecida (Rubbo e cols., 1995) (Esquema 1). O  $\text{}^{\cdot}\text{NO}$  também reage com proteínas contendo o grupo heme como a hemoglobina (Hb) e a mioglobina (Mb) (Martin e cols., 1985), oxidando-as às suas formas meta. Na presença de um agente oxidante (por ex.:  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), a meta-Hb e a meta-Mb podem formar espécies ferril, as quais induzem a oxidação de componentes da membrana celular e das lipoproteínas (Bruckdorfer e cols., 1990).



Esquema 1- Participação do  $\cdot NO$  na inibição da peroxidação lipídica (Rubbo e Freeman, 1996)

### Patogênese da hipertensão

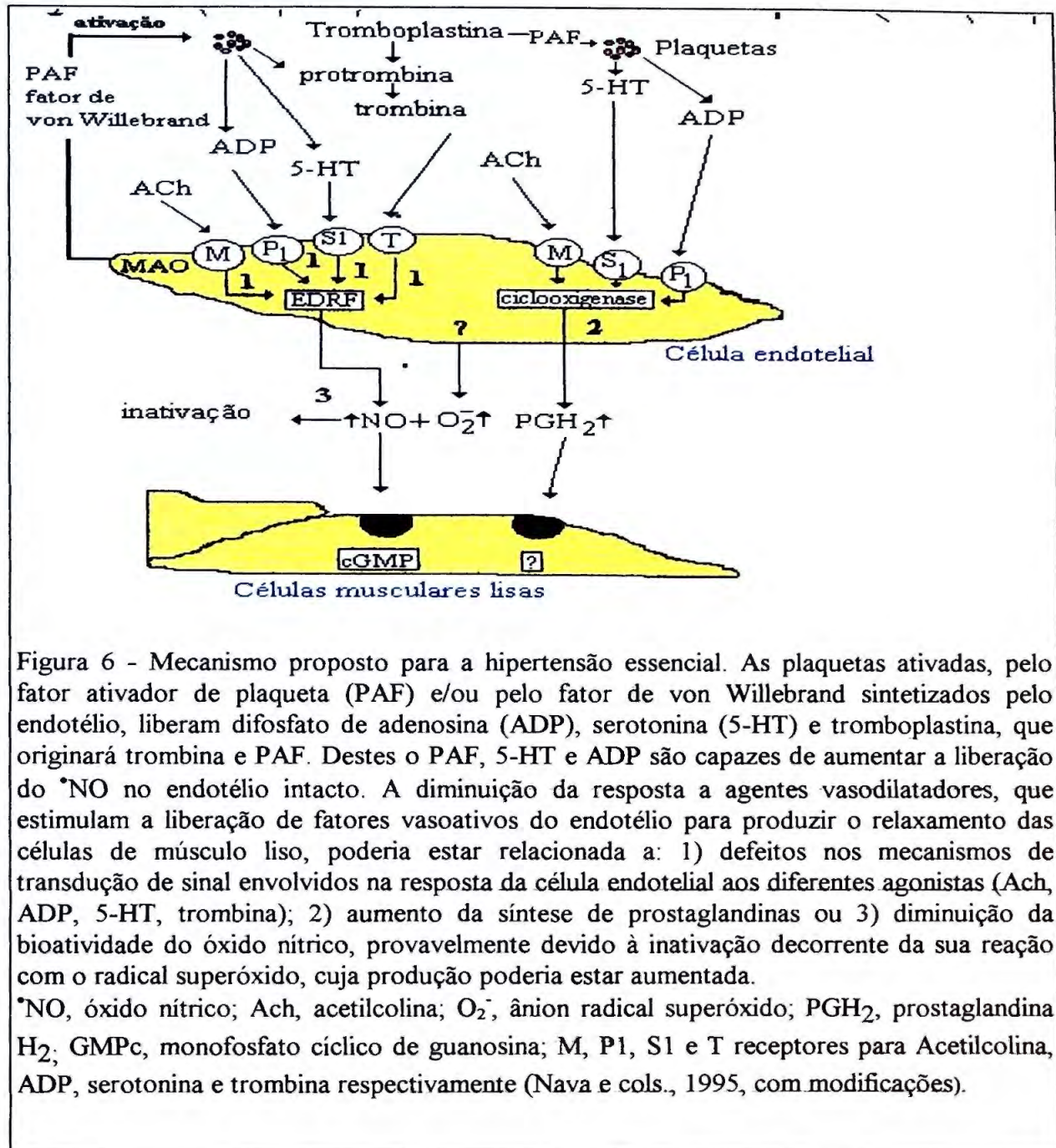
O  $\cdot NO$  pode estar envolvido na patogênese da hipertensão e nas suas complicações. Assim, a inibição da produção de  $\cdot NO$  por inibidores da NOS resulta em hipertensão, aumento da formação de microtrombos, da migração de leucócitos nos tecidos e lesão renal intersticial e glomerular (Tikkanen e Fyhrquist, 1995). O tratamento crônico com estes inibidores resulta na hipertensão severa, lesão renal e menor sobrevivência em modelos experimentais. Experimentos em humanos têm demonstrado uma diminuição de  $\cdot NO$ , tanto basal como estimulada por agonistas. Uma grande parte dos estudos realizados indica que a vasodilatação dependente do endotélio está reduzida em pacientes com hipertensão primária ou secundária (Busse e Fleming, 1995). Propõe-se que a hipertensão essencial esteja relacionada a um distúrbio na vasodilatação dependente do endotélio, não havendo alteração da vasodilatação independente do endotélio. Entretanto, o papel do endotélio e do  $\cdot NO$  na hipertensão sistêmica ainda é controverso. Apesar de uma liberação alterada de  $\cdot NO$  poder estar relacionada à patogênese da hipertensão, o relaxamento dependente do endotélio pode estar heterogeneamente afetado nesta condição (Nava e cols., 1995). Em algumas redes vasculares de ratos hipertensos, como a aorta, carótida, vasos mesentéricos e cerebrais o

relaxamento dependente do endotélio está alterado. Em contraste, nas artérias coronarianas e renais de ratos espontaneamente hipertensos a função endotelial parece não ser afetada pela alta pressão sanguínea (Nava e cols., 1995). A lesão endotelial *per se* pode contribuir para a perda da capacidade vasodilatadora dependente do endotélio na hipertensão. A redução das atividades anti-proliferativa, anti-inflamatória e anti-trombótica do  $^*NO$  devido à lesão endotelial pode predispor à proliferação celular e à posterior lesão cardiovascular (Tikkanen e Fyhrquist, 1995).

O  $^*NO$ , o fator de contração muscular dependente do endotélio (EDCF) e a prostaciclina ( $PGI_2$ ) podem contribuir para a mudança do calibre arterial em resposta a vários estímulos. Como o  $^*NO$  e a  $PGI_2$  são vasodilatadores e o EDCF é um vasoconstritor, alterações na produção, ou na ação, dos mesmos pode resultar em mudanças na resistência vascular e facilitar o desenvolvimento da hipertensão.

Na hipertensão espontânea (figura 6), a produção de  $^*NO$  parece estar aumentada. A liberação de  $^*NO$  está aumentada em ratos espontaneamente hipertensos (Nava e cols., 1995). A atividade da NO sintase constitutiva (NOSc) também está aumentada no coração destes animais, mas apenas no ventrículo esquerdo onde a pressão é alta. Em animais normotensos, a elevação farmacológica da pressão sanguínea também promove aumento da liberação de  $^*NO$ , sugerindo que a pressão sanguínea *per se* é um estímulo para esta liberação. Entretanto, o aumento da produção de  $^*NO$  na hipertensão espontânea pode ser ineficiente, provavelmente pelo aumento da sua inativação devido a reações com outros compostos (figura 7). As espécies reativas de oxigênio, especialmente o ânion radical superóxido, podem inativar o  $^*NO$  e a  $PGI_2$ . Na hipertensão essencial, sugere-se que exista aumento da produção de radicais livres e o simultâneo decréscimo de antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e a vitamina E, o que resultaria no decréscimo da meia vida do  $^*NO$  e da  $PGI_2$  (Kumar e Das, 1993). Estudos em animais hipertensos têm sugerido que o aumento da inativação do  $^*NO$  ocorre pela reação com o ânion radical superóxido (Nava e cols., 1995).







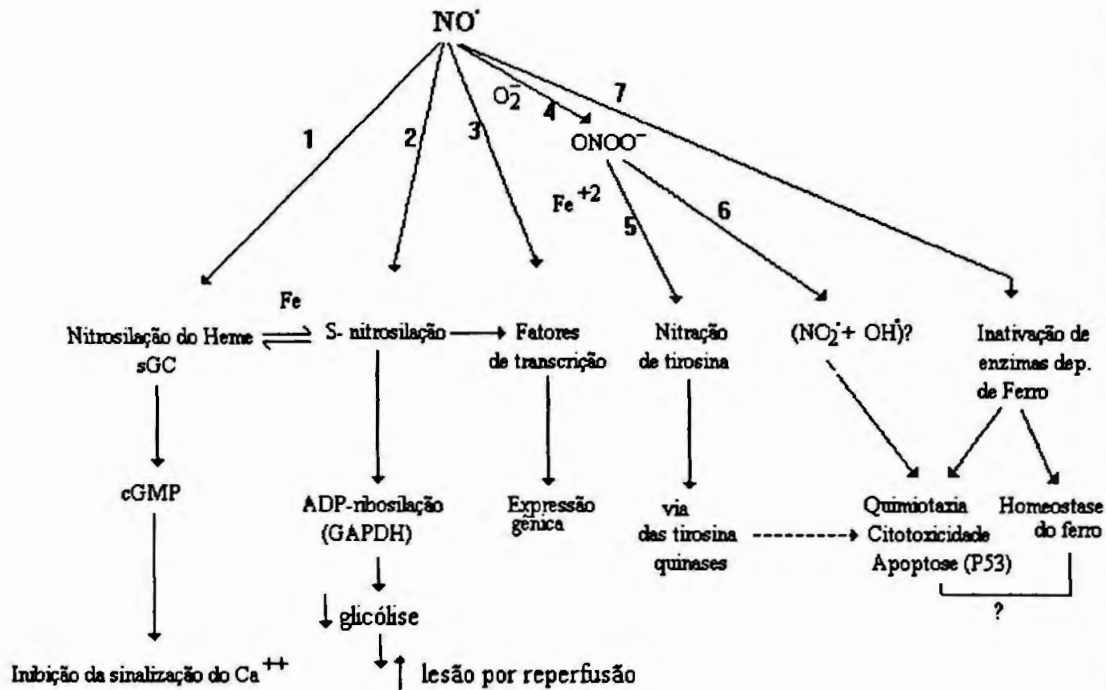


Figura 7 - Vias efectoras do óxido nítrico ( $^*NO$ ). 1) O  $^*NO$  formado nas células endoteliais promove a nitrosilação do grupo heme da guanilato ciclase solúvel (sGC), aumentando o nível intracelular de monofosfato cíclico de guanina (cGMP). Nas células musculares lisas, o cGMPc ativa quinases dependentes de cGMP que fosforilam e modulam a atividade de proteínas envolvidas na homeostase do cálcio, resultando em uma redução na quantidade de cálcio disponível para a contração; 2) o  $^*NO$  também promove a nitrosilação de grupos tióis de diversas proteínas (S-nitrosilação), alterando algumas funções das mesmas. A ribosilação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) pelo nucleotídeo cíclico ADP-ribose também é estimulada pelo  $^*NO$ , levando à inibição da atividade desta enzima, o que poderia inibir a glicólise e contribuir para a lesão por reperfusão e a neurotoxicidade. A ribosilação das proteínas G pode inibir sua função e alterar a transdução de sinal na membrana plasmática; 3) o  $^*NO$  também pode atuar sobre os fatores de transcrição e modular funções vasculares alterando a expressão de genes, que codificam proteínas do endotélio importantes para a manutenção da homeostase vascular; 4) o  $^*NO$  reage com o ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) formando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que é um forte agente oxidante; 5) em presença de  $Fe^{++}$  o peroxinitrito pode nitrar tirosinas associadas às proteínas, afetando a sinalização intracelular mediada por tirosinas quinases; 6) o ácido peroxinitroso, formado pela protonação do peroxinitrito, se degrada originando radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ) e dióxido de nitrogênio ( $NO_2^-$ ); 7) o  $^*NO$  interage com o grupo heme, promovendo inativação de enzimas dependentes de heme, podendo assim inibir enzimas mitocondriais contendo centros ferro-enxôfre, possivelmente responsáveis pela citotoxicidade de macrófagos para células tumorais. As vias 5, 6 e 7 podem contribuir para os efeitos citostáticos e citotóxicos do  $^*NO$ , assim como no controle da apoptose.

## Óxido Nítrico, Hipertensão e Aterosclerose

Na hipertensão e na aterosclerose, o papel do  $\text{NO}$  é controverso e está relacionado ao estágio da doença e com o modelo experimental estudado. Os vasos sanguíneos ateroscleróticos apresentam várias alterações funcionais, tais como, aumento da vasoconstrição, maior adesão de plaquetas e monócitos, assim como da migração e proliferação de células musculares lisas vasculares. A produção alterada de  $\text{NO}$  poderia contribuir para estas alterações, visto que este radical livre participa em todos estes processos. A disfunção endotelial, tanto na hipertensão como na hipercolesterolemia, parece estar relacionada à menor biodisponibilidade do óxido nítrico (Schmieder, 2000). Na aterosclerose, o aumento da inativação do  $\text{NO}$  pelo ânion radical superóxido poderia reduzir a vasodilatação dependente do endotélio (Garcia e cols., 1996). Estudos histopatológicos mostram que a camada endotelial das artérias ateroscleróticas está severamente lesada apenas nos estágios avançados da doença. Entretanto, estudos funcionais indicam que a resposta das artérias ateroscleróticas aos vasodilatadores dependentes do endotélio está alterada em um estágio bastante precoce da aterosclerose (Nava e cols., 1995). Bioensaios com artérias ateroscleróticas mostram que a atividade do  $\text{NO}$  está reduzida e que o principal mediador desta alteração funcional vascular seria a LDLox (Nava e cols., 1995). Em coelhos hipercolesterolêmicos, ocorre aumento da produção de  $\text{NO}$  pelas aortas ateroscleróticas (Minor e cols., 1990). Nestes animais, a disfunção endotelial está relacionada à degradação aumentada do  $\text{NO}$  devido a um desequilíbrio entre a atividade da superóxido dismutase (SOD) e à produção de radical superóxido pelo endotélio dos vasos sanguíneos ateroscleróticos. Apesar de alguns estudos relatarem aumento da atividade da SOD na aorta de coelhos hipercolesterolêmicos (Ohara e cols., 1993), a atividade da isoenzima ligada ao endotélio (fração C) está diminuída (Silva e cols., 1995) e o tratamento destes animais com SOD exógena melhora significativamente o relaxamento dependente do endotélio nestas artérias (Mügge e cols., 1991).

A interação da LDLox com diferentes tipos celulares afeta a produção de  $\text{NO}$  de forma paradoxal. Bioensaios têm demonstrado que a LDLox pode bloquear a atividade vasodilatadora do  $\text{NO}$  liberado por células endoteliais (Simon e cols., 1990 e Chin e cols., 1992). Estudos *in vitro* mostram que os lípides oxidados presentes na

LDLox inibem as atividades da NO sintase indutível de macrófagos (Yang e cols., 1994) e da guanilato ciclase solúvel das células musculares lisas (Schmidt e cols., 1992). Em contraste, nas células endoteliais, a LDLox aumenta a liberação de óxido nítrico produzido pela NO sintase constitutiva, dependente de cálcio (Fries e cols., 1995). Portanto, *in vivo*, o efeito final da LDLox na vasodilatação vai depender das complexas interações entre esta partícula oxidada e os diversos tipos celulares presentes na parede arterial, o que afetará distintamente a produção de NO pelas diferentes isoformas da NO sintase. Além disso, a LDLox induz a expressão do RNAm da pré-pró-endotelina, aumentando assim a liberação de endotelina (Boulanger e cols., 1992), isso se torna importante, uma vez que a endotelina é um potente vasoconstritor. A endotelina é um peptídeo de 21 aminoácidos existentes no homem em três isoformas: endotelina 1 (ET-1), ET-2 e ET-3 (Inoue e cols., 1989), sendo que somente a ET-1 é produzida no endotélio. A ET-2 e a ET-3 são geradas no cérebro, nos rins, no intestino e nas adrenais (Tasaka e Kitazumi, 1994). Uma variedade de estímulos físicos e químicos podem levar à geração de endotelina (figura 8) (Simonson e Dunn, 1990 e Yanagisawa e cols., 1988). Uyama e cols. (1996), mostraram um aumento da secreção de ET-1 pelas células endoteliais, como também no plasma de animais com aterosclerose induzida por dieta.

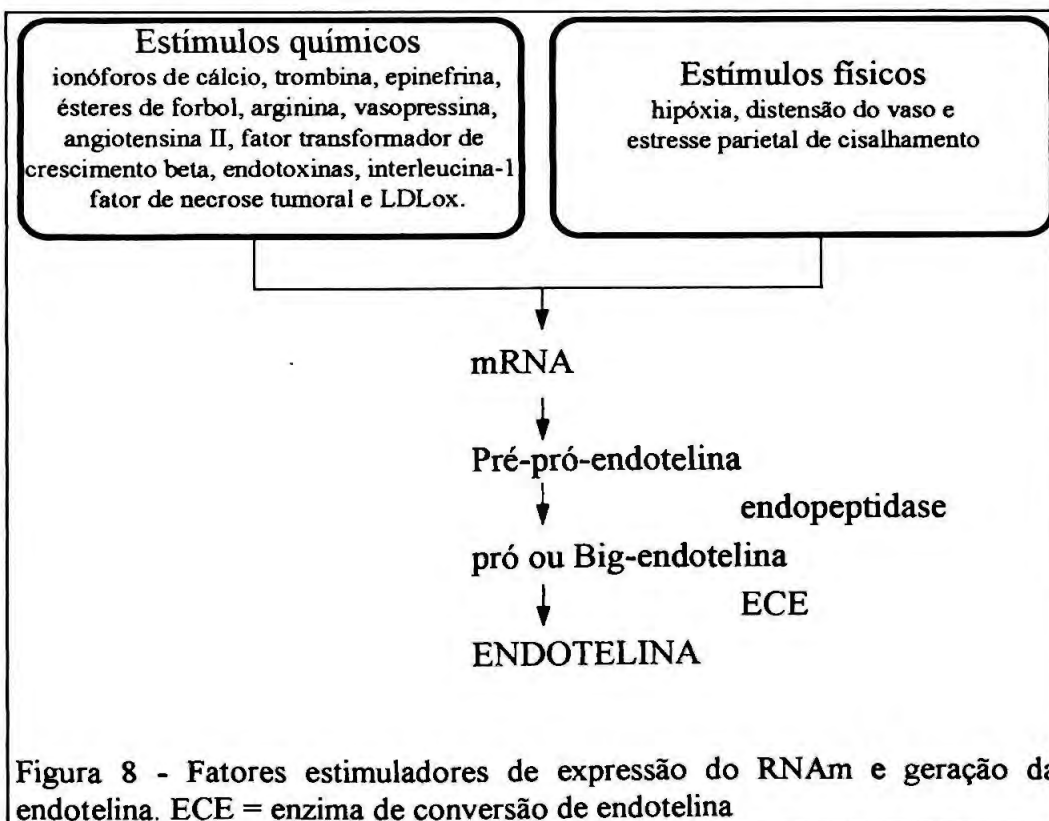


Figura 8 - Fatores estimuladores de expressão do RNAm e geração da endotelina. ECE = enzima de conversão de endotelina

Células espumosas (*foam cells*), formadas à partir de macrófagos expostos à LDLox, produzem menor quantidade de  $\text{NO}$  quando estimuladas por interferon gama ou lipopolissacarídeo (Bolton e cols., 1994). Estas células, quando não estimuladas, oxidam a LDL em maior intensidade que os macrófagos não transformados em *foam cells*, ou as *foam cells* induzidas pela incubação com a LDL acetilada. Estes dados demonstram que há uma relação inversa entre a atividade da NO sintase e a capacidade das *foam cells* induzirem a oxidação da LDL (Bolton e cols., 1994). Portanto, na aterosclerose, as *foam cells* presentes nas artérias ateroscleróticas poderiam tanto exacerbar a oxidação das lipoproteínas como contribuir indiretamente para a proliferação das células musculares lisas. Este último efeito, decorreria de uma menor produção de  $\text{NO}$  e a consequente diminuição do efeito anti-proliferativo exercido por este radical livre. A concentração da LDLox e o tempo de contato da mesma com as células também são importantes para determinar o efeito da mesma em relação à liberação de  $\text{NO}$  por macrófagos estimulados. Assim, a produção de  $\text{NO}$  por macrófagos estimulados com interferon  $\gamma$  é potencializada pela incubação destas células com baixas concentrações de LDLox (20  $\mu\text{g/ml}$ ) por períodos longos (18 hs), enquanto a exposição das mesmas a altas concentrações de LDLox (200  $\mu\text{g/ml}$ ) por períodos mais curtos inibe a liberação de  $\text{NO}$  (Matthys e cols., 1996). Um outro fator que contribuiria para agravar ainda mais este quadro é a citotoxicidade da LDLox, o que implica em possível lesão ao endotélio decorrente do aumento da formação desta partícula oxidada.

Portanto, tanto na hipertensão como na hipercolesterolemia parece existir uma alteração da biodisponibilidade do óxido nítrico sendo que esta alteração não está ligada apenas a um simples defeito, mas a vários mecanismos que podem afetar tanto a síntese como a degradação do  $\text{NO}$ . Em ambas as doenças, o aumento da produção do ânion radical superóxido e o estresse oxidativo representam os principais mecanismos envolvidos. Contudo potenciais diferenças, nos mecanismos envolvidos na síntese de ânion radical superóxido ou  $\text{NO}$ , são evidentes entre a hipertensão e a hipercolesterolemia (revisado por Schmieder, 2000).

### ***3. OBJETIVOS***

---

### 3.1 - Objetivo geral

Investigar as possíveis vias de inativação do óxido nítrico na hipertensão e na hipercolesterolemia. Para atingir este objetivo, determinou-se produtos possivelmente derivados da interação entre óxido nítrico, ou espécies reativas dele derivadas, com componentes presentes na circulação sistêmica. Dentre estes produtos, determinou-se nitrosotióis, lipoproteínas oxidadas e proteínas nitradas. A hipótese de trabalho foi que a formação destes produtos ocorreria de forma diferenciada nos pacientes hipertensos e nos hipercolesterolêmicos, comparados aos indivíduos normotensos normocolesterolêmicos, fornecendo subsídios importantes dos mecanismos da hipertensão e da hipercolesterolemia, que são relevantes para o desenvolvimento da aterosclerose.

### 3.2 - Objetivos específicos

Nos 3 grupos estudados, a saber, 1) normotensos normocolesterolêmicos, 2) hipertensos normocolesterolêmicos e 3) normotensos hipercolesterolêmicos, determinou-se:

- A concentração de lipoproteínas oxidadas no plasma;
- A formação de nitrotirosina livre no plasma e ligada a proteínas;
- As concentrações plasmáticas de S-nitrosotióis;
- As concentrações plasmáticas de nitrato e endotelina
- As alterações dos níveis de antioxidantes hidrossolúveis no plasma e dos lipossolúveis no plasma e nas frações lipoproteicas;
- A oxidabilidade da LDL pesada *in vitro*;
- As alterações do vasorrelaxamento dependente do endotélio.

## **4. METODOLOGIA**

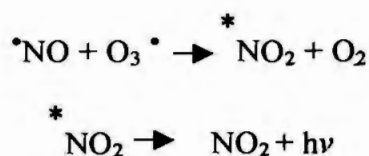
---

## 4.1 - Padronizações

### 4.1.1 - Padronização da determinação de nitrato

#### Analizador de $\text{NO}$

Utilizou-se o equipamento NOA<sup>TM</sup>280 (Sievers, USA), um detector de alta sensibilidade para determinação de  $\text{NO}$  baseado na reação de quimioluminescência entre  $\text{NO}$  e ozônio (fase gasosa) :



A redução do nitrato com cloreto de vanádio, em ácido clorídrico, foi usada para converter nitrato em  $\text{NO}$ . A redução foi feita a 90°C.



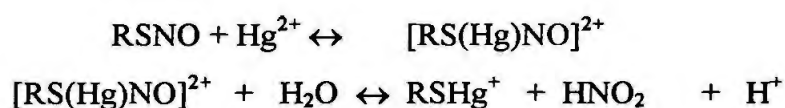
As curvas de calibração com níveis múltiplos foram realizadas com padrão externo (nitrato de sódio – Aldrich – 22,134-1), utilizando-se o software Bag program (versão 2.2 - Sievers, USA). Foram utilizadas amostras de plasma sem qualquer tipo de preparação prévia, amostras filtradas (Centrifree - Amicon) e também extraídas com etanol gelado. Para a extração com etanol gelado foi utilizado 0,5 mL de amostra e 1,0 mL de etanol a 0°C, após agitação no vortex, a solução foi deixada trinta minutos a 0°C e então centrifugada a 14000 RPM por cinco minutos, o sobrenadante foi retirado para a análise.



#### 4.1.2 - Padronização da determinação de S-nitrosotióis

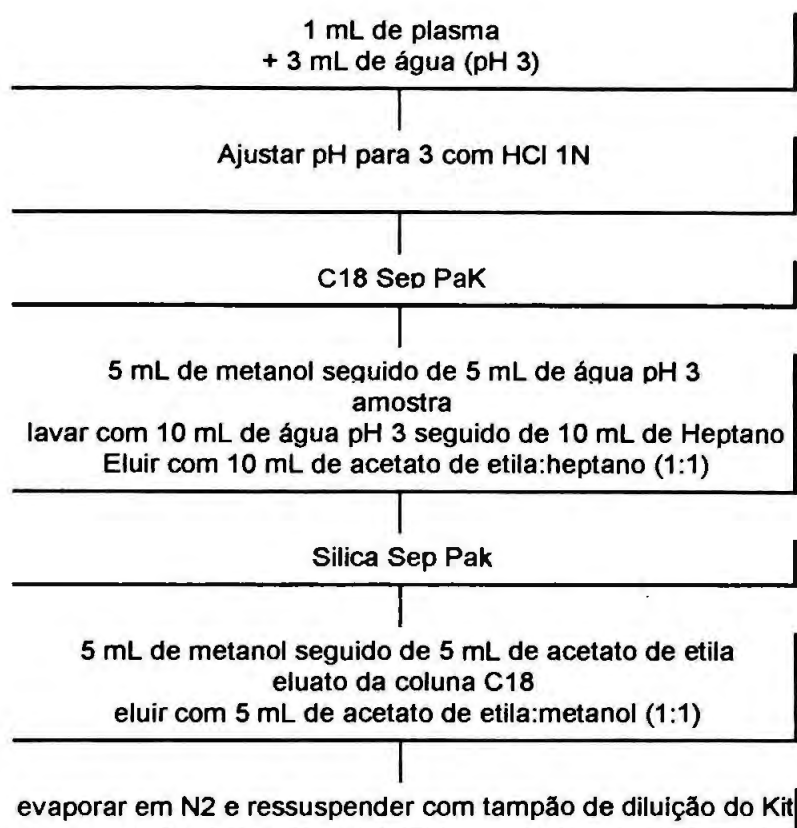
##### Analizador de $^*NO$

A determinação de S-nitrosotióis (RSNO) foi realizada pela diferença de concentração de  $^*NO$  liberado da amostra (reduzida com cloreto de mercúrio II ( $Hg^{2+}$ ) menos a amostra não reduzida) com uma solução contendo 1% de iodeto de potássio em ácido acético glacial. A redução foi realizada acrescentando-se na amostra uma solução saturada de cloreto de mercúrio II por cinco minutos à temperatura ambiente como demonstrado nas reações a seguir (Ewing e cols., 1998). Para a quantificação foi realizada curva de calibração com nitrito de sódio ( $NO_2^-$ ) em diferentes concentrações. A curva de calibração foi então construída pela regressão tipo "least-squares linear" (área do pico versus pmol  $NO_2^-$  injetado), utilizando-se o software Bag program (versão 2.2 - Sievers, USA).



#### 4.1.3 - Avaliação do Kit de isoprostanos por ELISA

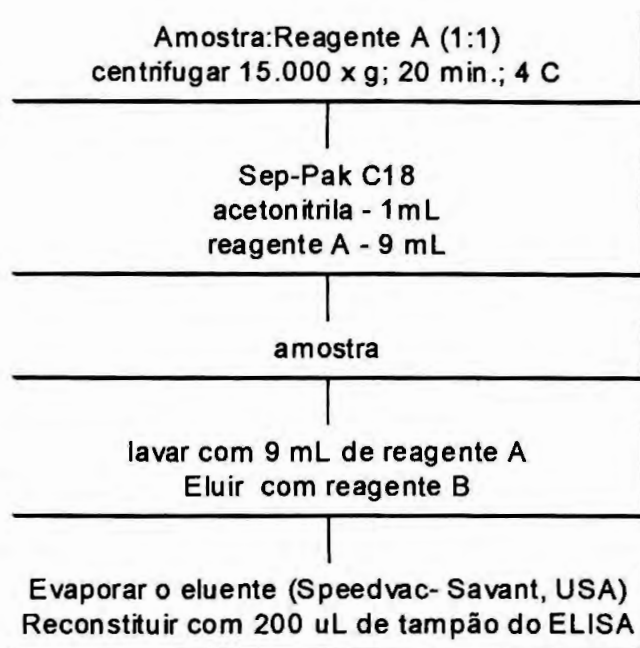
A avaliação do Kit comercial (8EPGF2 Immunoassay Kit - Oxford Biomedical Research, USA) foi realizada para compararmos os valores obtidos pelo Kit, em plasma de indivíduos voluntários saudáveis, com os valores relatados na literatura. As amostras de plasma foram previamente extraídas como demonstrado no esquema 2.



Esquema 2 - Extração dos isoprostanos plasmáticos

#### 4.1.4 - Avaliação da determinação de endotelina por ELISA

A avaliação do Kit comercial (EIAH-6901 – Endothelin-1, Peninsula laboratories, INC., Inglaterra) foi realizada para compararmos os valores obtidos pelo Kit, em plasma de indivíduos voluntários saudáveis, com os valores relatados na literatura. As amostras de plasma foram previamente extraídas, de acordo com as instruções do fabricante, como demonstrado no esquema 3. Foram também utilizadas amostras de plasma sem extração.



Esquema 3 - Extração da endotelina plasmática. Reagente A: 1 % de ácido trifluoroacético (TFA) em 99 % de água destilada; reagente B: 60 % de acetonitrila, 1 % de TFA e 39 % de água destilada.

#### 4.1.5 - Padronização do ELISA para determinação de nitrotirosina

A nitrotirosina plasmática livre e ligada às apoproteínas da LDL foi determinada por ensaio imunoenzimático (ELISA), padronizado em nosso laboratório como descrito a seguir. O anticorpo utilizado foi o anticorpo policlonal anti-nitrotirosina produzido em coelho (Upstate Biotechnology). Foram testados dois ensaios, ou seja, um ELISA direto e um ELISA competitivo. Placas para ELISA pretas e brancas, as quais são recomendadas para ensaios com detecção quimioluminescente, também foram testadas, tendo-se observado que as leituras de quimioluminescência obtidas com as placas brancas foram aproximadamente 25 vezes maiores que as leituras aquelas com as placas pretas. Assim, em nossos ensaios foram utilizadas placas brancas da Nunc Inc. Como os testes foram realizados utilizando-se detecção quimioluminescente, a emissão de luz em cada placa foi medida imediatamente após a adição do substrato. O pico máximo de leitura foi observado entre dois e seis minutos após a adição do substrato, decaindo após este tempo, como mostrado na figura abaixo.

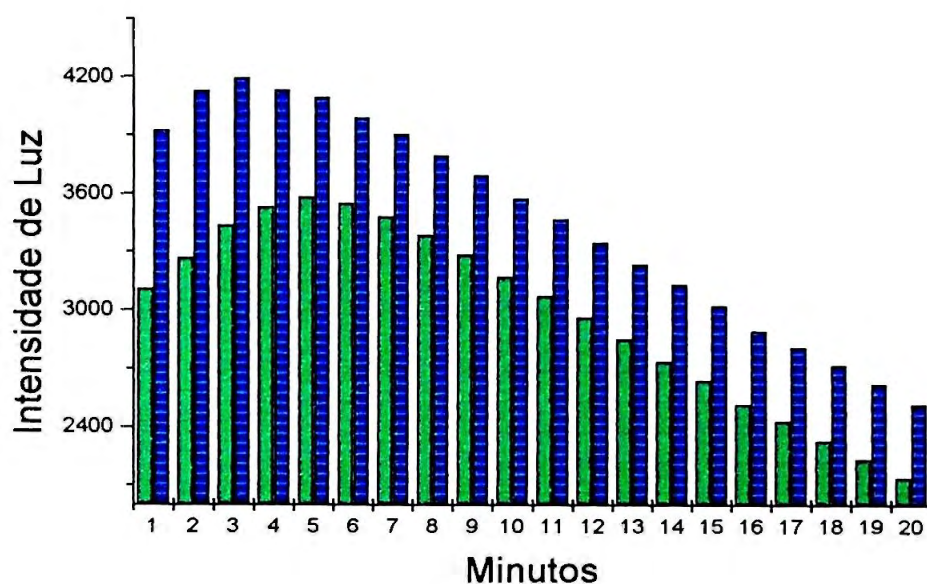


Figura 9 - Intensidade da quimiluminescência determinada durante vinte minutos, no ensaio de ELISA direto. Foram utilizadas duas concentrações de proteína nitrada fixadas na placa 6,0 µg/mL (verde) e 8,0 µg/mL (azul).

#### *Preparação de proteínas nitradas*

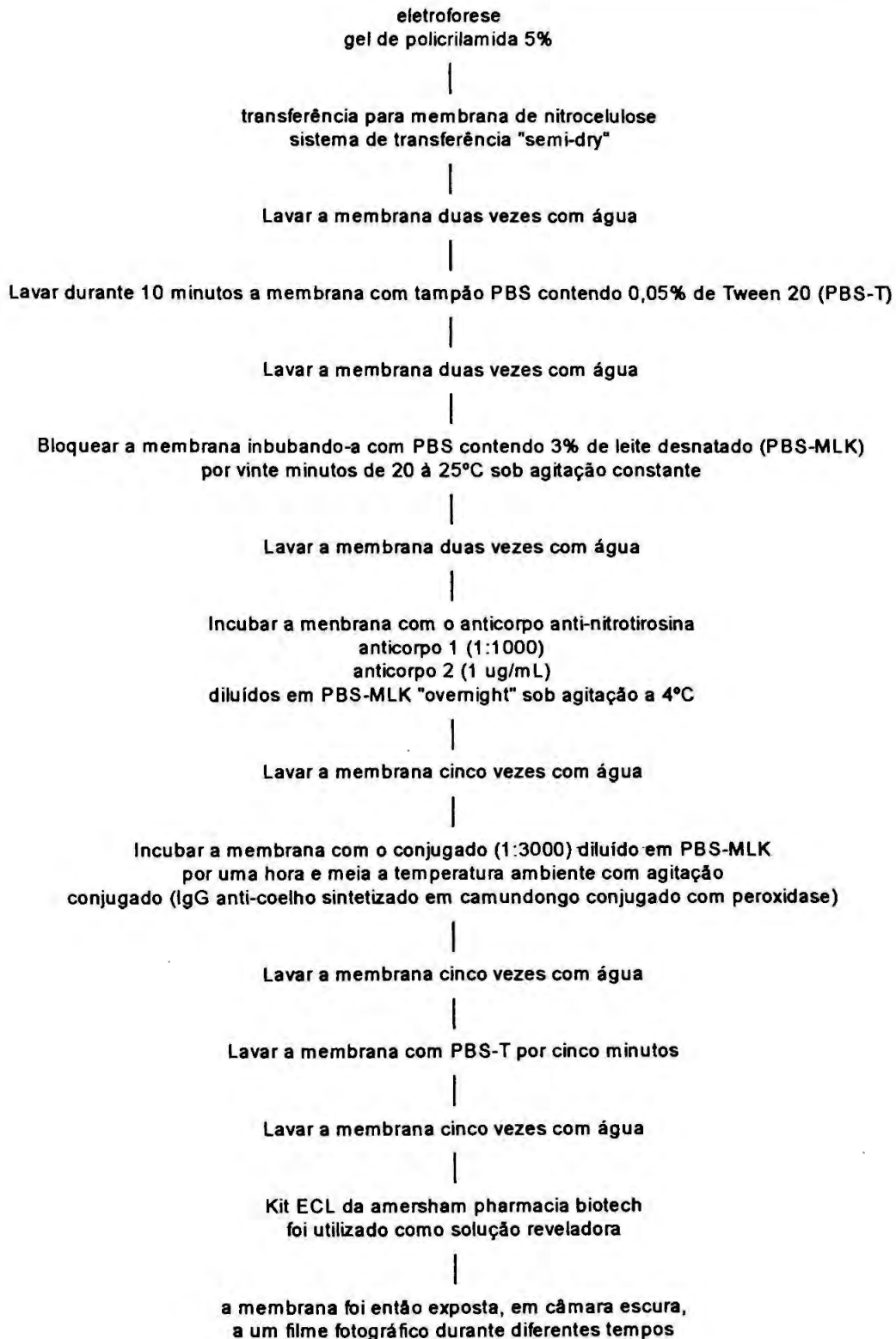
A albumina bovina nitrada, a qual foi utilizada como padrão para a realização das curvas de calibração nos dois ensaios e adsorvida na placa no ELISA competitivo (nitro-ALB; 2-4 mol de nitrotirosina/mol de proteína), foi preparada por adição de uma solução alcalina de peroxinitrito em uma concentração final de 1 mM (Radi e cols., 1991) à uma solução de albumina bovina (ALB - 1 mg/mL). A solução foi então dialisada "overnight" em tampão PBS (tampão de fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 140 mM, cloreto de potássio 2,7 mM e azida de sódio 0,02%). A concentração de nitrotirosina na nitro-ALB foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar  $4300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Khan e cols., 1998) em 438 nm, pH 9.0. O mesmo protocolo de nitração foi seguido para plasma, LDL, albumina humana e aminoácidos que foram utilizados no teste de especificidade do anticorpo. A fragmentação das proteínas tratadas com peroxinitrito foi monitorada através de eletroforese em gel de poliacrilamida 5%.

---

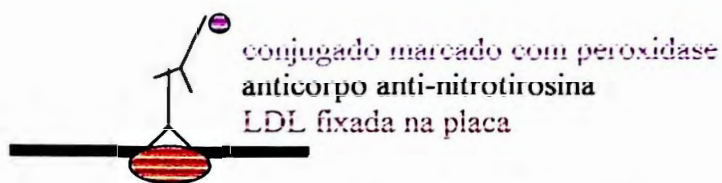
*Especificidade do anticorpo*

O teste de especificidade do anticorpo foi realizado utilizando-se o ELISA competitivo com vários tipos de aminoácidos, plasma, albumina bovina, albumina humana e LDL nitrados, em diferentes concentrações, tratados ou não com 10 mM de ditionito (redução de nitrotirosina para aminotirosina). Realizaram-se ensaios de western blotting para avaliação da especificidade dos anticorpos, utilizando-se padrões de peso molecular, albumina bovina e LDL nitrada e não nitrada. O western blotting foi realizado como demonstrado no esquema 4, utilizando-se um protocolo modificado da Upstate Biotechnology (Towbin e cols, 1979; Hames e Rickwood, 1991).

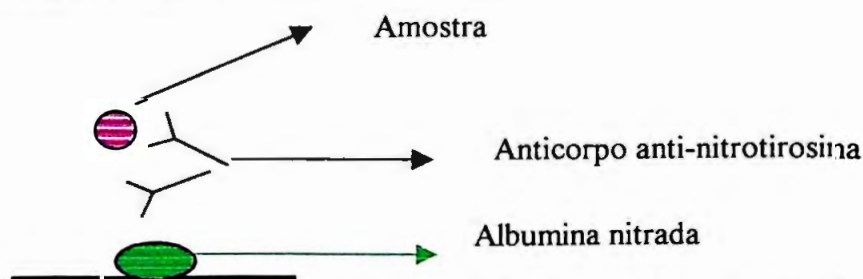




Esquema 4 - Western Blotting realizado para detecção de nitrotirosina

**ELISA direto**

Incubou-se 100  $\mu\text{L}$  da proteína (amostra) "overnight", em diferentes concentrações (0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína), diluída em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,0 a 37°C. Após a incubação, retirou-se o sobrenadante de cada poço e a proteína foi determinada pelo método de Bradford para podermos saber o valor real de proteína que ficou aderida à placa. A placa foi então lavada com tampão TBS (tris-HCl 50 mM pH 7.4 e NaCl 150 mM) contendo Tween 20 (0.6%). Para o bloqueio, incubou-se a placa por duas horas a 37°C com 200  $\mu\text{L}$  de tampão TBS contendo 0,05% de Tween 20 e 5 % de leite desnatado (longa vida) por poço. Após lavagem da placa com o tampão de lavagem previamente descrito, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  por poço do anticorpo anti-nitrotirosina (diluído 1:1000 em TBS contendo 1% de leite desnatado) e a placa foi incubada duas horas a 37°C. A placa foi então lavada e incubada com 100  $\mu\text{L}$  por poço do conjugado (IgG anti-coelho produzido em camundongo conjugado com peroxidase, Stressgen Biotechnologies Corp., diluído 1:5000 em TBS contendo 1% de leite) por 1 hora a 37°C. Após lavagem, adicionou-se luminol (2.3 mM), p-iodofenol (0.9 mM) (200 $\mu\text{L}/\text{poço}$ ), e peróxido de hidrogênio (3.9 nM) (50 $\mu\text{L}/\text{poço}$ ). A leitura da quimiluminescência produzida foi realizada imediatamente, utilizando-se uma leitora de placa de ELISA para quimiluminescência (LumiCount, Packard, Meriden, USA).

**ELISA competitivo**

A placa foi sensibilizada com 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ALBNO (100  $\mu\text{L}$ ) (concentração aproximada de nitrotirosina de 40 a 60  $\mu\text{M}$ ) diluída em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M em pH 9,4 a 37°C, *overnight*. A placa foi então lavada

com 200  $\mu\text{L}$  de tampão TBS (TRIS-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) contendo Tween 20 (0.6%). Para bloqueio, incubou-se a placa por duas horas a 37°C com 200  $\mu\text{L}$  de tampão TBS contendo 0,05% de tween 20 e 5 % de leite desnatado (longa vida) por poço. Após lavagem da placa com o tampão de lavagem previamente descrito, a placa foi incubada com 100  $\mu\text{L}$  por poço do anticorpo anti-nitrotirosina (diluído 1:1000 em TBS contendo 1% de leite desnatado) mais 100  $\mu\text{L}$  da amostra (as amostras de plasma e a albumina nitrada utilizada na curva de calibração devem ser diluídas em TBS contendo 0,1% de leite) por duas horas a 37°C. A placa foi então lavada e incubada com 100  $\mu\text{L}$  por poço do conjugado (IgG anti-coelho produzido em camundongo conjugado com peroxidase, Stressgen Biotechnologies Corp., diluído 1:5000 em TBS contendo 1% de leite) por 1 hora, a 37°C. Após lavagem, adicionou-se luminol (2.3 mM), p-iodofenol (0.9 mM) (200 $\mu\text{L}$ /poço), e peróxido de hidrogênio (3.9 mM) (50 $\mu\text{L}$ /poço). A leitura da quimiluminescência produzida foi realizada imediatamente, utilizando-se uma leitora de placas de ELISA para quimioluminescência (LumiCount, Packard, Meriden, USA). Todas as lavagens foram realizadas com o mesmo tampão descrito anteriormente, lavando-se a placa pelo menos quatro vezes.

As concentrações da nitrotirosina presente na amostra (a qual inibiu a ligação do anticorpo com a nitrotirosina que estava adsorvida na placa) foi estimada na curva de calibração e expressa como equivalentes de nitro-ALB, uma vez que utilizo-se albumina nitrada na curva de calibração. Todas as amostras e pontos da curva de calibração foram realizados em triplicata. As curvas de calibração foram expressas utilizando-se o software Origin versão 5.0 (logistic plot). A quantidade de nitro-ALB nas amostras foi calculado utilizando-se o logito no eixo y ( $\text{logito } (B/B_0) = \log_e [B/B_0] / [B - B/B_0]$ ) e o log da concentração no eixo x (Chakmakjian, 1982).

#### 4.2 - Pacientes

Os pacientes dos grupos anteriormente descritos (normotensos normolipidêmicos (C; n = 11), normotensos hiperlipidêmicos (HC; n = 18) e hipertensos normolipidêmicos (H; n = 11) foram triados pelos Doutores Marcelo C. Bertolami (Ambulatório de Lípides do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia), Dra. Maria T. Zanella e Dr. Frida Plavinik (Ambulatório de Hipertensão do Hospital do Rim

da UNIFESP). Os pacientes foram previamente informados sobre a utilização do material biológico para a realização do trabalho e participaram como voluntários.

Os critérios de inclusão e exclusão adotados para este estudo foram:

a) Critérios de inclusão:

Pressão arterial diastólica e sistólica médias de três consultas ambulatoriais com o intervalo de 15 dias, com placebo;

- Ambos os sexos;
- Sem restrição de raça;
- Idade de 45 a 60 anos;
- Índice de massa corpórea  $< 30\text{Kg/m}^2$ ;
- Hipertensos essenciais estágios I e II de acordo com V JNC (“Joint National Committee”):

Pressão Arterial Sistólica : 140 a 179 mmHg

Pressão Arterial Diastólica : 90 a 109 mmHg;

- Normotensos, apresentando:

Pressão Arterial Sistólica :  $< 140$  mmHg

Pressão Arterial Diastólica :  $< 90$  mmHg.

Hipertensos e hipercolesterolêmicos sem medicação, hipertensiva ou hipolipemiante, de 4 a 6 semanas.

Hipercolesterolêmicos com colesterol total maior que 240 mg/dL e LDL colesterol maior que 120 mg/dL.

b) Critérios de exclusão :

- pacientes fumantes;
- pacientes diabéticos;
- pacientes com processos inflamatórios ou infecciosos;
- pacientes com suplementação vitamínica;
- mulheres sob tratamento com estrógenos;
- Hipertensão secundária;
- Hipercolesterolemia secundária;
- Infarto agudo do miocárdio ou revascularização miocárdia nos últimos 12 meses;

- Antecedente de acidente vascular cerebral ou ataque isquêmico transitório;
- Antecedente de doença renal, hepática, metabólica, neurológica, pulmonar ou hematológica;
- História de doença auto-imune ou colagenose;
- Doença psiquiátrica severa limitando a capacidade de compreensão e aceitação para participar com a doação do material;
- Exames laboratoriais anormais (após 15 dias sem medicação ou com placebo), por exemplo:

Creatinina sérica > 1.2 mg/dl;

Glicemia >120 mg/dl;

145<Na<130 mEq/L;

5,5<K<3,0 mEq/L;

Urina tipo I; proteinúria, hematúria, glicosúria, leucocitúria;

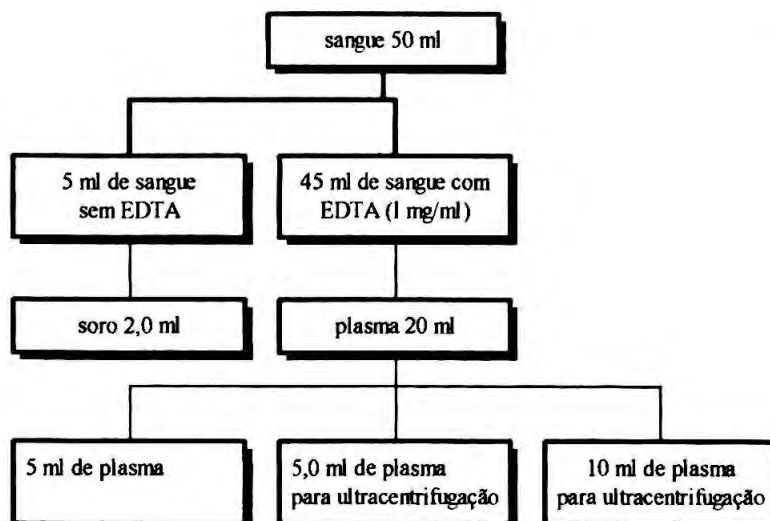
TGO> 1,5 x o limite superior;

TGP> 1,5 x o limite superior.

#### 4.3 - Coleta

O sangue foi coletado em tubos Vacutainer® contendo EDTA como anticoagulante (1 mg/mL de sangue), para obtenção do plasma e sem EDTA, para obtenção do soro. O plasma e o soro foram separados por centrifugação a 2500 rpm a 10 minutos a 4° C. O plasma e o soro obtidos foram armazenados em nitrogênio líquido ou em freezer -80° C até a realização das determinações. O volume de sangue necessário para a realização das análises foi de 50 ml, sendo que este volume total foi dividido como apresentado no esquema 5.





Esquema 5 - Divisão realizada após coleta para armazenamento ideal das amostras

#### 4.4 - Isolamento de lipoproteínas

Foram realizadas duas ultracentrifugações nas amostras coletadas: a primeira, para isolamento da Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (VLDL) ( $1,006 <d> 1,019$ ), da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) ( $1,020 <d> 1,063$  g/ml), e da Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) ( $1,065 <d> 1,210$ ) do plasma dos pacientes, na presença de EDTA (1,0 mg/ml), BHT (20  $\mu$ M) e uma combinação de inibidores de proteases (PMSF, aprotinina e benzamidina) (Havel e cols., 1955). Na segunda, realizou-se o isolamento das subfrações leve ( $1,020 <d> 1,045$ ) e pesada ( $1,045 <d> 1,063$ ) da LDL por ultracentrifugação do plasma em gradiente de densidade com cloreto de sódio, na presença de inibidores de proteases (PMSF (1 mM), aprotinina (2 mg/mL) e benzamidina (2 mM)). As lipoproteínas foram, em seguida, dialisadas em 6 litros de tampão pH 7,4 (NaCl 150,0 mM, EDTA 1,0 mM,  $\text{NaN}_3$  3 mM e Tris 10,0 mM), a 4° C, durante 12 horas, sendo que para a LDL pesada utilizou-se o mesmo tampão, porém, sem EDTA.

#### **4.5 - Determinação de colesterol total, proteínas e triacilgliceróis no plasma e do colesterol nas lipoproteínas**

As concentrações de colesterol total e de triacilgliceróis do plasma e das frações lipoprotéicas foram determinados por métodos enzimáticos, utilizando-se reagentes comerciais (Biosystems - Espanha). As proteínas totais foram determinadas pelo método de Lowry e cols. (1951), utilizando albumina bovina como padrão.

O colesterol contido na HDL foi determinado por método enzimático (Biosystems, Espanha), após a precipitação das frações LDL e VLDL. Para obtenção da concentração de colesterol na LDL foi utilizada a fórmula de Friedwald e cols. (1972):

$$\text{LDL colesterol} = \text{Colesterol total} - (\text{VLDL colesterol} + \text{HDL colesterol}),$$

onde,  $\text{VLDL colesterol} = \text{Triacilgliceróis}/5$

#### **4.6 - Determinação dos hidroxi/hidroperóxidos de éster de colesterol (CE-OOH), triacilglicerol (TL-OOH) e fosfolípides (PL-OOH)**

Os hidroxi/hidroperóxidos lipídicos presentes no plasma dos pacientes foram detectados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detector dioderay (235 nm). A extração de CE-OOH e TL-OOH foi realizada com metanol:hexano (1:3, v/v) (Folcik e cols., 1994) e a extração de PL-OOH, com metanol:clorofórmio (1:2, v/v) (Akasaka e cols., 1993). A fase contendo hexano ou clorofórmio foi evaporada e o resíduo foi dissolvido na fase móvel (metanol contendo 20 mM de acetato de lítio) (Terao e Fukino, 1993); essa solução foi filtrada em membranas com poros de 22  $\mu\text{m}$  e injetada no cromatógrafo (20  $\mu\text{l}$ ), através do injetor automático SIL-10A (Shimadzu Corp.). A quantificação dos produtos de lipoperoxidação presentes na amostra foi feita com padrões externos, através de curvas de calibração com níveis múltiplos, utilizando-se o software package Class-LC10, LC-work station. Foi utilizado um sistema cromatográfico LC10 da Shimadzu Corp., e coluna cromatográfica C-8 Inertisil (GL Sciences Inc.) com fluxo de 1 ml por minuto.

#### 4.7 - Determinação de ascorbato, urato, $\alpha$ -tocoferol, $\beta$ -caroteno e licopeno

As concentrações plasmáticas dos antioxidantes hidrossolúveis, ascorbato e urato, e dos lipossolúveis,  $\alpha$ -tocoferol, licopeno e  $\beta$ -caroteno, foram determinadas por HPLC com detector eletroquímico (potencial = + 600 mV). A extração de ascorbato e urato foi feita com ácido perclórico 0,75% (Tsao e Salimi, 1981) e a extração dos antioxidantes lipossolúveis foi realizada com metanol:hexano (1:3, v/v) (Keaney e col., 1994). A fase de hexano contendo os antioxidantes lipossolúveis foi evaporada e o resíduo, dissolvido em fase móvel; esta solução e o sobrenadante da extração do ascorbato e urato foram filtrados em membranas com poros de 22  $\mu$ m e injetados no cromatógrafo (20  $\mu$ l), através do injetor automático SIL-10A (Shimadzu). A quantificação das amostras foi feita com padrões externos, através de curvas de calibração com níveis múltiplos, utilizando-se o mesmo software descrito no item 4.6. Foi utilizado o mesmo sistema cromatográfico anterior, com uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> CG-Nucleosil (CG do Brasil SA). Para a análise de  $\alpha$ -tocoferol, licopeno e de  $\beta$ -caroteno foi utilizada fase móvel composta por metanol:acetonitrila:clorofórmio (35:35:30, v/v/v), contendo perclorato de lítio 20 mM (Thurnhan e col., 1988). Na determinação de ascorbato e urato, a fase móvel foi composta de acetato de sódio trihidratado (0,04 M), decilamina (1 mL) e EDTA (0,200 g/l) em 950ml de água deionizada; ácido acético glacial foi adicionado até atingir-se pH 5 e o volume foi completado para 1 litro com água deionizada. O fluxo da fase móvel foi de 1mL/minuto para todas as análises.

#### 4.8 - Cinética de oxidação da LDL (lag time, lag rate, log rate e peak time)

As frações pesada da LDL (0,5 mg de proteína/ml) foram incubadas com 60  $\mu$ M de CuSO<sub>4</sub> em PBS à 37°C, monitorando-se a cinética da reação de oxidação através da medida contínua da conjugação de dienos em 234 nm, durante 4 horas. A cinética de oxidação da LDL foi analisada, considerando-se quatro diferentes componentes deste processo: 1 - LAG TIME: fase de iniciação, ou seja, tempo requerido para que ocorra o consumo total dos antioxidantes das lipoproteínas; 2 - LAG RATE: aumento da absorvância em 234 nm durante o lag time, que representa a velocidade do processo de iniciação; 3 - LOG RATE: aumento da absorvância depois do lag time, que representa a

velocidade de propagação da reação de peroxidação lipídica; 4 – PEAK TIME: tempo final de oxidação das partículas de lipoproteína (figura 10) (Esterbauer e cols., 1992).

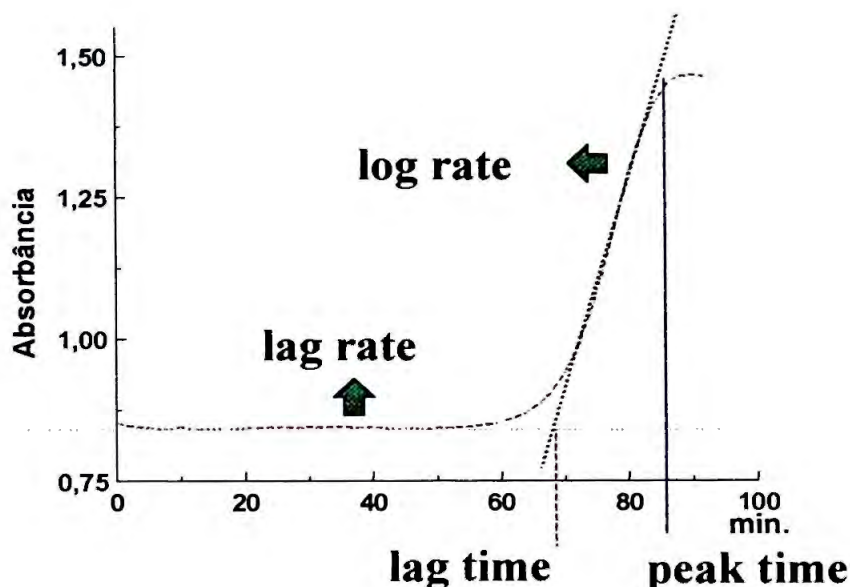


Figura 10 - Cinética de oxidação da LDL, considerando-se quatro diferentes componentes deste processo: 1- LAG TIME; 2 - LAG RATE; 3 - LOG RATE e 4 - PEAK TIME.

#### 4.9 - Determinação de nitrato

O nitrato presente no plasma dos pacientes foi determinado pelo analisador de  $\text{NO}$  (quimioluminescência). A quantificação da amostra foi feita com padrões externos de nitrato, através de curvas de calibração com níveis múltiplos, conforme descrito no item 4.1.1.

#### 4.10 - Determinação da espessura do complexo medial - intimal da parede arterial das carótidas e braquial e da presença de placa aterosclerótica

Os estudos ultrassonográficos foram realizados pelo Dr. Sérgio Ajzen da UNIFESP. A determinação da espessura do complexo medial-intimal do endotélio (1 cm abaixo do bulbo) das carótidas comuns direita (CCD) e esquerda (CCE) e da artéria braquial foi realizada utilizando-se o aparelho de ultra-sonografia da marca ATL,

modelo HDI-Ultramark-9 com transdutor linear. Foram realizadas três determinações em cada artéria (figura 11).



Figura 11 - Determinação da espessura do complexo medial-intimal da parede arterial da carótida direita por ultrassonografia.

#### **4.11 - Determinação do relaxamento vascular dependente do endotélio (RDE)**

Esta medida foi realizada na artéria braquial pela determinação da diferença de fluxo sanguíneo e de diâmetro arterial, antes e após hiperemia reativa, ocasionada por oclusão da artéria braquial por 5 minutos com manguito (200 mmHg), avaliando-se o relaxamento vascular dependente do endotélio, após este tempo. Foi utilizado o aparelho de ultra-sonografia da marca ATL, modelo HDI-Ultramark-9 com transdutor linear. (figura 12)



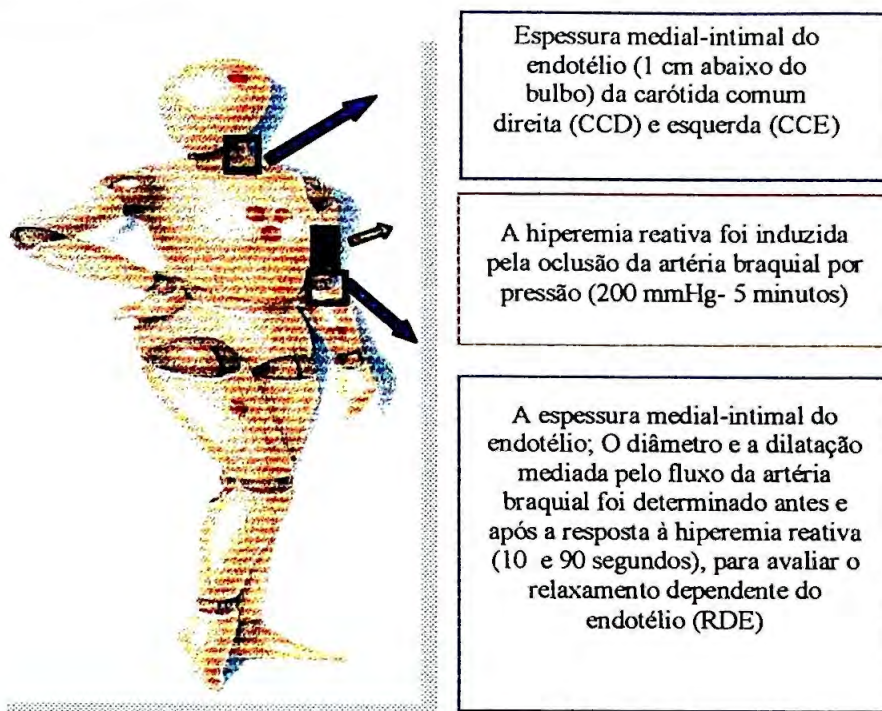


Figura 12 – Protocolo de determinação do relaxamento dependente do endotélio após hiperemia reativa.

#### 4.12 - Nitrotirosina plasmática

A concentração de nitrotirosina plasmática foi determinada utilizando-se o ensaio de ELISA competitivo descrito anteriormente. A amostra utilizada foi plasma (diluído 1/4).

#### 4.13 - Nitrotirosina ligada a LDL

A concentração de nitrotirosina na LDL foi determinada utilizando-se o ensaio de ELISA competitivo descrito anteriormente. As amostras utilizadas foram de LDL isoladas por ultracentrifugação (com concentração aproximada de 1 mg/mL de proteína). Foram feitas correções de concentração, utilizando-se a quantidade de apoB existente no plasma, uma vez que a ultracentrifugação concentra a amostra.

#### 4.14 - Nitrotirosina na albumina plasmática

Após revelação do western blotting com ECL, como citado anteriormente, e exposição ao filme (Hyperfilm ECL ou Kodak G-RA Filme), a densidade do filme foi determinada e as concentrações foram obtidas pela correlação da área da banda obtida para cada amostra com a área do padrão que foi analisado no mesmo imunoblot.

#### 4.15 - Determinação de nitrito no plasma e nos eritrócitos

Utilizou-se o equipamento NOA<sup>TM</sup>280 (Sievers, USA) descrito anteriormente. Para a determinação de nitrito da amostra foi utilizado como agente redutor de iodeto de potássio 1% em ácido acético para a conversão de nitrito em <sup>\*</sup>NO.



As curvas de calibração com níveis múltiplos foram realizadas com padrão externo (nitrato de sódio – Aldrich – 22,134-1), utilizando-se o software Bag program (versão 2.2 - Sievers, USA). Foram utilizadas amostras de plasma sem qualquer tipo de preparação prévia. Os eritrócitos foram obtidos a partir de sangue total coletados com 1 mg/mL de EDTA, estes tubos foram centrifugados a 2500 RPM durante dez minutos a 4°C. Os eritrócitos foram cuidadosamente retirados do infranadante e armazenados em nitrogênio líquido (hemólise) até o momento da análise. Nos hemolisados, realizou-se uma extração com 1,0 mL de clorofórmio, 1,0 mL de água e 1,0 mL da amostra, para a retirada das membranas presentes. Esta mistura foi agitada no vortex e posteriormente centrifugada a 10.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi então retirado para a análise.

#### **4.16 - S-nitrosotíóis no plasma**

As concentrações plasmáticas foram determinadas pelo método citado no item 4.1.2. Utilizou-se 250 µL de plasma em cada injeção.

#### **4.17 - Determinação das apolipoproteínas, ceruloplasmina, Lpa, fibrinogênio, plasminogênio e proteína C reativa (PCR)**

As concentrações plasmáticas das apolipoproteínas (apo AI, AII, B e E) assim como da Lpa, fibrinogênio, ceruloplasmina, plasminogênio e PCR (proteína C reativa) foram determinadas por imunonefelometria, utilizando-se reagentes comerciais (DADE BEHRING Ltda.) e como equipamento o “Behring Nephelometer Analyser” (DADE BEHRING Ltda.).

#### **4.18 - Determinação da paraoxonase**

A determinação da concentração da paraoxonase no plasma (diluído 1/250) dos pacientes foi realizada pelo ensaio de ELISA competitivo, utilizando-se um kit comercial (Wal - Chemie Medical GMBH, Alemanha) com um anticorpo policlonal anti-paraoxonase. O conjugado utilizado neste ensaio foi IgG anti-camundongo, obtido em ovelha, marcado com peroxidase (Stressgen Biotechnologies Corp), diluído 1:6000 em PBS contendo 1% de leite, o qual foi incubado por 2 horas, a 37°C. Após lavagem da placa, utilizou-se como substrato da peroxidase o ácido 2,2 azino-bis-3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico (0,53 mg/mL) em tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 4,2, recém preparado, acrescido de 0,25 µL/mL de peróxido de hidrogênio (30%). Este substrato, preparado no momento do uso, foi incubado por trinta minutos no escuro, à temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se a leitura da absorbância em 405 nm. Foi realizada uma curva de calibração, com várias concentrações de paraoxonase (5,44 à 0,17 µg/mL), obtendo-se assim a concentração plasmática de paraoxonase no plasma dos pacientes.

#### 4.19 - Determinação da Endotelina

A concentração de endotelina plasmática foi determinada utilizando um Kit comercial (EIAH-6901 – Endothelin-1, Peninsula laboratories, INC., Inglaterra. A amostra utilizada foi plasma sem extração.

#### 4.20 - Determinação dos Isoprostanos

A concentração de isoprostanos do plasma foi determinada utilizando-se um kit comercial (8EPGF2 Immunoassay Kit - Oxford Biomedical Research, USA). O plasma foi concentrado duas vezes para a posterior determinação dos isoprostanos.

#### 4.21 - Determinação dos óxidos de colesterol

Os óxidos de colesterol determinados foram:

- $7\beta$ -Hidroxicolesterol;
- $7\alpha$ -Hidroxicolesterol;
- 7 Cetocolesterol;
- 25-Hidroxicolesterol;
- Colestan- $3\beta$ ,  $5\alpha$ ,  $6\beta$ -triol;
- Colesteril  $\beta$ -epóxido;
- Colesteril  $\alpha$ -epóxido;

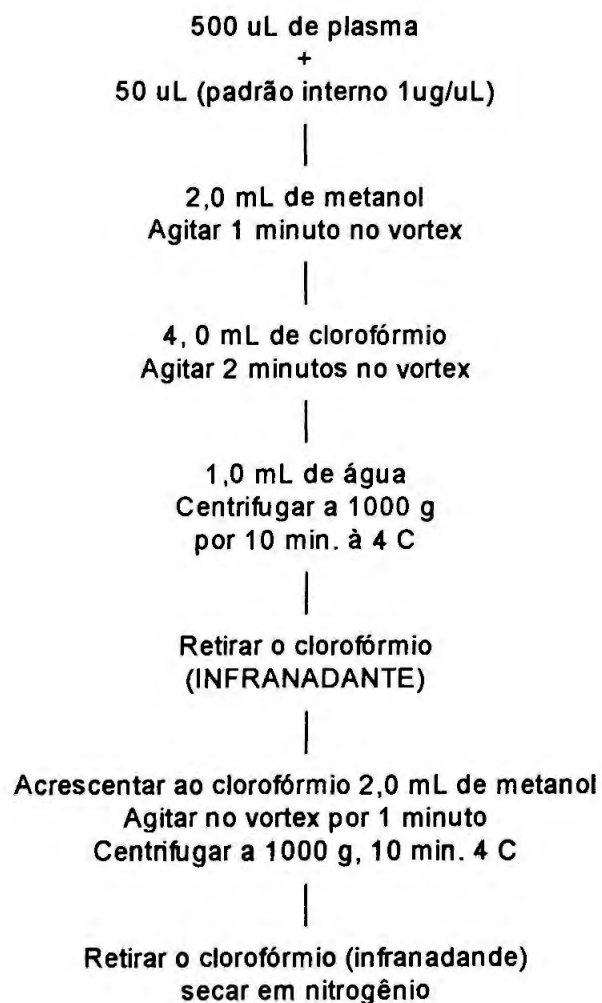
#### Extração

A extração dos óxidos de colesterol plasmáticos é constituída de quatro etapas: na primeira etapa realiza-se a purificação da parte lipídica da amostra (esquema 6); A segunda etapa é a retirada dos fosfolípidos presentes na amostra através de extração em fase sólida (esquema 7); A terceira etapa é a hidrólise dos lípidos pela saponificação (esquema 8) e a última etapa é a metilação para conversão dos ácidos carboxílicos em

metil ésteres (esquema 9). Para extração foi utilizado 500  $\mu\text{L}$  de plasma e uma concentração de 500  $\text{ng}/\mu\text{L}$  de padrão interno (5 $\alpha$ -colestano).

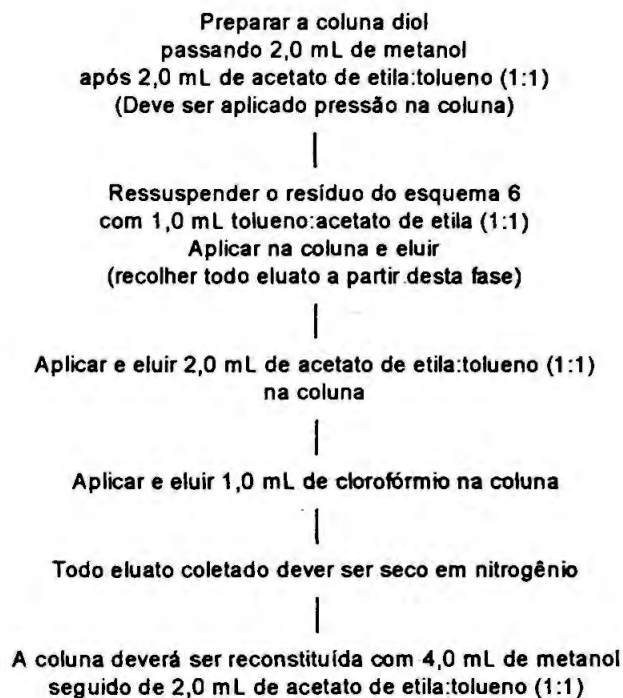
### **Determinação por Cromatografia Gasosa**

Os óxidos de colesterol extraídos foram derivatizados aos derivados trimetilsilil (TMS), após adição de 50  $\mu\text{L}$  de dimetilformamida e 50  $\mu\text{L}$  de N, O-bis(trimetilsilil) trifluoracetamida (BSTFA), sob fluxo de nitrogênio, mantendo-se a 80 °C durante 20 minutos. As amostras derivatizadas foram injetadas por injeção automática (1  $\mu\text{L}$ ), no cromatógrafo a gás (CG 6890-Plus - Hewlett Packard), equipado com detetor de ionização de chama (FID). A curva de calibração de níveis múltiplos foi realizada na presença de padrão interno, utilizando-se software próprio da Hewlett Packard. As amostras foram quantificadas através do software, após normalização com o padrão interno, utilizando para as curvas dos padrões externos. O gás hidrogênio foi usado como gás carreador, com um fluxo de 5  $\text{mL}/\text{min}$  e pressão de 20 psi; a temperatura de injeção foi de 290 °C e a temperatura inicial da coluna foi de 260 °C, com um *split ratio* 1:5. A coluna utilizada foi a HP-5, 5% fenilsiloxano 30 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  (Hewlett Packard). A temperatura do detector foi de 300 °C e o programa de temperatura usado na análise das amostras ocorreu mantendo-se a temperatura inicial por 2 minutos, seguido de um aumento de 5 °C/min até 290 °C, sendo o tempo total de corrida de 8 minutos (Sevanian et al., 1994 modificado).

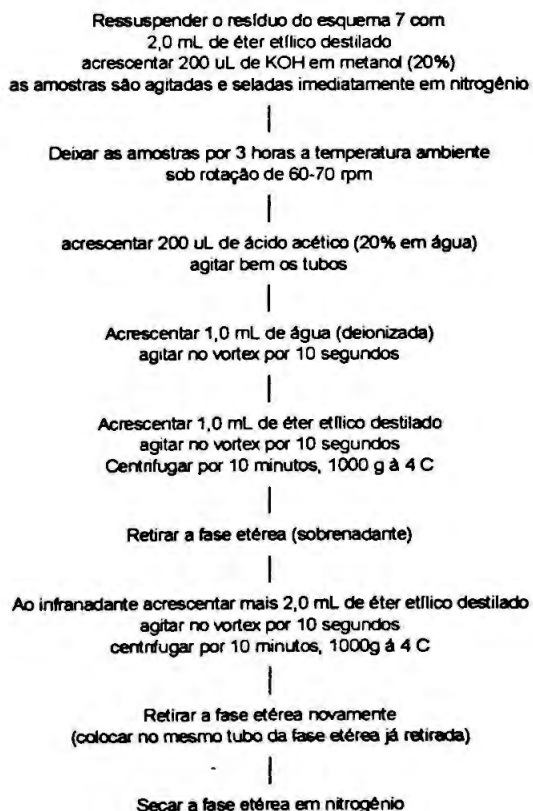


Esquema 6 - Primeira fase de extração dos óxidos de colesterol

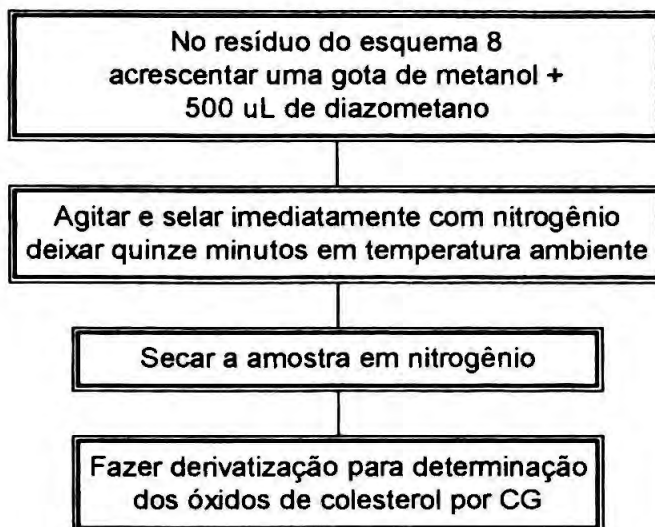




Esquema 7 - Segunda fase de extração dos óxidos de colesterol



Esquema 8 - Terceira fase de extração dos óxidos de colesterol



Esquema 9 - Quarta fase de extração dos óxidos de colesterol

#### 4.22- Análise estatística

Os resultados foram calculados como média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando-se um teste não paramétrico (Turkey) com  $p < 0.05$  considerado significativo. As correlações foram testadas pelo teste "Pearson Product Moment Correlation" (Sigma Stat software). As curvas de calibração realizadas nos ensaios de ELISA foram construídas no software Origin 5.0, assim como todos os gráficos apresentados nesta tese.

## **5. RESULTADOS**

## 5.1 - Padronizações

### 5.1.1 - Padronização da determinação de nitrato

#### Analizador de $\bullet\text{NO}$

A figura 13 mostra os picos característicos do nitrato em uma amostra de plasma, preparada e determinada conforme descrito nos itens 4.1.1 e 4.9. A tabela 3 mostra a comparação dos valores da concentração de nitrato no plasma de indivíduos voluntários normais ( $n = 14$ ). As amostras de plasma foram tratadas com etanol, a  $0^{\circ}\text{C}$ , para a retirada das proteínas do plasma por precipitação (sugerido pelo fabricante).

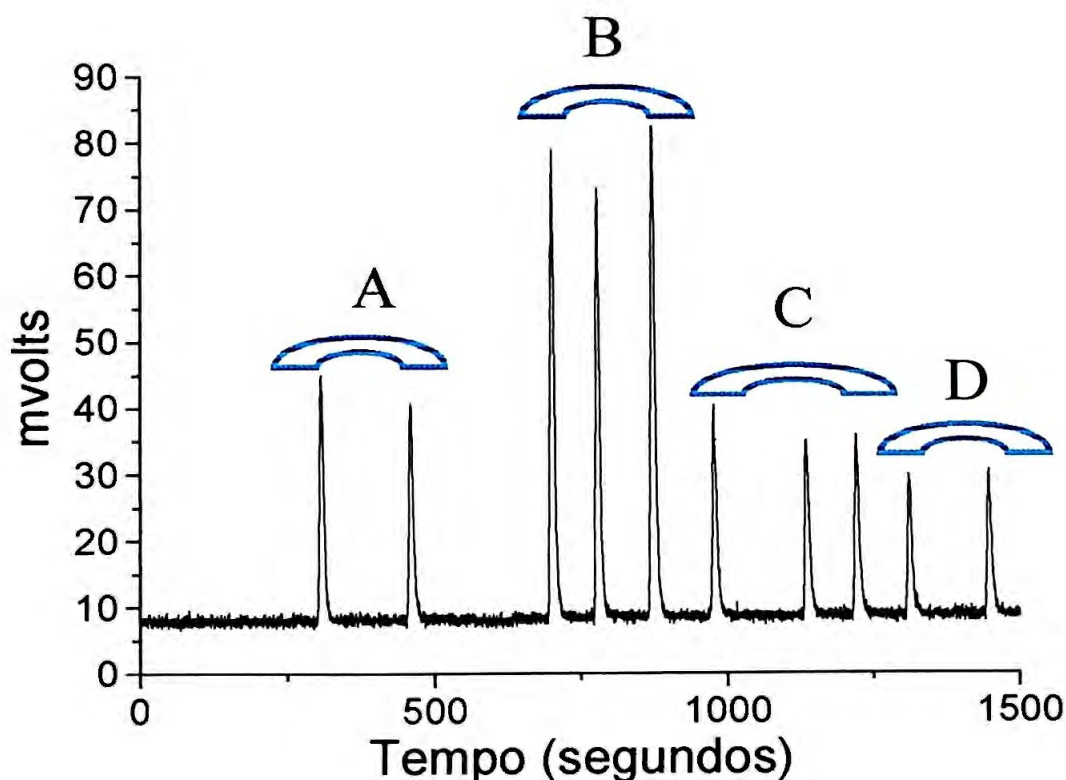


Figura 13- Picos característicos do padrão de nitrato contendo  $25\ \mu\text{M}$  (A) e  $50\ \mu\text{M}$  (B) e no plasma contendo  $18,2\ \mu\text{M}$  (C) e  $14,2\ \mu\text{M}$  (D), analisados pelo analisador de  $\bullet\text{NO}$ . As injeções foram realizadas em duplicata ou triplicata.

Tabela 3 - Comparação da concentração de nitrato no plasma filtrado, após extração com etanol e sem nenhum tipo de preparação

	nitrato ( $\mu\text{M}$ )
Plasma	$18,41 \pm 5,93$
Plasma (extração com etanol)	$18,50 \pm 6,83$
Plasma (após filtração)	$18,72 \pm 8,73$

Observamos que os valores de nitrato, quando analisados pelo analisador de  $^*\text{NO}$  após extração ou filtração, foram, respectivamente, 0,48 % e 1,68% vezes maiores que o plasma sem nenhum tipo de preparação prévia. Devemos ressaltar que na extração realizada com etanol deve-se ter extremo cuidado com a evaporação do etanol durante o processo, uma vez que a ocorrência desta evaporação promove uma concentração da amostra, resultando em valores mais elevados. A utilização do plasma sem preparação prévia é inadequada, porque as proteínas no plasma promovem um alargamento dos picos. Outro inconveniente é que o reagente utilizado para redução deve ser trocado mais vezes (presença de espuma).

### 5.1.2 - Padronização da determinação de S-nitrosotióis

#### Analizador de $^*\text{NO}$

O limite de detecção de nitrito, obtido para a injeção de 250  $\mu\text{L}$  de amostra, foi de 5 nM. Vários volumes de injeção foram estudados, porém, como a concentração de S-nitrosotióis é extremamente baixa, só conseguimos obter diferenças entre as concentrações de nitrito, antes e após redução, utilizando 250  $\mu\text{L}$  de amostra. Este volume de amostra é um grande inconveniente uma vez que é necessária realizar as análises em replicatas, utilizando-se um volume final de um mililitro (1,0 mL) de amostra.

### 5.1.3 - Avaliação da determinação de isoprostanos por ELISA

Foi realizada uma curva de calibração com a solução padrão fornecida no kit 8EPGF2 (Immunoassay Kit - Oxford Biomedical Research, USA). As amostras de plasma ( $n = 5$ ) foram extraídas, como descrito no esquema 2, e concentradas dez vezes. Pelo fato dos resultados obtidos estarem acima do limite superior da curva de calibração (50 ng/mL) (figura 14B), concentramos as amostras apenas duas vezes, pois os valores encontrados estavam na faixa intermediária de concentrações da curva de calibração. A concentração observada para os isoprostanos no plasma de 5 voluntários foi de  $(95,3 \pm 5,8)$  pg/mL. Os valores citados na literatura variam muito, dependendo da metodologia empregada, sendo que a concentração plasmática dos isoprostanos, quando analisados por CG-MS, varia de 5 a 50 pg/mL (Morroe e Roberts, 1997) e de 640 pg/mL a 5120 pg/mL, quando analisados por radioimunoensaio (Basu, 1998). Portanto, os valores encontrados em nossos experimentos prévios são intermediários entre aqueles obtidos por CG-MS e RIE.

### 5.1.4. Avaliação da determinação de endotelina por ELISA

Foi realizada uma curva de calibração (solução padrão fornecida pelo Kit EIAH-6901 – Endothelin-1) e as amostras de plasma foram extraídas ( $n = 5$ ) como descrito no esquema 3. Observamos que os valores obtidos para as amostras estavam acima do limite superior da curva de calibração (25 ng/mL) (figura 14A). Após repetições (aproximadamente 4 repetições), para detectarmos possíveis erros metodológicos tanto na extração quanto no ensaio ELISA, observamos que os valores obtidos para as amostras foram reprodutíveis. Chegamos à conclusão de que o kit não estava com problemas quanto à precisão, uma vez que, os padrões e as curvas de calibração realizadas no ELISA sempre foram similares (variação de  $3,00 \pm 1,3$  %) e que todos os brancos de reagentes do kit resultaram nos valores esperados. Partimos então para a avaliação da extração. Avaliamos os reagentes A, B e o eluato após extração (sem amostra), utilizando duas marcas de TFA, avaliamos a água e a acetonitrila separadamente. Os resultados para os eluatos, assim como para os reagentes A e B (independente do TFA utilizados) mostraram que os valores estavam acima do limite superior da curva de calibração (25 ng/mL), mesmo sem a presença da amostra.



Como o anticorpo fornecido pelo kit não apresentava reatividade cruzada com outros tipos de peptídeos (reatividade somente para endotelina 1, 2 e big endotelina 1) realizamos o ensaio com o plasma sem extração. Observamos que os valores do plasma foram de  $1,04 \pm 0,15$  ng/mL de endotelina. Após diluição do plasma de 1/10, obtivemos valores de  $0,99 \pm 0,10$  ng/mL, após correção pelo fator de diluição, demonstrando a exatidão do método. Para o plasma concentrado 5 vezes obtivemos valores acima do limite superior da curva de calibração e, portanto, fora da faixa linear da curva. Os valores encontrados na literatura, apenas para a endotelina 1, vão de 45 à 2 pg/mL (Avontuur e cols., 1999); portanto 200 vezes menores que os resultados obtidos em nosso trabalho. Pelo fato do anticorpo utilizado no kit apresentar reatividade cruzada de 100 % com a endotelina 2 e a big endotelina 1, o ensaio utilizando o plasma diretamente sem extração prévia indica a somatória das concentrações dos três peptídeos mencionados.

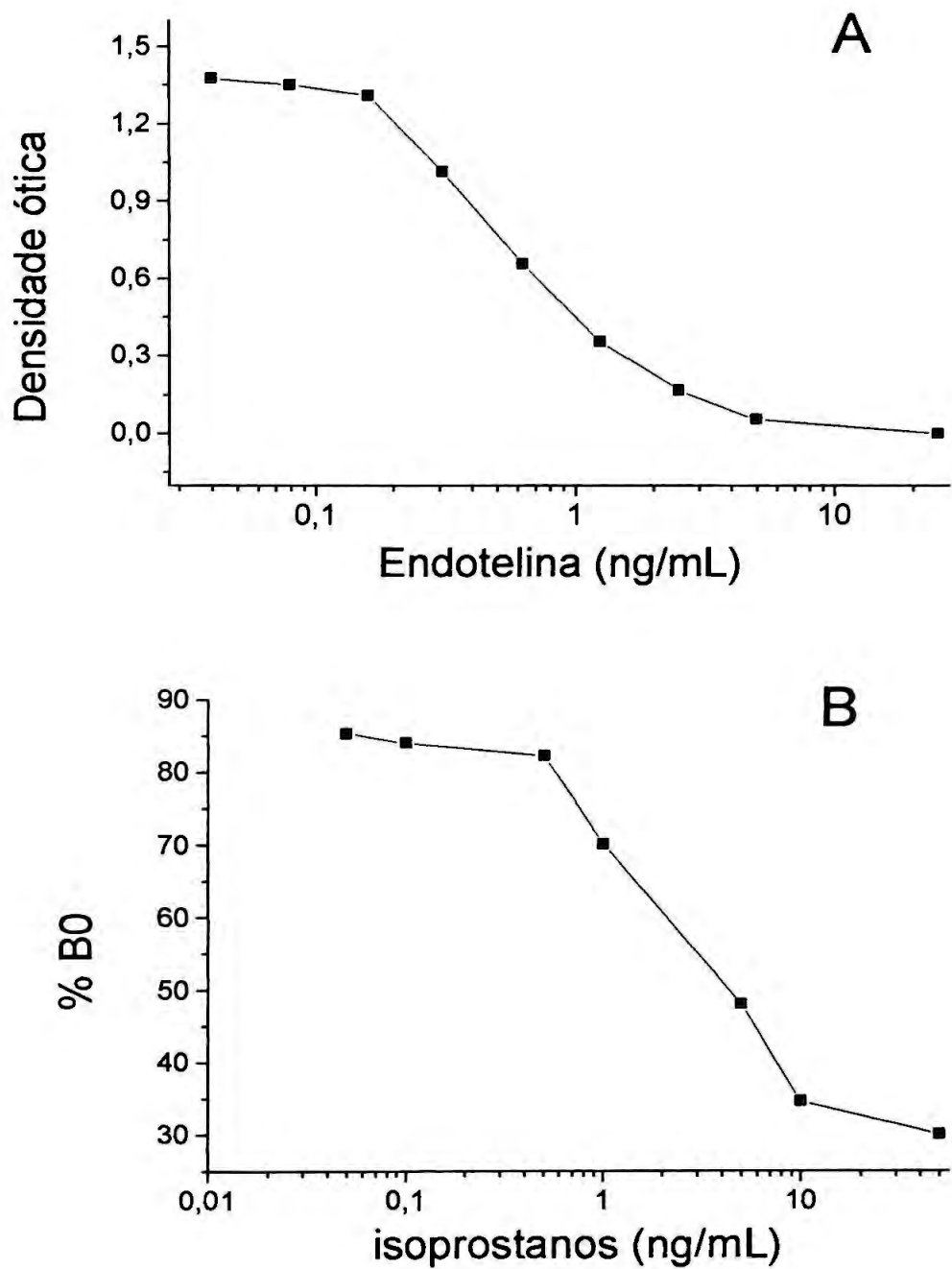


Figura 14 – Curvas de calibração de isoprostanos (B) e endotelina (A) determinados por ELISA.

### 5.1.5 - Padronização do ELISA para determinação de nitrotirosina

#### *Preparação de proteínas nitradas*

Após a nitração, descrita anteriormente, a concentração de nitrotirosina na nitro-ALB esteve entre 40 - 60  $\mu\text{M}$ . A nitração foi realizada no dia do uso; não obtivemos bons resultados com amostras que foram nitradas e congeladas.

A figura 15 mostra a eletroforese de uma albumina nitrada e uma não nitrada, mostrando não existir uma fragmentação da albumina na presença de 1 mM de peroxinitrito. Foi observada uma banda com peso molecular de 94.000, sugerindo a existência de agregação da albumina após nitração.

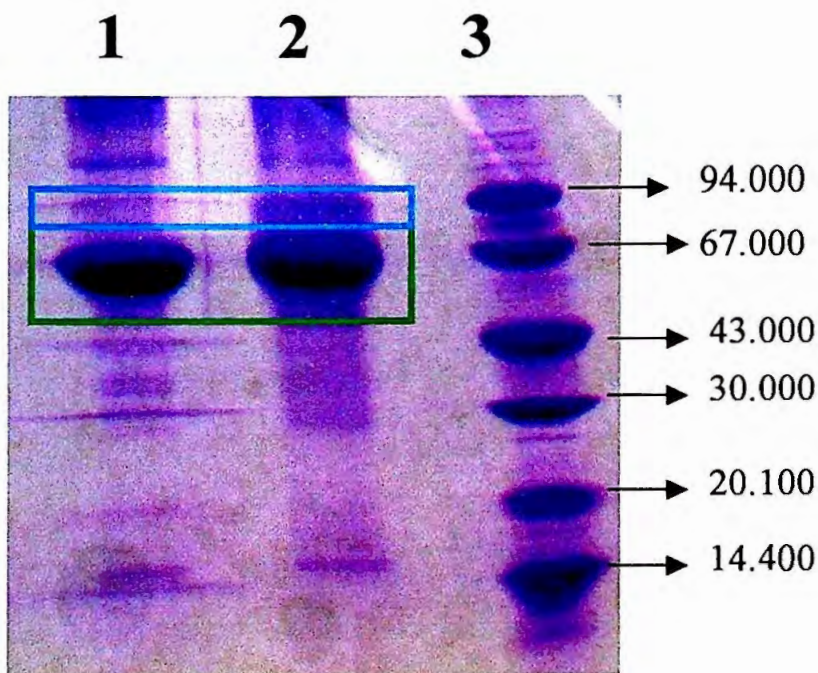


Figura 15 - Eletroforese da albumina e albumina nitrada. Lane 1 = Albumina Bovina; Lane 2 = Albumina Bovina nitrada com 1 mM de peroxinitrito; Lane 3 = Padrão de peso molecular. Quadro verde = albumina; Quadro Azul = agregação da albumina

### *Especificidade do anticorpo*

A tabela 4 mostra a especificidade do anticorpo utilizado. A figura 16 mostra o western blotting utilizando-se o padrão de peso molecular, albumina bovina, plasma e LDL (nitrados e não nitrados). As  $IC_{50}$  para a albumina humana nitrada, albumina bovina nitrada e nitrotirosina, foram de 1 mM, 8 mM e 100 mM, respectivamente, indicando a alta afinidade do anticorpo para os resíduos de nitrotirosina ligados à albumina humana. A inibição da ligação do anticorpo pela albumina humana e pela albumina bovina foi muito baixa, quando comparada com suas formas nitradas (tabela 4). A especificidade da reatividade deste anticorpo para resíduos de nitrotirosina presentes nas albuminas foi confirmada por redução com ditionito de sódio (reduz nitrotirosina à aminotirosina) das proteínas pré-tratadas com peroxinitrito. Após a redução, a porcentagem de inibição do anticorpo pelas albuminas tratadas com peroxinitrito e posteriormente reduzidas foi similar às mesmas sem nenhum tipo de tratamento (tabela 5).

Tabela 4 - Especificidade do anticorpo anti-nitrotirosina representado em % de inibição da ligação do anticorpo com a albumina nitrada adsorvida na placa

	% inibição	Concentração
Albumina bovina	6,62 ± 1,05	1 μM
	0	0,125 μM
Albumina bovina (ONOO <sup>-</sup> )	98,61 ± 0,13	1 μM
	96,67 ± 1,26	0,125 μM
Albumina bovina (ONOO <sup>-</sup> ) (reduzida)	7,69 ± 0,45	1 μM
	0	0,125 μM
cisteína	3,27 ± 0,44	1mM
	0	0,01 mM
cisteína (ONOO <sup>-</sup> )	2,70 ± 0,50	1mM
	0	0,01 mM
Albumina humana	6,76 ± 3,77	1 μM
	4,99 ± 0,49	0,125 μM
Albumina Humana (ONOO <sup>-</sup> )	99,59 ± 0,07	1 μM
	98,93 ± 0,71	0,125 μM
Albumina Humana (ONOO <sup>-</sup> ) (reduzida)	8,98 ± 0,63	1 μM
	1,59 ± 0,50	0,125 μM
metionina	4,83 ± 1,52	1mM
	0	0,01 mM
metionina (ONOO <sup>-</sup> )	4,95 ± 3,22	1mM
	0	0,01 mM
nitrito	8,41 ± 3,60	1mM
	5,25 ± 3,96	0,01 mM
nitrito	9,67 ± 4,30	1mM
	6,86 ± 0,90	0,01 mM
tirosina	3,77 ± 0,77	1mM
	0	0,01 mM
nitrotirosina	79,95 ± 3,07	1 μM
	44,72 ± 0,70	125 nM
triptofano	0	1mM
	0	0,01 mM
triptofano (ONOO <sup>-</sup> )	0	1mM
	0	0,01 mM

Os resultados são a média ± desvio padrão de triplicatas; (ONOO<sup>-</sup>), amostras tratadas com 1 mM de peroxinitrito; (reduzida), amostras tratadas com peroxinitrito e reduzidas com 1 mM de ditionito de sódio.



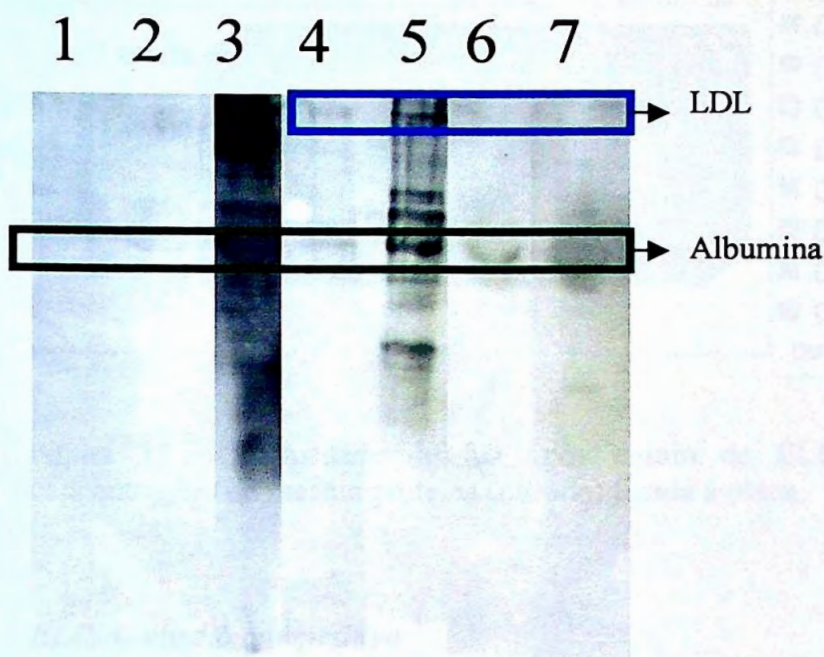


Figura 16 - Western Blotting. Lane 1 = Padrão de peso molecular; Lane 2 = Albumina Bovina; Lane 3 = Albumina Bovina nitrada; Lane 4 = LDL; Lane 5 = LDL nitrada; Lane 6 = Plasma; Lane 7 = Plasma nitrado. Para a nitração utilizou-se 1 mM de peroxinitrito. A concentração de proteína utilizada foi 30  $\mu$ g por lane.

### ***ELISA- ensaio direto***

Este ensaio funcionou perfeitamente para as proteínas que eram nitradas *in vitro*, porém quando começamos a testar o plasma e a LDL, sem nenhum tipo de oxidação e/ou nitração induzidas *in vitro*, não conseguimos obter leituras nas amostras, devido à baixa concentração de nitrotirosina presente nas mesmas. Uma das possíveis soluções para este problema seria aumentar a concentração de proteína a ser fixada na placa; porém, a concentração máxima de proteína possível de ser adsorvida à placa foi de 0,20  $\mu$ g de proteína/poço, o que não foi suficiente para um aumento importante da sensibilidade de detecção (figura 17).



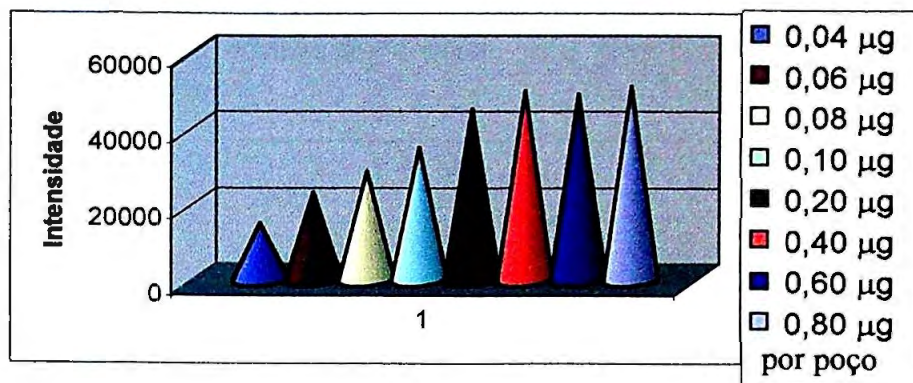


Figura 17 - Intensidade de luz após ensaio de ELISA direto com diferentes concentrações da mesma proteína (nitrada) fixada à placa.

### ***ELISA- ensaio competitivo***

O ensaio de ELISA competitivo foi sensível e específico para a detecção de concentrações basais de nitrotirosina no plasma e na LDL (tabela 5). O tratamento do plasma e da LDL com peroxinitrito resultou em um aumento da inibição da ligação do anticorpo à albumina nitrada adsorvida na placa, confirmando a especificidade do ensaio para nitrotirosina ligada às proteínas. A exatidão obtida para a determinação das concentrações de nitrotirosina em diluições seriadas, de padrão de albumina nitrada, foi de 98,4 %. Os coeficientes de regressão para as curvas padrão utilizadas para cada ensaio foram sempre maior que 0,98. O limite de detecção para este ensaio foi de aproximadamente 0.8 equivalentes de nitro-ALB (nM). A precisão deste ensaio foi avaliada determinando-se a variação intra e inter ensaio por comparação dos valores obtidos para o padrão de nitro-ALB em uma placa individual e entre várias placas, respectivamente. A variação intra-ensaio foi determinada pelo cálculo da média das concentrações de nitrotirosina de três curvas de calibração (cada curva com dez pontos) em cada placa. A precisão inter-ensaio foi calculada como a média das concentrações de nitrotirosina determinadas em cinco placas. As variações inter e intra-ensaio para as concentrações de nitrotirosina foram de  $3,77 \pm 1,33$  and  $5,68 \pm 2,91$  %, respectivamente.

Tabela 5 - Porcentagem de inibição da ligação do anticorpo anti-nitrotirosina a albumina nitrada adsorvida na placa, pelo plasma, e LDL de indivíduos controles (LDL<sub>c</sub>) e (LDL<sub>hc</sub>)

Amostra \ Diluição		1/2	1/4	1/6	1/8	
Plasma		76,4 ± 3,5	72,7 ± 12,7	64,6 ± 16,5	61,6 ± 4,1	45,6 ± 19,6
Plasma (ONOO <sup>-</sup> )		94,6 ± 0,2	95,1 ± 1,2	82,6 ± 2,0	80,1 ± 0,8	78,8 ± 9,3
LDL <sub>c</sub>		61,4 ± 0,9	43,2 ± 1,1	33,6 ± 3,0		17,1 ± 2,5
LDL <sub>c</sub> (ONOO <sup>-</sup> )		99,7 ± 0,4	99,6 ± 0,1	99,5 ± 0,1		99,0 ± 0,1
LDL <sub>hc</sub>		54,6 ± 5,1	25,4 ± 8,2	10,9 ± 3,4		8,0 ± 5,9
LDL <sub>hc</sub> (ONOO <sup>-</sup> )		99,7 ± 0,4	99,8 ± 0,3	99,8 ± 0,1		99,3 ± 0,1

Os resultados estão expressos com média ± desvio padrão; (ONOO<sup>-</sup>) - amostras tratadas com 1 mM de peroxinitrito

## 5.2 - Pacientes

Na tabela 6 encontra-se a idade média, sexo e pressão sanguínea dos grupos de pacientes estudados.

Tabela 6 - Idade média, sexo e pressão sanguínea dos pacientes dos grupos de hipertensos normocolesterolêmicos (H), normotensos hipercolesterolêmicos (HC) e normotensos normocolesterolêmicos (N).

	N (n = 11)	H (n = 11)	HC (n = 18)
idade	48,4 ± 7,0	57,8 ± 9,7	55,8 ± 11,1
sexo (M/F)	3/8	4/7	7/11
pressão sanguínea (mmHg)			
sistólica	119,4 ± 9,4	148,3 ± 24,8	121,3 ± 15,8
diastólica	75 ± 8,0	90,8 ± 10,2	70,9 ± 7,4

Os resultados expressam a média ± desvio padrão.

## 5.3 - Perfil lipídico, ceruloplasmina, fibrinogênio, PCR e plasminogênio

Na tabela 7, encontram-se as médias e os desvios padrão das determinações de colesterol total, triacilgliceróis e de proteínas no plasma de todos os grupos

estudados. A figura 18 mostra as diferentes concentrações de colesterol contido nas lipoproteínas.

TABELA 7 - Concentração de colesterol, triacilgliceróis e de proteína no plasma dos pacientes dos grupos de hipertensos normocolesterolêmicos (H), normotensos hipercolesterolêmicos (HC) e normotensos normocolesterolêmicos (N).

	Colesterol (mg/dL)	Triacilglicerol (mg/dL)	Proteína (mg/mL)
<b>N</b>	166,7 ± 23,6	89,0 ± 16,6	71,6 ± 2,9
<b>HC</b>	314,46 ± 76,9	118,7 ± 60,4	61,6 ± 10,5
<b>H</b>	178,4 ± 11,4	108,9 ± 29,6	77,7 ± 8,7

Os resultados expressam a média ± desvio padrão.

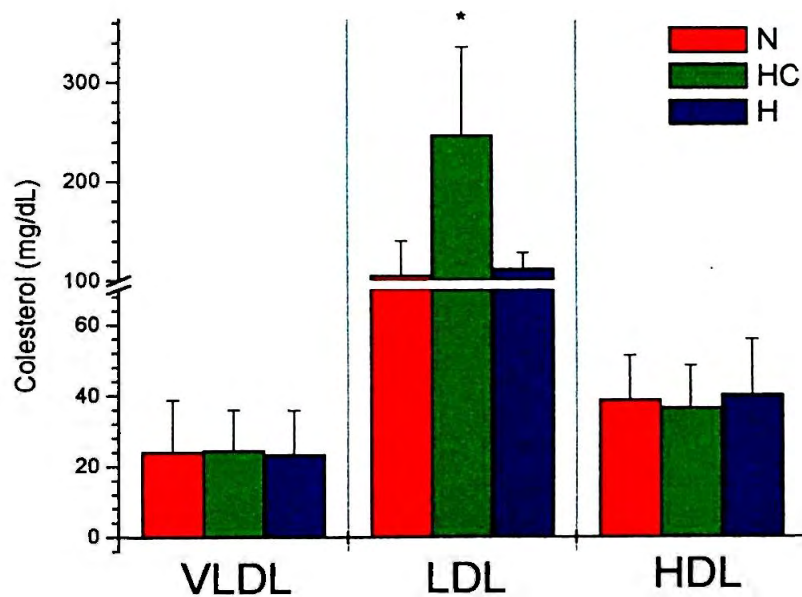


Figura 18 - Concentração de colesterol na lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), baixa densidade (LDL) e alta densidade (HDL). N = normotensos normocolesterolêmicos; HC = normotensos hipercolesterolêmicos; H = hipertensos normocolesterolêmicos; \* significativo em relação ao grupo N.

As concentrações das apolipoproteínas (AI, AII, B e E), Lpa, fibrinogênio, plasminogênio, PCR e a razão apolipoproteína B/AI estão demonstradas na tabela 8. Observamos um aumento significativo para a apolipoproteína B e para relação entre apo B e AI no plasma dos pacientes hipercolesterolêmicos, quando comparados ao grupo de normotensos normocolesterolêmicos. As concentrações plasmáticas de fibrinogênio, PCR e Lpa apresentaram uma tendência para aumento nos pacientes hipercolesterolêmicos, quando comparados aos normotensos normocolesterolêmicos. As concentrações plasmáticas de ceruloplasmina foram significativamente maiores no grupo hipercolesterolêmico normotenso, comparados aos normotensos normocolesterolêmicos.

TABELA 8 - Concentração das apolipoproteínas (AI, AII, B e E), Lpa, ceruloplasmina, fibrinogênio plasminogênio e proteína C reativa (PCR) no plasma dos pacientes dos grupos de hipertensos normocolesterolêmicos (H), normotensos hipercolesterolêmicos (HC) e normotensos normocolesterolêmicos (N).

	N	H	HC
Apo AI (mg/dL)	147,7 ± 22,3	137,7 ± 24,4	142,9 ± 26,3
Apo AII (mg/dL)	29,0 ± 4,5	32,2 ± 5,4	32,2 ± 4,8
Apo B (mg/dL)	84,8 ± 15,1	96,6 ± 20,9	152,8 ± 34,1*
Apo E (mg/dL)	4,20 ± 1,32	4,00 ± 1,10	4,64 ± 1,15
Apo B/Apo AI	0,60 ± 0,17	0,72 ± 0,21	1,12 ± 0,39*
Lpa (mg/dL)	22,1 ± 13,5	17,6 ± 13,9	24,4 ± 22,9
Fibrinogênio (mg/dL)	235,4 ± 43,0	230,7 ± 27,8	254,2 ± 45,9
Plasminogênio (mg/dL)	13,6 ± 1,8	13,2 ± 1,4	12,2 ± 1,8
Ceruloplasmina (g/L)	0,38 ± 0,13	0,40 ± 0,07	0,49 ± 0,13*
PCR (mg/dL)	0,24 ± 0,16	0,23 ± 0,16	0,30 ± 0,28

Os resultados expressam a média ± desvio padrão. \* significativo em relação ao grupo normotensos normocolesterolêmicos (N).

#### 5.4 – Antioxidantes

A concentração plasmática de ascorbato foi menor nos grupos de hipertensos normocolesterolêmicos (H) e normotensos hipercolesterolêmicos (HC), quando comparados ao grupo normotenso normocolesterolêmico (N) (figura 19-A), assim como, a concentração plasmática de urato nos grupos de hipertensos normocolesterolêmicos (H) e normotensos hipercolesterolêmicos (HC), quando comparados ao grupo normotenso normocolesterolêmico (N) (figura 19-B). Nos 3 grupos de pacientes não houve diferença nas concentrações plasmáticas dos antioxidantes lipossolúveis, quando estas foram expressas em  $\mu\text{M}$  (figura 20 -A). Porém, quando estas concentrações foram expressas em mmol/mg de colesterol observou-se uma diminuição significativa para o  $\alpha$ -tocoferol nos pacientes normotensos hipercolesterolêmicos (HC), para o licopeno nos pacientes hipertensos normocolesterolêmicos (H) e normotensos hipercolesterolêmicos (HC), assim como, para o  $\beta$ -caroteno nos pacientes hipertensos normocolesterolêmicos (H), quando comparados ao grupo normotenso normocolesterolêmico (N) (figura 20-B).



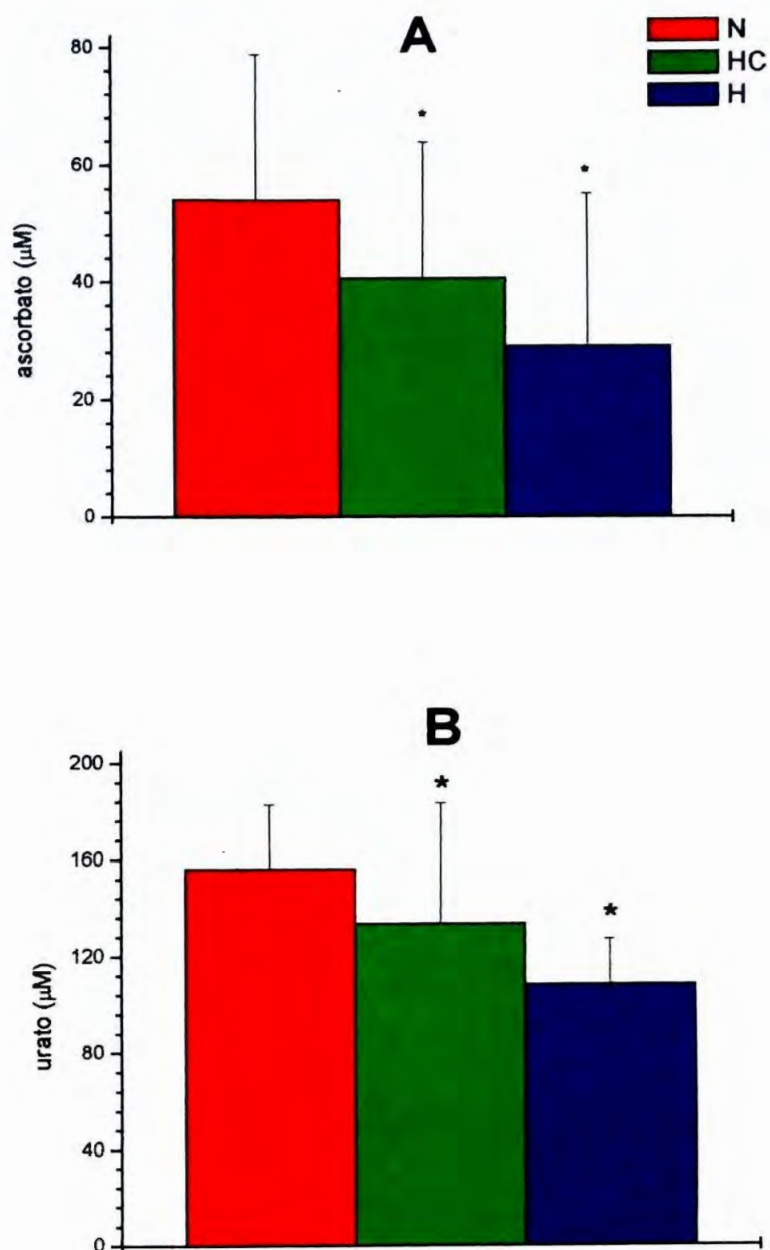


Figura 19 - Concentração plasmática de ascorbato (A) e de urato (B) nos pacientes dos grupos normotenso normocolesterolêmico (N), normotenso hipercolesterolêmico (HC) e hipertenso normocolesterolêmico (H). \* significativo em relação ao grupo N.



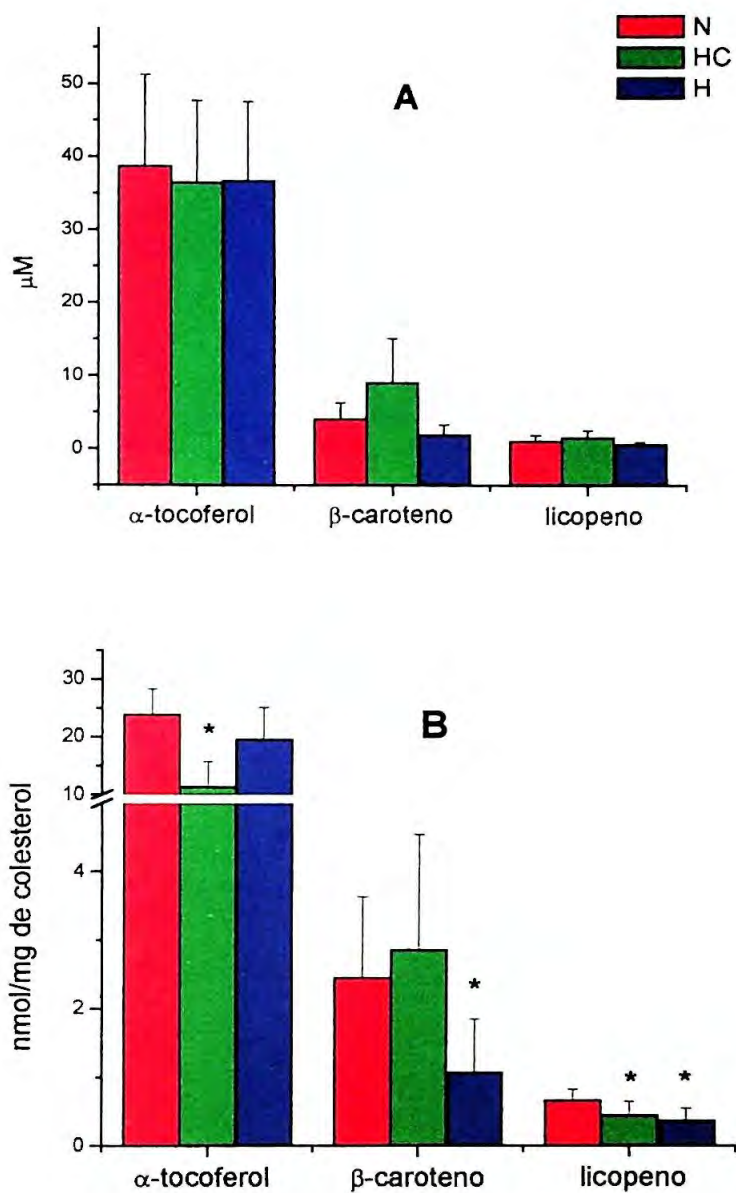


Figura 20 - Concentrações plasmáticas dos antioxidantes lipossolúveis, expressos em  $\mu\text{M}$  (A) e corrigidos pelo conteúdo de colesterol plasmático (nmol/ mg de colesterol) (B), nos pacientes dos grupos normotenso normocolesterolêmico (N), normotenso hipercolesterolêmico (HC) e hipertenso normocolesterolêmico (H) \* significativo em relação ao grupo N.

---

Observou-se uma diminuição significativa da concentração de  $\alpha$ -tocoferol nos pacientes dos grupos de hipertensos normocolesterolêmicos (H) e normotensos hipercolesterolêmicos (HC) (21A) para todas as lipoproteínas, para o  $\beta$ -caroteno na LDL e na HDL (21B) e para o licopeno somente na LDL (21C), quando comparados ao grupo normotenso normocolesterolêmico (N).

As concentrações plasmáticas de paraoxonase estão demonstradas na figura 22. Podemos observar uma diminuição significativa desta nos pacientes hipercolesterolêmicos normotensos, quando comparados aos pacientes normolipidêmicos normotensos.

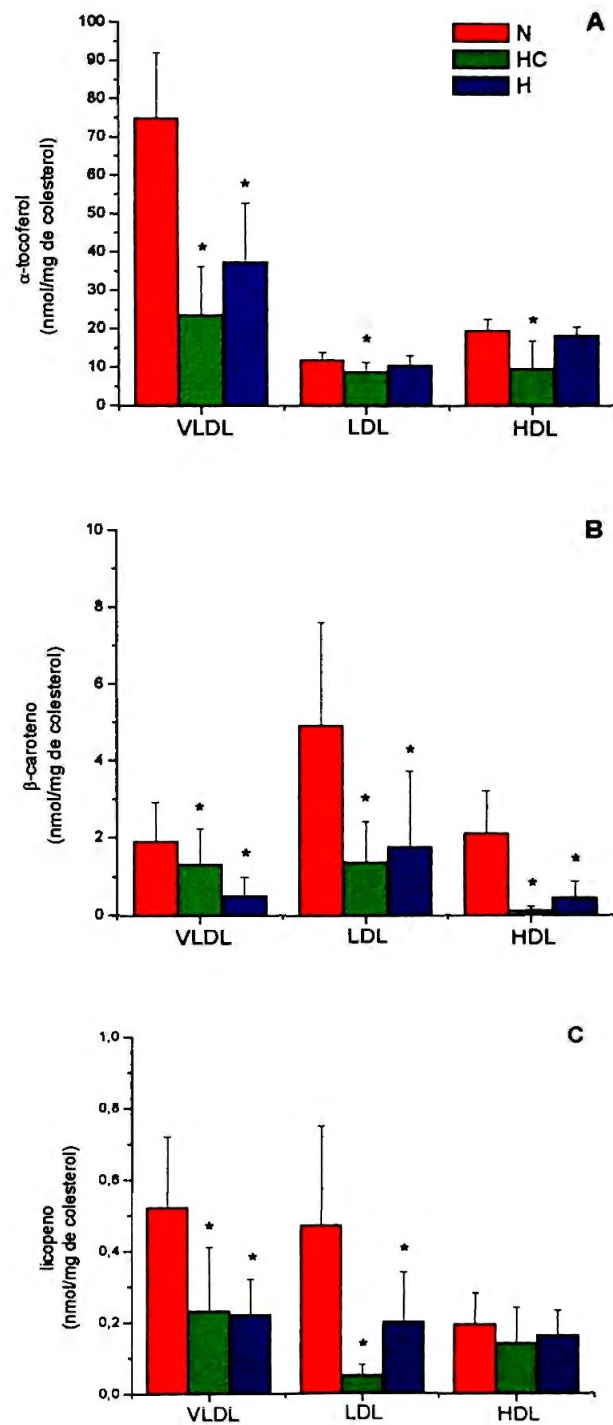


Figura 21 - Conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol (A),  $\beta$ -caroteno (B) e licopeno (C) na VLDL, LDL e HDL corrigidos pelo conteúdo de colesterol de cada partícula (nmol/ mg de colesterol) nos pacientes dos grupos normotenso normocolesterolêmico (N), normotenso hipercolesterolêmico (HC) e hipertenso normocolesterolêmico (H).\* significativo em relação ao grupo N.

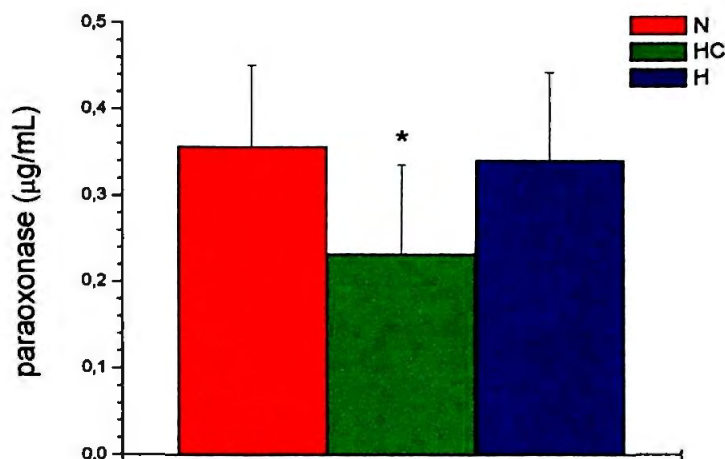


Figura 22 – Concentração plasmática de paraoxonase nos pacientes dos grupos normotenso normocolesterolêmico (N), normotenso hipercolesterolêmico (HC) e hipertenso normocolesterolêmico (H) \* significativo em relação ao grupo N.

#### 5.5- Hidroxi/hidroperóxidos lipídicos, lag time, óxidos de colesterol e isoprostanos

As concentrações plasmáticas dos hidroxi/hidroperóxidos de ésteres de colesterol (CE-OOH) e de triacilglicerol (TL-OOH) foram elevadas nos pacientes HC e H quando comparados com o grupo N. Para os hidroxi/hidroperóxidos de fosfolípidos (PL-OOH) esta diferença não foi observada (figura 23).

Em relação a oxidabilidade da fração pesada da LDL, obteve-se uma diminuição significativa nos valores de lag time e peak time nos pacientes HC e H, quando comparados com o grupo N (figura 24). Os valores de log rate e de lag rate não apresentaram diferenças entre os grupos estudados.

As concentrações de isoprostanos no plasma dos grupos estudados estão demonstrados na figura 25. Não se observou nenhuma diferença significativa entre os grupos.

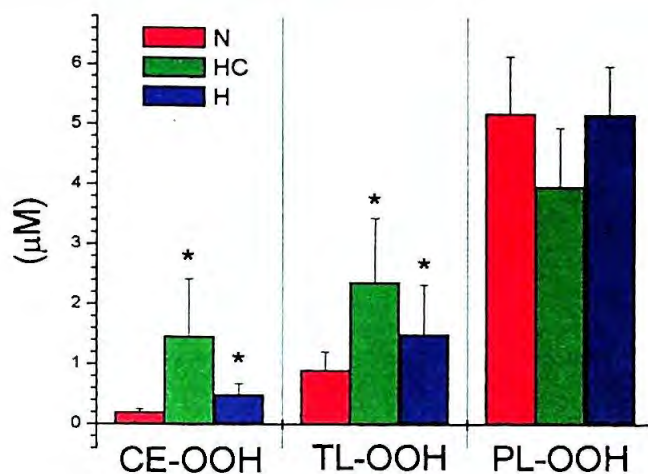


Figura 23 - Concentrações plasmáticas dos hidroxil/hidroperóxidos de éster de colesterol (CE-OOH), de triacilglicerol (TL-OOH) e de fosfolípidos (PL-OOH) nos pacientes dos grupos normotenso normocolesterolêmicos (N), normotenso hipercolesterolêmico (HC), hipertenso normocolesterolêmicos (H). \* significativo em relação ao grupo N.

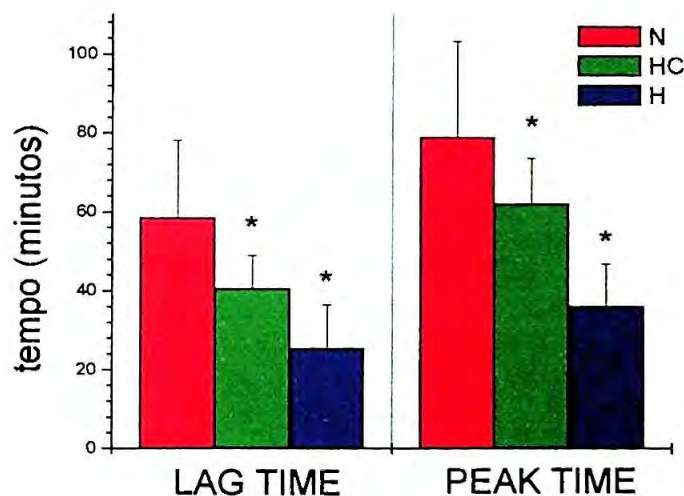


Figura 24 - Oxidabilidade da LDL pesada, expressa como lag time e peak time, nos pacientes dos grupos normotenso normocolesterolêmico (N), normotenso hipercolesterolêmico (HC) e hipertenso normocolesterolêmico (H). \* significativo em relação ao grupo N.



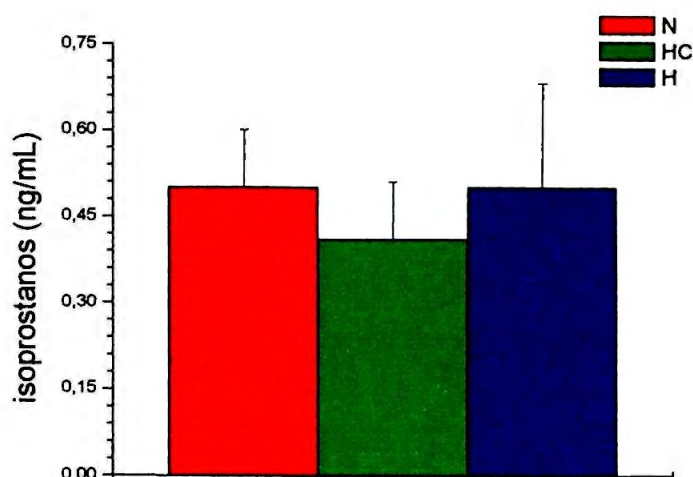


Figura 25 – Concentração plasmática de isoprostanos nos pacientes dos grupos normotenso normocolesterolêmico (N), normotenso hipercolesterolêmico (HC) e hipertenso normocolesterolêmico (H).

Observamos um aumento significativo na concentração de  $7\beta$ -hidroxicolesterol, colesteril- $\alpha$ -epóxido e colestano- $3\beta$ ,  $5\alpha,6\beta$ -triol no plasma dos pacientes hipercolesterolêmicos, quando comparados aos indivíduos normolipidêmicos (Figura 26 A e B). Na LDL, a concentração de colesteril- $\alpha$ -epóxido e colestano- $3\beta$ ,  $5\alpha,6\beta$ -triol foi significativamente maior nos dois grupos de pacientes, quando comparados ao grupo normotenso e normocolesterolêmico. A concentração do colesteril- $\beta$ -epóxido foi significativamente maior no grupo hipercolesterolêmico, quando comparado ao grupo normotenso e normocolesterolêmico, tanto na HDL como na LDL (figura 27A e B). O grafico 28 mostra a concentração total de óxidos de colesterol na LDL e na HDL dos diferentes grupos estudados. Podemos observar que a concentração de óxidos de colesterol é maior no grupo hipercolesterolemico, tanto na LDL quanto na HDL.



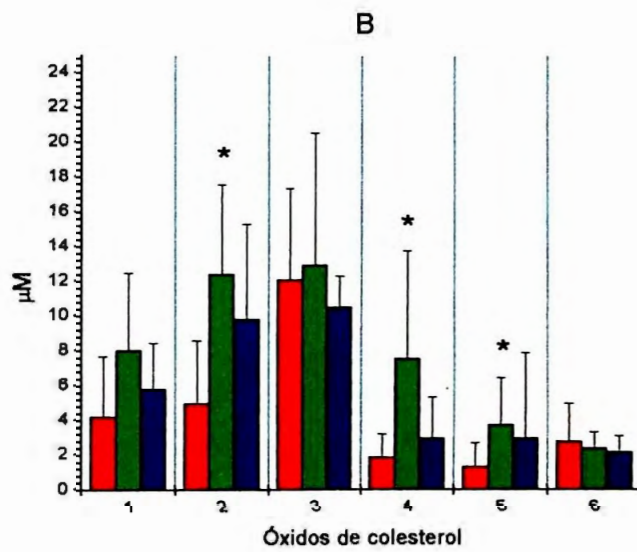
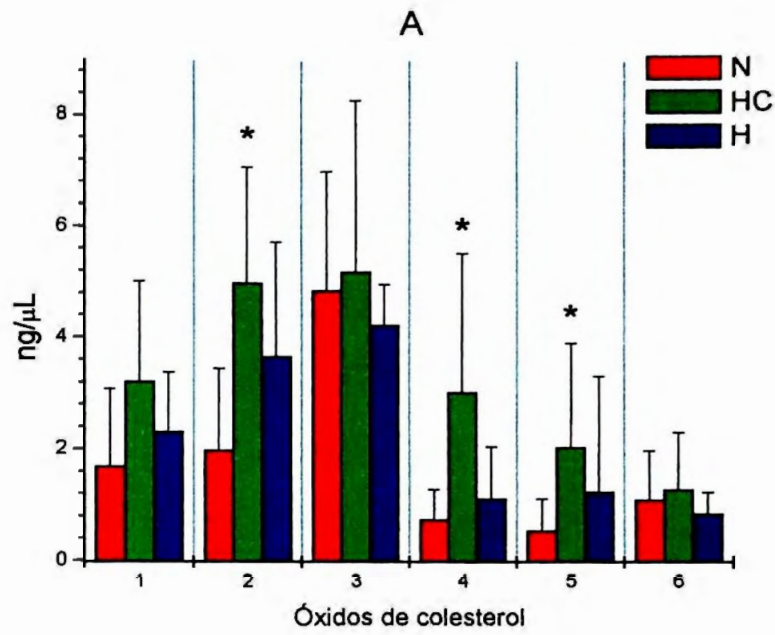


Figura 26 - Concentração plasmática dos óxidos de colesterol representados em ng/μL (A) e em μM (B) dos pacientes dos grupos hipercolesterolêmicos (HC), hipertensos (H) e normotensos normocolesterolêmicos (N). 1- 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol; 2 - 7 $\beta$ -hidroxicolesterol; 3 - Colesteril- $\beta$ -epóxido; 4 - Colesteril- $\alpha$ -epóxido; 5 - Colestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol e; 6 - 7-cetocolesterol. \* - significativo em relação ao grupo normocolesterolêmico normotenso.

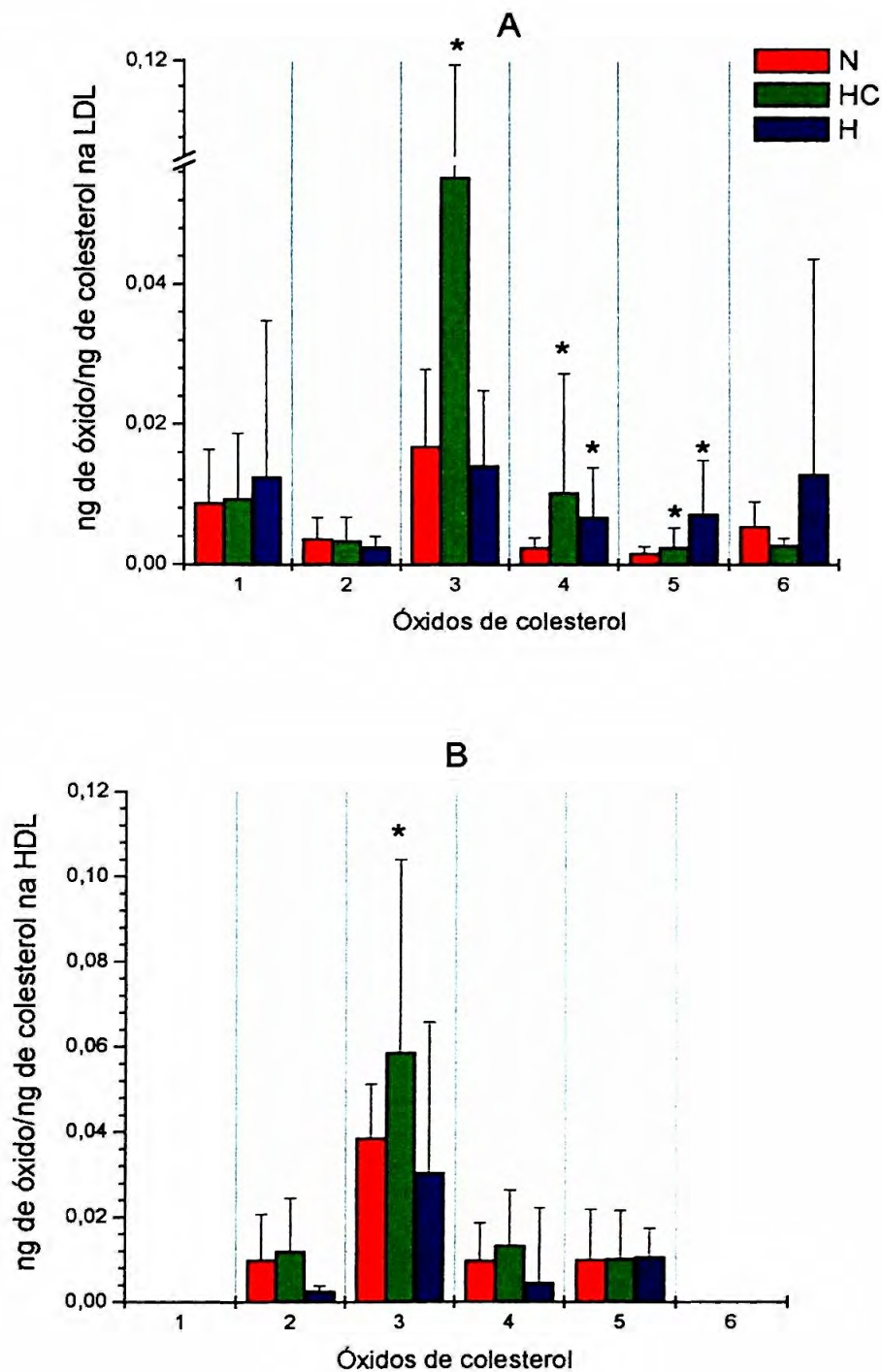


Figura 27 - Concentração dos óxidos de colesterol na LDL (A) e na HDL (B) dos pacientes dos grupos hipercolesterolêmico (HC), hipertenso (H) e normotenso normocolesterolêmico (N). 1- 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol; 2 - 7 $\beta$ -hidroxicolesterol; 3 - Colesteril- $\beta$ -epóxido; 4 - Colesteril- $\alpha$ -epóxido; 5 - Colestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol e; 6 - 7-cetocolesterol. \* - significativo em relação ao grupo normocolesterolêmico normotenso.

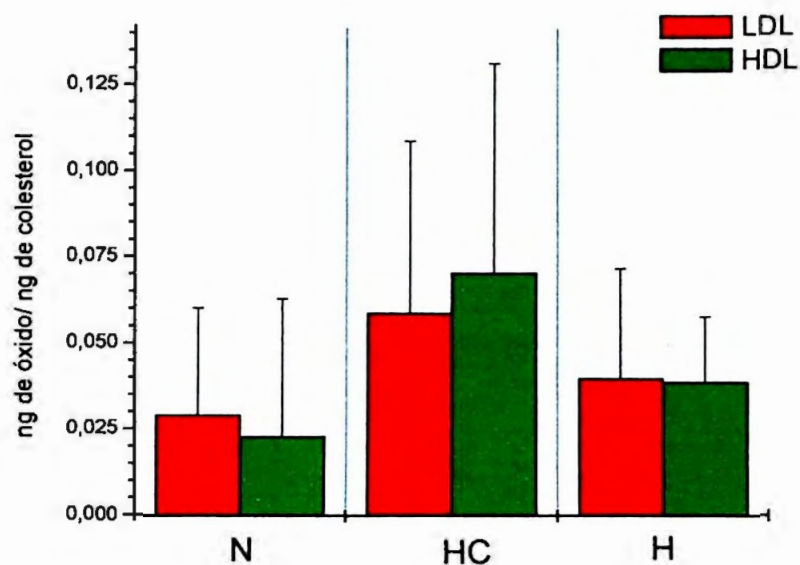


Figura 28 - Concentração dos óxidos de colesterol totais presentes na LDL na HDL dos pacientes dos grupos hipercolesterolêmico (HC), hipertenso (H) e normotenso normocolesterolêmico (N).

### 5.6 – Relaxamento dependente do endotélio e endotelina

A figura 29 mostra a espessura medial intimal da artéria carótida comum (direita e esquerda) e da artéria braquial. Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos, porém, houve uma tendência para espessuras maiores da artéria carótida comum nos pacientes hipertenso normocolesterolêmicos (H).



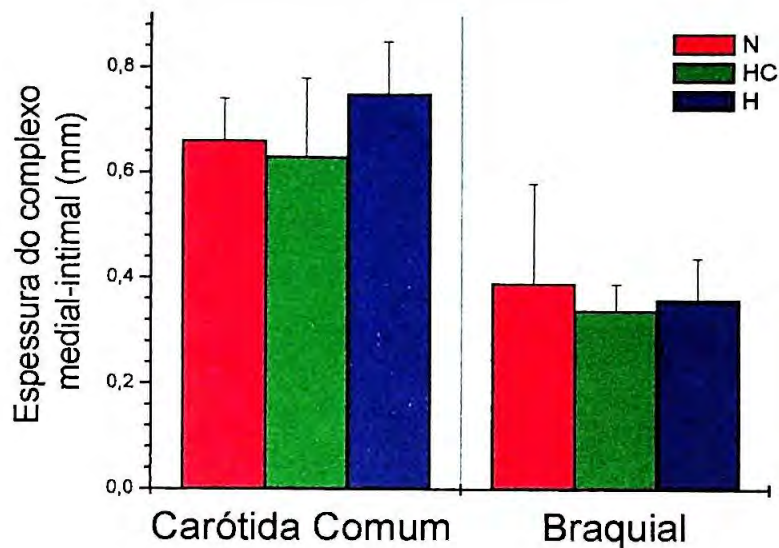


Figura 29 - Espessura do complexo medial-intimal das artérias carótidas comum direita e esquerda (representados conjuntamente) e da artéria braquial nos pacientes dos grupos normotenso normocolesterolêmico (N), normotenso hipercolesterolêmicos (HC) e hipertensos normocolesterolêmico (H).

A porcentagem de aumento do diâmetro da artéria braquial, após hiperemia reativa (determinações realizadas dez e noventa segundos após descompressão), foi menor nos grupos de hipertensos normocolesterolêmicos (H) e normotensos hipercolesterolêmicos (HC), quando comparados ao grupo normotenso normocolesterolêmico (N) (figura 30 A). A diminuição da porcentagem de aumento do diâmetro da artéria braquial foi observada, tanto em dez segundos como em noventa segundos após a descompressão. Aos noventa segundos após a descompressão, os valores de porcentagem de aumento foram maiores para todos os grupos, o que seria esperado, uma vez que o relaxamento máximo dependente do endotélio após a hiperemia é observado neste tempo.

Um aumento do fluxo sanguíneo, determinado após dez segundos de descompressão, foi observado para todos os grupos quando este foi expresso em termos absolutos. Este aumento do fluxo foi significativamente menor nos grupos de hipertensos normocolesterolêmicos (H) e normotensos hipercolesterolêmicos (HC), quando comparados ao grupo normotenso normocolesterolêmico (N) (figura 30B). Porém, quando representamos estes valores em porcentagem de aumento do fluxo após

---

a hiperemia reativa, não observamos nenhuma diferença significativa entre os grupos ( $201,3 \pm 80,9 \%$ ,  $237,09 \pm 200,0 \%$ , e  $150,0 \pm 41,3 \%$ , respectivamente).

Placas ateroscleróticas no bulbo das artérias carótida comum direita ou esquerda foram encontradas somente no grupo normotenso hipercolesterolêmico (22,22 % - 4 pacientes). A figura 31 mostra uma placa aterosclerótica no bulbo da artéria carótida comum, observada por ultrassonografia.

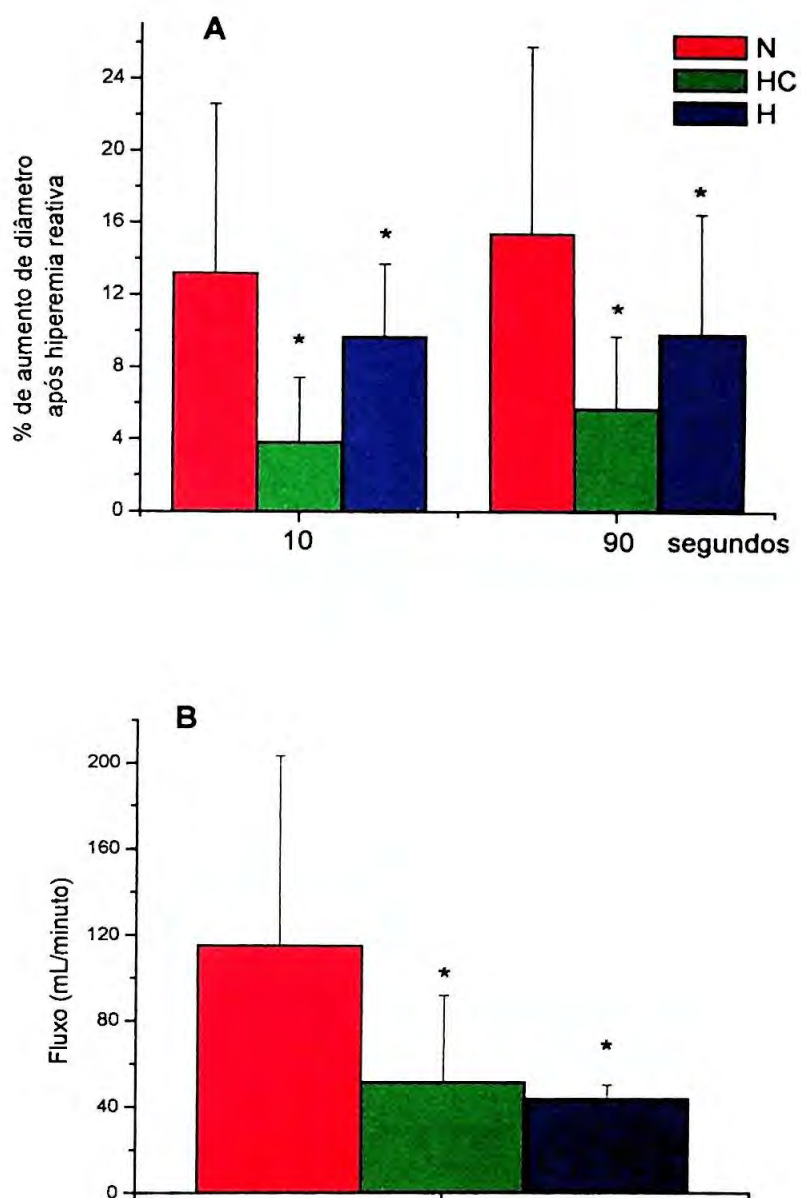


Figura 30 - Porcentagem de aumento do diâmetro da artéria braquial após hiperemia reativa, determinado dez e noventa segundos após descompressão (A) e variação do fluxo sanguínea na artéria braquial após hiperemia reativa. N = normotenso normocolesterolêmico; HC = normotenso hipercolesterolêmico; H = hipertenso normocolesterolêmico; \* significativo em relação ao grupo N.



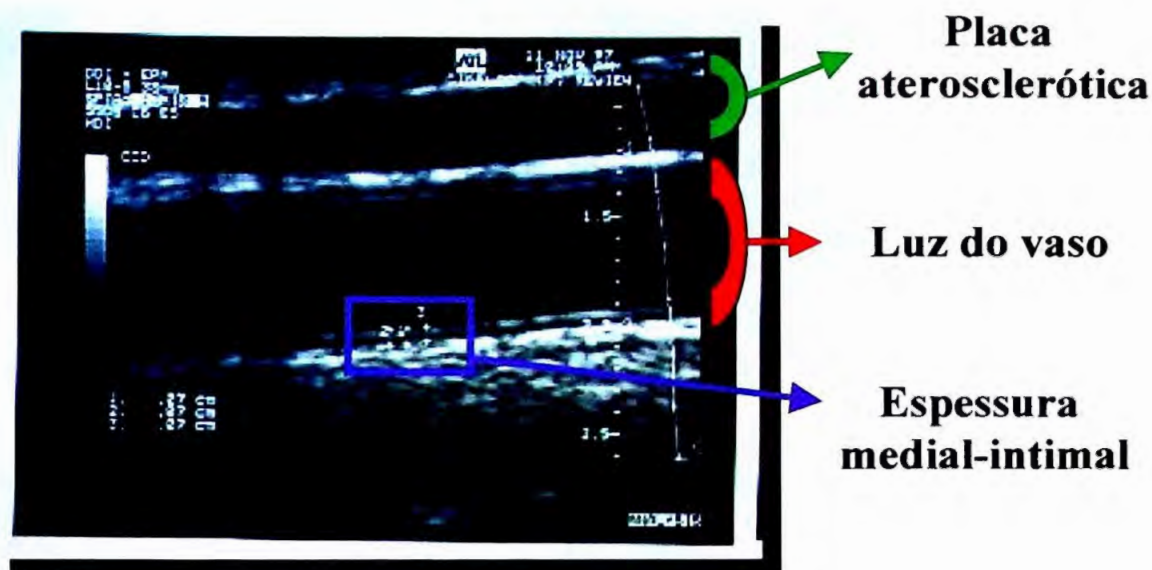


Figura 31 - Placa de aterosclerose visualizada por ultrasonografia no bulbo da artéria carótida comum direita

As concentrações plasmáticas de endotelina foram significativamente maiores nos pacientes hipertensos normocolesterolêmicos (H) e normotensos hiperlipidêmicos (HC), quando comparados com o grupo normotenso normolipidêmico (N) (figura 32). As concentrações de endotelina plasmática foram 21% e 25% mais elevadas nos grupos H e HC, quando comparados com N.

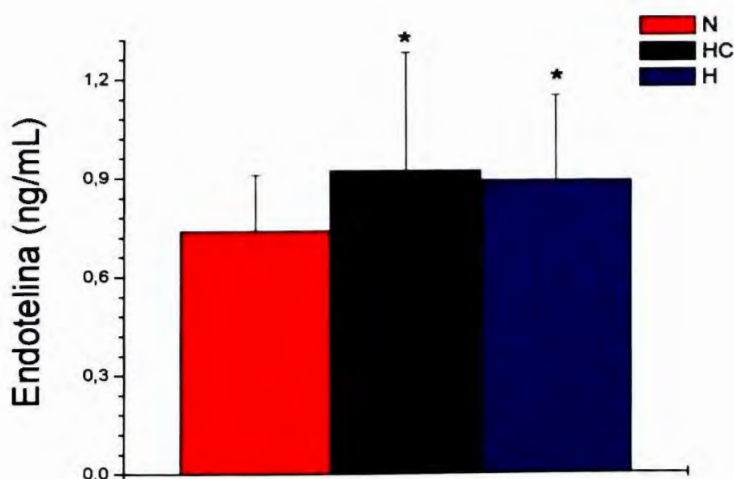


Figura 32 – Concentração plasmática de endotelina nos pacientes dos grupos normotenso normocolesterolêmico (N), normotenso hipercolesterolêmico (HC) e hipertenso normocolesterolêmico (H). \* significativo em relação ao grupo N.

### 5.7 – Nitrato, Nitrito, nitrotirosina e S-nitrosotióis

As concentrações plasmáticas de nitrato nos grupos N, HC e H estão demonstradas na figura 33.

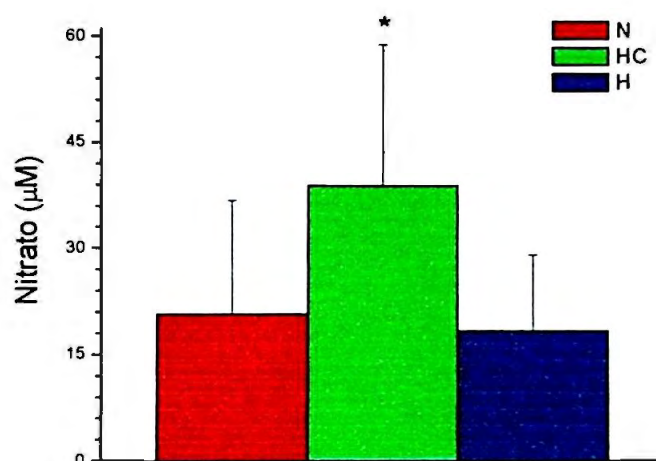


Figura 33 - As concentrações plasmáticas de nitrato nos pacientes dos grupos normotenso normocolesterolêmico (N), normotenso hipercolesterolêmico (HC) e hipertenso normocolesterolêmico (H). \* significativo em relação ao grupo N.

As concentrações plasmáticas de nitrotirosina foram determinadas pelo ensaio ELISA competitivo descrito anteriormente (Tabela 9).

TABELA 9 - Concentração plasmática de nitrotirosina dos pacientes dos grupos de hipertensos normocolesterolêmicos (H), normotensos hipercolesterolêmicos (HC) e normotensos normocolesterolêmicos (N)

	(equivalentes de nitro ALB (nM))
N	40,2 ± 2,0
HC	40,9 ± 2,6
H	44,4 ± 2,2

Os resultados expressam a média ± desvio padrão.

Observamos um aumento significativo na concentração de nitrotirosina na LDL dos pacientes hipercolesterolêmicos quando comparados aos pacientes controles (Figura 34).

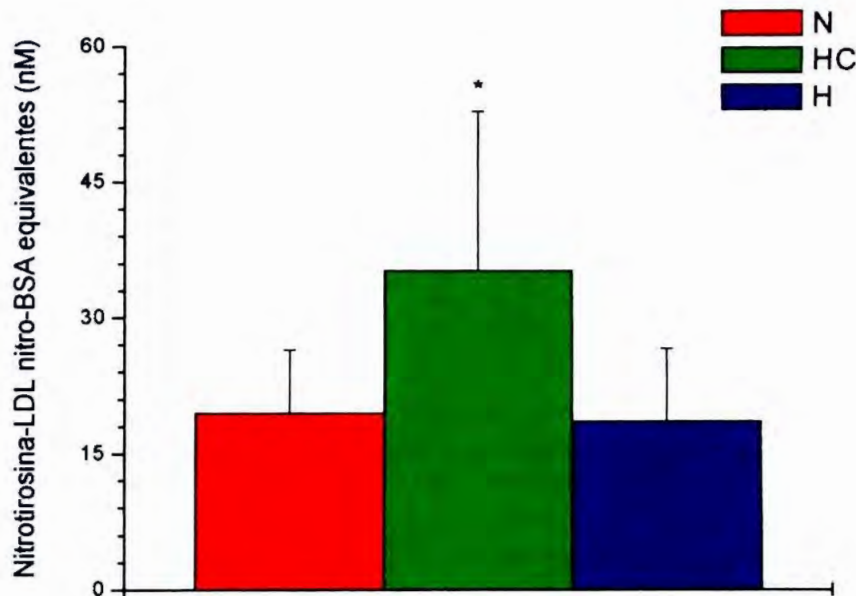


Figura 34 - Concentração de nitrotirosina na LDL (equivalentes de nitro ALB (nM)) dos pacientes dos grupos hipercolesterolêmicos (HC), hipertensos (H) e normotensos normocolesterolêmicos (N) determinados. \* significativo em relação ao grupo controle

As análises de western blotting confirmaram a nitração das proteínas do plasma. A figura 35 mostra um exemplo de um imunoblot obtido com uma das amostras de plasma e do padrão (nitroBSA), utilizando-se o anticorpo policlonal anti-nitrotirosina. A maior banda de proteína que podemos observar tem como massa molecular 68 kDa, a mesma da albumina. Duas bandas menores podem ser visualizadas, uma com massa molecular na região de massa > 94 kDa e outra em 34 kDa. Porém, só foi possível obter-se os valores de densidade óptica realizada só para o pico correspondente à massa molecular de 68 kDa, como demonstrado na figura 36.

Não houve diferenças significativas entre a concentração de nitrotirosina presente na albumina do plasma, entre os grupos estudados (figura 37).



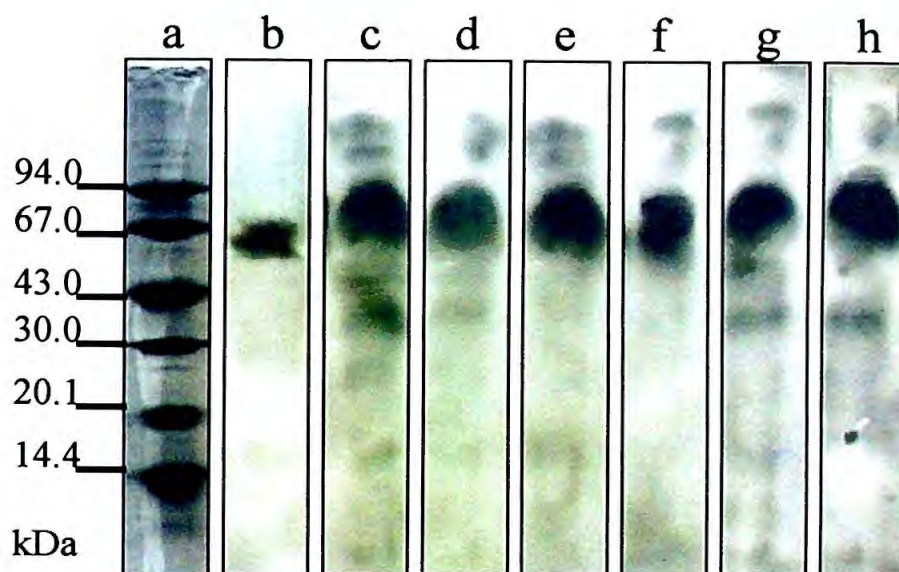


Figura 35 - Proteínas nitradas no plasma de pacientes normotensos e hipertensos visualizadas por western blotting. As proteínas nitradas presentes no plasma foram detectadas em amostras de pacientes normotensos e hipertensos por western blotting com anticorpo policlonal anti-nitrotirosina, como descrito na metodologia. (a) padrão de peso molecular; (b) nitro-BSA, 1  $\mu\text{g}$ ; (c, d e e) plasma de pacientes normotensos, 80  $\mu\text{g}$ ; e (f, g and h) plasma de pacientes hipertensos, 80  $\mu\text{g}$ . Nitro-BSA contém 61,2  $\mu\text{mol/L}$ .

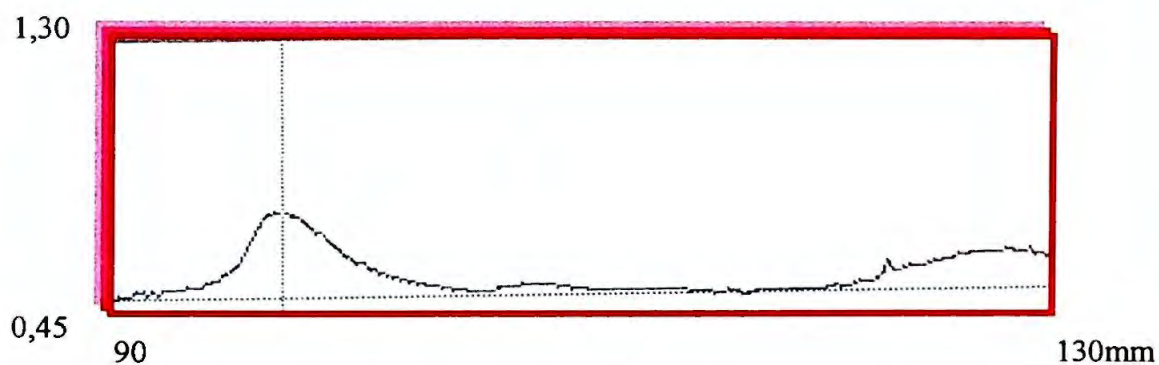


Figura 36 - Densitometria de uma amostra de plasma de paciente hipertenso (*lane f* da figura X). O pico de absorção corresponde à banda mais intensamente corada do imunoblotting. O eixo y corresponde à extensão da *lane f* analisada e o eixo x, a densidade da banda. As concentrações são determinadas pela área do pico. Neste caso a área foi igual a 8,594 unidades arbitrárias.

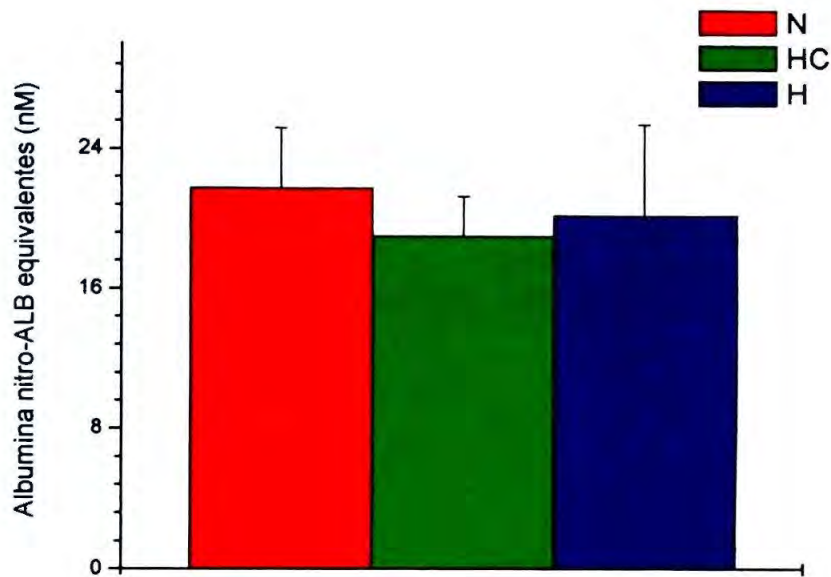


Figura 37 - Concentração de nitrotirosina na albumina (equivalentes de nitro ALB, nM) dos pacientes dos grupos hipercolesterolêmico (HC), hipertenso (H) e normotenso normocolesterolêmico (N).

As concentrações de nitrito e de nitrosotíóis estão demonstradas na figura 38. As concentrações de nitrosotíóis foram maiores nos pacientes hipercolesterolêmicos normotensos, quando comparados com os pacientes normocolesterolêmicos normotensos. Não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações plasmáticas de nitrito entre os grupos. As concentrações de nitrito do hemolisado não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (figura 39).

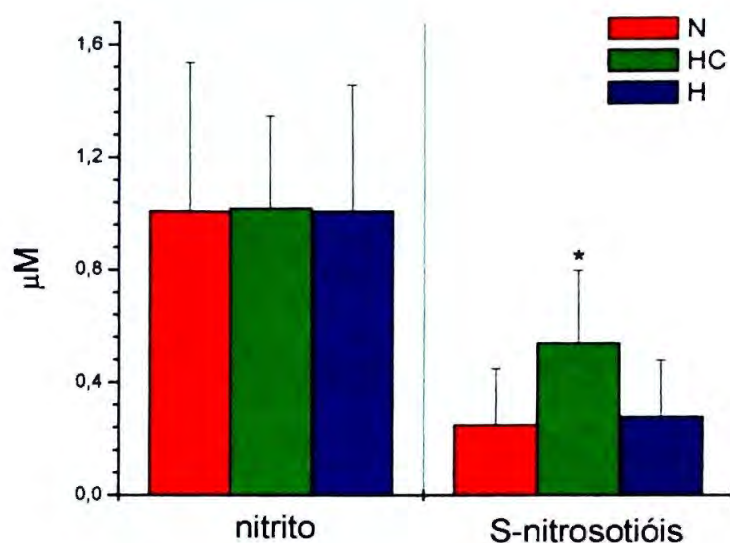


Figura 38 – Concentração plasmática de nitrito e S-nitrosotióis nos pacientes dos grupos normotenso normocolesterolêmico (N), normotenso hipercolesterolêmico (HC) e hipertenso normocolesterolêmico (H). \* significativo em relação ao grupo N.

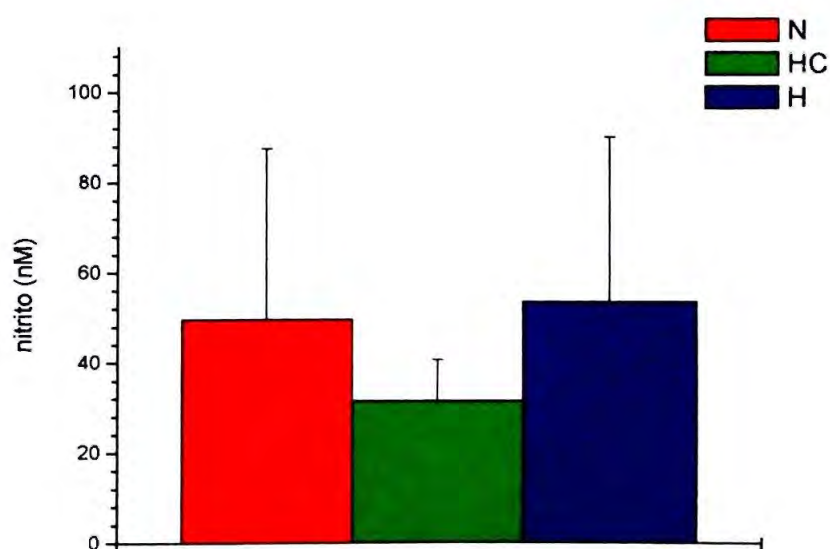


Figura 39 – Concentração de nitrito no hemolisado dos eritrócitos no pacientes dos grupos normotenso normocolesterolêmico (N), normotenso hipercolesterolêmico (HC) e hipertenso normocolesterolêmico (H).



## 5.8 - Correlações

As tabelas de 10 a 16 mostram as correlações observadas entre as variáveis analisadas

TABELA 10 – Correlações

	CE-OOH ( $\mu\text{M}$ )	TL-OOH ( $\mu\text{M}$ )
Colesterol total (mg/dL)	$r = 0,51, p = 0,0005$	$r = 0,49, p = 0,0015$
LDL colesterol (mg/dL)	$r = 0,51, p < 0,0007$	$r = 0,46, p = 0,0026$
apoproteína B (mg/dL)	$r = 0,37, p = 0,0152$	$r = 0,41, p = 0,0086$
apoproteína B/AI	x	$r = 0,31, p = 0,0464$
Lpa (mg/dL)	$r = 0,59, p < 0,0001$	x
nitrito ( $\mu\text{M}$ )	$r = 0,53, p = 0,0002$	$r = 0,39, p = 0,0117$

TABELA 11 – Correlações

	$\alpha$ -tocoferol (nmol/mg de colesterol)	Licopeno (nmol/mg de colesterol)
LAG TIME	$r = 0,42, p = 0,0050$	$r = 0,41, p = 0,0066$
Colesterol (mg/dL)	$r = -0,59, p < 0,0001$	X
LDL colesterol (mg/dL)	$r = -0,58, p < 0,0001$	X
apo B (mg/dL)	$r = -0,55, p = 0,0001$	X
paraoxonase (mg/dL)	$r = 0,67, p = 0,0004$	$r = 0,41, p = 0,0480$
% RDE 15 seg.	$r = 0,32, p = 0,0363$	X
90 seg.	$r = 0,37, p = 0,0190$	
Licopeno (nmol/mg de colesterol)	$r = 0,53, p = 0,0002$	X
nitrito ( $\mu\text{M}$ )	$r = -0,45, p = 0,0026$	
CE-OOH ( $\mu\text{M}$ )	$r = -0,43, p = 0,0044$	X

RDE = relaxamento dependente do endotélio expresso em valores absolutos de fluxo sanguíneo; PL-OOH = hidroxi/hidroperóxido de fosfolípides.

TABELA 12 – Correlações

	Colesterol total (mg/dL)	LDL colesterol (mg/dL)	HDL colesterol (mg/dL)
LDL colesterol (mg/dL)	$r = 0,99, p < 0,0001$	x	$r = -0,38, p = 0,0011$
HDL colesterol (mg/dL)	$r = -0,32, p = 0,0333$	$r = -0,38, p = 0,0011$	x
apoproteína AI (mg/dL)	X	X	$r = 0,48, p = 0,0011$
apoproteína AII (mg/dL)	X	X	$r = 0,70, p < 0,0001$
apoproteína B (mg/dL)	$r = 0,82, p < 0,0001$	$r = 0,80, p < 0,0001$	$r = -0,43, p = 0,0037$
apoproteína E (mg/dL)	$r = 0,49, p = 0,0011$	$r = 0,48, p = 0,0016$	$r = -0,43, p = 0,0047$
apoproteína B/AI	$r = 0,71, p < 0,0001$	$r = 0,70, p < 0,0001$	$r = -0,51, p = 0,0005$

TABELA13 – Correlações

	Fibrinogênio (mg/dL)	Nitrato (μM)	% aumento do diâmetro
Colesterol total (mg/dL)	$r = 0,43, p = 0,0046$	$r = 0,62, p < 0,0001$	$r = -0,40, p = 0,0090^a$
LDL colesterol (mg/dL)	$r = 0,47, p = 0,0019$	$r = 0,62, p < 0,0001$	$r = -0,43, p = 0,0057^a$
apo B (mg/dL)	$r = 0,51, p = 0,0006$	$r = 0,60, p < 0,0001$	$r = -0,30, p = 0,0500^a$
apo B/A1	$r = 0,48, p = 0,0013$	$r = 0,50, p = 0,0042$	X
apo E (mg/dL)	$r = 0,55, p = 0,0002$	X	X
Lpa (mg/dL)	X	$r = 0,31, p = 0,0429$	X
nitrato (μM)	$r = 0,40, p = 0,0087$	X	X
Lag time (minutos)	X	X	$r = 0,42, p = 0,0077^b$

<sup>a</sup> = % aumento do diâmetro da artéria braquial em resposta a hiperemia reativa quinze segundos após descompressão e <sup>b</sup> = % aumento do diâmetro da artéria braquial em resposta a hiperemia reativa noventa segundos após descompressão.

TABELA 14 – Correlações

	S-nitrosotiol ( $\mu\text{M}$ )	Ceruloplasmina (g/L)
Colesterol total (mg/dL)	$r = 0.54,$ $p < 0.0050$	X
LDL colesterol. (mg/dL)	$r = 0.47,$ $p < 0.0100$	X
Apo B (mg/dL)	$r = 0.52,$ $p < 0.0050$	$r = 0.41,$ $p < 0.0500$
Apo E (mg/dL)	X	$r = 0.464,$ $p < 0.0500$

TABELA 15 - Correlações

		Nitrotirosina-LDL nitroBSA equivalentes (nM)
Colesterol total (mg/dL)	r	0,49
	p	0,0311
LDL colesterol (mg/dL)	r	0,52
	p	0,0212
Apo B (mg/dL)	r	0,57
	p	0,0111
CE-OOH ( $\mu\text{M}$ )	r	0,57
	p	0,0115
Nitrato ( $\mu\text{M}$ )	r	0,55
	p	0,0141

TABELA 16 - Correlações

		7 $\alpha$ - hidroxicoleste rol ( $\mu$ M)	Colesteril- $\alpha$ -epóxido ( $\mu$ M)	Óxidos de colesterol na LDL  (ng de óxido/ng de col.)
7 $\beta$ -hidroxicolesterol ( $\mu$ M)	r	0,51		
	p	0,0070		
Colesteril- $\alpha$ -epóxido ( $\mu$ M)	r	0,70		
	p	0,0001		
Colestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol ( $\mu$ M)	r		0,53	
	p		0,0121	
7-cetocolesterol ( $\mu$ M)	r	0,56		
	p	0,0061		
Nitrato ( $\mu$ M)	r		0,48	
	p		0,0178	
CE-OOH ( $\mu$ M)	r		0,43	0,53
	p		0,0390	0,0030
Colesterol (mg/dL)	r	0,42	0,58	
	p	0,0271	0,0030	
LDL colesterol (mg/dL)	r	0,39	0,60	
	p	0,0462	0,0020	
Lpa (mg/dL)	r			0,52
	p			0,0041
$\alpha$ -tocoferol (nmol/mg de colesterol)	r	-0,39	-0,40	
	p	0,0441	0,0492	

Col. = colesterol.



## ***6. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES***

---

## 6.1 – Discussão

A hipertensão e a hipercolesterolemia são fatores de risco importantes para a aterosclerose, que ainda é a principal causa de morte nos países industrializados. Apesar de estar bem estabelecido que a alta concentração de colesterol total e da LDL é um dos principais fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da aterosclerose, os mecanismos relacionados ao desenvolvimento e à progressão da aterosclerose não estão totalmente esclarecidos. Nos últimos anos, várias evidências experimentais têm mostrado que a modificação oxidativa da LDL e de outras lipoproteínas é uma etapa crucial na patogênese da aterosclerose (Esterbauer e cols., 1992, Witzum e Steinberg, 1991, Berliner e cols., 1995 e Lynch e Frei, 1994). Dessa forma, é de extrema importância avaliar-se não apenas o perfil lipídico dos indivíduos, mas também determinar a oxidação das lipoproteínas, as concentrações dos antioxidantes e as possíveis alterações da função endotelial, o que pode contribuir para uma avaliação mais completa do risco para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose, utilizando-se materiais biológicos de fácil obtenção, como o plasma, e métodos não invasivos na avaliação da função endotelial.

Neste trabalho, além do lipidograma normalmente avaliado como marcador de alterações no metabolismo dos lipídeos, foram determinadas as concentrações das apolipoproteínas e Lpa para uma melhor caracterização das lipoproteínas no plasma dos pacientes. Como seria esperado, houve um aumento de colesterol total, LDL colesterol e apo B nos pacientes hipercolesterolêmicos.

Alguns marcadores de inflamação, como por exemplo, proteína C-reativa (PCR) e fibrinogênio foram também determinados, uma vez que alguns trabalhos sugerem que o processo inflamatório presente nas artérias pode estar intimamente envolvido no desenvolvimento da aterosclerose (revisado por Van Lente, 2000). Neste trabalho, não observamos nenhuma diferença significativa nas concentrações de PCR, porém observou-se uma tendência para valores mais elevados nos pacientes hipercolesterolêmicos. Este dado está de acordo com a literatura, visto que alguns trabalhos demonstram que as concentrações de PCR encontram-se na faixa superior do intervalo de referência nas doenças cardiovasculares (revisado por Van Lente, 2000). Estudos epidemiológicos e clínicos têm indicado uma relação entre a concentração plasmática de fibrinogênio e eventos cardiovasculares (Meade e cols., 1980,

Wilhelmensen e cols., 1984, Yarnell e cols., 1991). Nosso trabalho mostrou uma correlação positiva e significativa da concentração de fibrinogênio com a de colesterol total, LDL colesterol, apo B, apo E e com a relação apo B/A1. Isso reforça a idéia de que o fibrinogênio tem um papel importante como um marcador de processos inflamatórios crônicos, incluindo a aterosclerose (Ernst, 1993).

No processo da peroxidação lipídica forma-se uma grande variedade de produtos (figura 40). Neste trabalho, foram determinadas as concentrações plasmáticas de hidroxil/hidroperóxidos lipídicos e de isoprostanos, assim como a oxidabilidade da LDL, determinada através do monitoramento da cinética de oxidação da LDL induzida com cobre, *in vitro*, medindo-se a formação de dienos conjugados

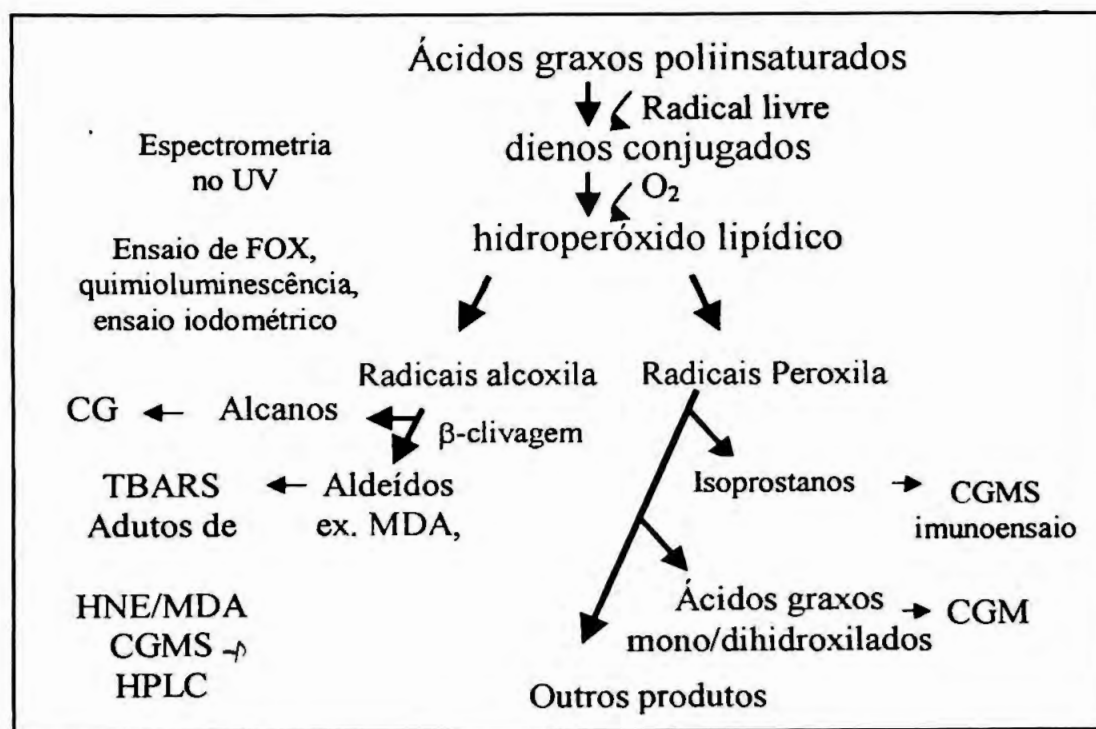


Figura 40 – Produtos de peroxidação lipídica, os quais tem sido determinados *in vivo* e *in vitro* (Moore e Roberts, 1998)

O aumento das concentrações dos hidroxil/hidroperóxidos lipídicos, observado neste trabalho, sugere que a maior oxidação das lipoproteínas, *in vivo*, poderia ser devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, tais como o radical superóxido (Minor e cols., 1990) e o óxido nítrico (Ohara e cols., 1993), nas artérias dos pacientes hipertensos ou hipercolesterolêmicos. Esses dois radicais livres podem reagir entre si, resultando na formação de peroxinitrito

e outros oxidantes mais reativos derivados do mesmo (White e cols., 1994). De fato, tem sido relatado que neutrófilos e monócitos de pacientes hipercolesterolêmicos e hipertrigliceridêmicos apresentam uma maior produção de radical superóxido quando estimulados (Keaney e cols., 1994, Hiramatsu e Arimori, 1988 e Abdalla e cols., 1994). Obtivemos uma maior concentração plasmática de hidroxi/hidroperóxidos derivados dos ésteres de colesterol e dos fosfolídeos. Esses resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que os ésteres de colesterol no *core* e os fosfolídeos na superfície das lipoproteínas seriam os lípidos mais susceptíveis à oxidação, pelo fato de conterem maior teor de ácidos graxos poliinsaturados (Noguchi e cols., 1998). Um aumento na produção de ânion radical superóxido também tem sido sugerido na hipertensão (White e cols., 1994). Srinivas e cols. (2000) demonstraram o aumento de peróxidos lipídicos na hipertensão primária, o que seria relevante no processo aterosclerótico, considerando-se que os hidroperóxidos lipídicos têm um papel central na citotoxicidade das lipoproteínas oxidadas. Estes compostos decompõem-se a aldeídos citotóxicos, os quais podem, *per se*, modificar resíduos de aminoácidos das apoproteínas presentes na superfície das lipoproteínas (Staller e cols., 1995), facilitando a internalização destas lipoproteínas modificadas oxidativamente pelos macrófagos, o que resulta na formação das células espumosas e estrias gordurosas. As correlações positivas encontradas para as concentrações plasmáticas de colesterol, LDL colesterol, apo B e Lp(a) com as de CE-OOH e TL-OOH demonstram a relação direta entre a oxidação das lipoproteínas e o conteúdo de colesterol plasmático.

Atualmente, ainda é bastante discutido o papel das lipoproteínas oxidadas, presentes no compartimento plasmático, em relação ao desenvolvimento da placa aterosclerótica. Não podemos afirmar que a oxidação das lipoproteínas ocorreu no plasma, uma vez que existe a possibilidade das lipoproteínas oxidadas na parede arterial retornarem para a circulação sanguínea através da camada endotelial, conforme foi sugerido por Hodis e cols. (1994). Contudo, apesar da indiscutível presença de lipoproteínas oxidadas no plasma, a contribuição desta fração de lipoproteínas oxidadas para a progressão da lesão ainda não está claramente estabelecida.

Outros produtos de peroxidação lipídica são os isoprostanos. Os isoprostanos são compostos semelhantes às prostaglandinas, os quais são produzidos, independentemente da enzima ciclooxigenase, pela peroxidação do ácido araquidônico, mediada por radicais livres. Pelo fato de aproximadamente 10% dos ácidos graxos insaturados da LDL serem representados pelo ácido araquidônico

(Esterbauer e cols., 1990), os isoprostanos poderiam ser bons indicadores do processo de lipoperoxidação dessa partícula. Os isoprostanos são formados em modelos animais de estresse oxidativo e em certas patologias humanas (revisado por Moore e cols., 1995, Reilly e cols., 1997, Delanty e cols., 1996, Reilly e cols., 1996 e Delanty e cols., 1997). Outro importante aspecto da descoberta dos isoprostanos é que dois estereoisômeros formados (8-iso-PGE<sub>2</sub> e 8-iso-PGE<sub>2α</sub>) (Taber e cols., 1997) têm potente ação vasoconstritora, provavelmente, atuando via um receptor específico diferente dos receptores de tromboxano (revisado por Moore e cols., 1995). Essa ação vasoconstritora dos isoprostanos poderia contribuir na patobiologia vascular associada com a aterosclerose. A formação de isoprostanos pode ter várias conseqüências relevantes na aterosclerose, pelo fato de os mesmos promoverem aumento da agregação plaquetária, modularem a resposta vascular a mediadores vasoativos endógenos e contribuírem para a disfunção endotelial que ocorre na aterosclerose (Moore e cols., 1995).

Outro parâmetro que pode ser avaliado, em relação à peroxidação lipídica, é a susceptibilidade da LDL à oxidação *in vitro*. O aumento da absorbância em 234 nm é um método fácil para monitorar o processo de oxidação pela formação de dienos conjugados. A mudança da absorbância ocorre devido ao rearranjo existente das duplas ligações dos ácidos graxos insaturados, a partir de um dieno não conjugado formando um dieno conjugado. A cinética da oxidação da LDL pode ser dividida em três fases, como representado na figura 10. Observamos neste trabalho, a diminuição do tempo de iniciação da oxidação (lag time) da fração pesada da LDL, na hipertensão e na hipercolesterolemia, indicando uma menor resistência da LDL pesada à oxidação.

Como descrito anteriormente, a cinética de oxidação da LDL *in vitro* é realizada utilizando-se íons cobre (II) como agente oxidante. Quantidades catalíticas de íons cobre (II) oxidam a LDL. Os mecanismos pelos quais o cobre inicia a oxidação da LDL são ainda incertos. Uma explicação proposta é que peróxidos preexistentes reagem com cobre e geram radical peroxila, o qual inicia a peroxidação da LDL. Contudo, muitos pesquisadores têm demonstrado que, após a separação cuidadosa da LDL, não existiu evidência de peróxidos associados a esta. Tem-se sugerido a existência de dois sítios de ligação do cobre com a LDL: o primeiro ligado à apoproteína B100 da LDL e o segundo na vizinhança da fase lipídica (revisado por Parthasarathy e cols., 1998 e por Cadenas e Sies, 1998).



A velocidade da iniciação do processo de peroxidação dos lipídeos da LDL (indicado pelo lag time) depende da quantidade de antioxidantes, peróxidos lipídicos, ácidos graxos mono/poliinsaturados e colesterol não esterificado presentes na partícula de LDL, assim como da estrutura da apo B na superfície da mesma (revisado por Parthasarathy e cols., 1998). Foi estimado que as reações dependentes da vitamina E contribuem para, aproximadamente, 20-30% na resistência da LDL à oxidação (Kontush e cols., 1996). De fato, correlações positivas foram observadas entre a concentração plasmática de  $\alpha$ -tocoferol e licopeno e o tempo de iniciação do processo de oxidação da LDL (lag time). Em resumo, concentrações menores de antioxidantes lipossolúveis facilitam a oxidação da LDL, contribuindo, potencialmente, para um maior risco para o desenvolvimento ou progressão da aterosclerose nestes pacientes.

Além dos produtos derivados da peroxidação lipídica, podemos determinar a concentração de óxidos de colesterol como um outro parâmetro de peroxidação lipídica. O envolvimento dos óxidos de colesterol no desenvolvimento/progressão da aterosclerose, em humanos, ainda não está esclarecido. Muitos estudos têm examinado a relação entre a concentração plasmática dos óxidos de colesterol e os fatores de risco para doenças coronarianas. As concentrações plasmáticas do 27-hidroxicolesterol correlacionaram-se positivamente com as concentrações do colesterol (Harik e Holmes, 1990). No nosso trabalho, observamos aumento das concentrações plasmáticas do colestano-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol, colesteril- $\alpha$ -epóxido e 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, assim como correlações positivas dos óxidos 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol e colesteril- $\alpha$ -epóxido plasmáticos com o colesterol plasmático total e o LDL-colesterol. Em relação às lipoproteínas, as concentrações do colestano-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol, colesteril- $\alpha$ -epóxido e colesteril- $\beta$ -epóxido estavam aumentadas na LDL e de colesteril- $\beta$ -epóxido na HDL dos pacientes hipercolesterolêmicos. A correlação obtida entre a concentração plasmática de colesteril- $\alpha$ -epóxido, assim como do total dos óxidos de colesterol na LDL, com os hidroxil/hidroperóxidos de éster de colesterol reforça a relação da oxidação da molécula de colesterol com a peroxidação dos ácidos graxos insaturados que o esterificam. Murakami e cols. (2000), sugerem que a determinação dos óxidos de colesterol poderia ser um marcador de lipoproteínas oxidadas na hiperlipidemia, uma vez que os mesmos encontraram um aumento dos óxidos de colesterol na hiperlipidemia. Outro importante resultado obtido em nosso trabalho foi o aumento da concentração do colestano-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol, já que tem sido sugerido que este óxido tem um importante papel pró-

aterogênico (revisado por Brown e Jessup, 1999). Existem fortes evidências de que o colesterol não oxidado não é citotóxico e aterogênico, enquanto que os seus óxidos seriam altamente citotóxicos e aterogênicos em diversos modelos celulares estudados (Sevanian e cols., 1995). Portanto, observamos que na hipercolesterolemia existe um aumento das concentrações de óxidos de colesterol. Estes óxidos, além de atuarem como marcadores da oxidação das lipoproteínas na hipercolesterolemia, poderiam ser potenciais indicadores do desenvolvimento e progressão da aterosclerose, uma vez que pequenas quantidades de óxidos de colesterol apresentam efeitos tóxicos para diversos tipos de células, como citado anteriormente.

O sistema cardiovascular é regulado por mecanismos centrais, hormônios e por mediadores vasculares locais. Em resposta a sinais mecânicos e humorais, as células endoteliais liberam mediadores que modulam a contração e a proliferação das células musculares lisas vasculares, a adesão e agregação plaquetária, a coagulação e a adesão de monócitos ao endotélio. O óxido nítrico, a prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio modulam o vasorrelaxamento. O  $^*NO$  também inibe a proliferação e migração das células musculares e, juntamente com a prostaciclina, a adesão e agregação plaquetária. A endotelina-1, o tromboxano  $A_2$  e a prostaglandina  $H_2$  são fatores de contração vascular derivados do endotélio. Sob condições fisiológicas, o endotélio exerce um efeito protetor nos vasos, como por exemplo, prevenindo a adesão de células sanguíneas, dilatando a vasculatura e inibindo a proliferação das células musculares lisas. Em determinadas doenças, a disfunção endotelial promove a vasoconstrição, a adesão de plaquetas e monócitos e a proliferação das células musculares lisas vasculares, eventos que contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose. (Revisado por Luscher e Noll, 1995).

Muitos trabalhos demonstram a existência de uma disfunção endotelial na hipertensão e na hipercolesterolemia (Zhang e cols., 2000, Cai e Harrison, 2000, Paddu e cols., 2000, Panza e col., 1995, Luscher e Noll, 1995, Panza e cols., 1990, Lyons, 1997 e Charo e cols., 1998). A disfunção endotelial na hipertensão pode estar relacionada ao aumento da resistência periférica vascular e às complicações vasculares. O mecanismo da disfunção endotelial difere nos diversos modelos de hipertensão. Na hipertensão espontânea em ratos, a atividade da NOS está aumentada, porém ineficientemente, provavelmente devido a um aumento da inativação do óxido nítrico. Na hipertensão induzida por sal, em ratos, parece ocorrer uma redução da produção de  $^*NO$  (Luscher e Noll, 1995). Diferentes mecanismos poderiam levar à disfunção da

vasodilatação dependente do endotélio, tais como a alteração da atividade da óxido nítrico sintase, o aumento da endotelina-1, o aumento da produção do fator de contração derivado de prostanóides, a diminuição da geração do fator(es) hiperpolarizante derivado do endotélio e a produção do ânion radical superóxido (revisado por Lind e cols., 2000). Na hipercolesterolemia parece haver uma redução da biodisponibilidade do  $^*NO$  (Creager e Selwyn, 1997). Muitos mecanismos podem levar a esta menor biodisponibilidade, incluindo a redução da disponibilidade da arginina e de cofatores da NOS sintase, "downregulation" da guanosina  $G_{i\alpha}$ , (subunidade mediadora da ativação do  $^*NO$  por estímulos bioquímicos), redução da expressão da NOS, alterações na sinalização celular e inativação do  $^*NO$  por superóxido ou por lipoproteínas oxidadas (Creager e Selwyn, 1997; Cai e Harrison, 2000). Luscher e Knoll (1995) propuseram que a maior causa desta disfunção na hipercolesterolemia seria a concentração elevada da LDL. O mecanismo pelo qual as lipoproteínas oxidadas atuam sobre o vasorrelaxamento ainda é muito controverso. Alguns autores sugerem que a LDL oxidada diminuiria a biodisponibilidade e/ou a produção do óxido nítrico, porém outros autores demonstram que em tecidos ateroscleróticos a expressão da NOS está aumentada (revisado por Bruckdorfer, 1998). A LDL oxidada também ativa a expressão do gene da endotelina, favorecendo a vasoconstrição (Luscher e Knoll, 1995).

Neste trabalho, observamos uma diminuição do relaxamento vascular dependente do endotélio (RDE), tanto na hipertensão como na hipercolesterolemia, quando os valores foram expressos em porcentagem de aumento do vasorrelaxamento em resposta à hiperemia reativa. O relaxamento vascular dependente do endotélio, quando expresso em % de aumento do diâmetro da artéria braquial em resposta à hiperemia reativa, correlacionou-se negativamente com a quantidade de colesterol total, LDL colesterol e apo B, e positivamente com a do  $\alpha$ -tocoferol e o lag time obtido na oxidação da LDL *in vitro*. Os mesmos resultados foram demonstrados por Steinberg e cols. (1997), os quais encontraram correlações negativas entre a quantidade de colesterol total e o RDE. Uma vez que o lag time é influenciado pela quantidade de antioxidantes, de peróxidos lipídicos, de ácidos graxos mono/poliinsaturados e de colesterol livre existente na partícula de LDL, poderíamos sugerir que um ou mais destes fatores poderiam estar influenciando o RDE. Como tem sido demonstrado que os hidroperóxidos lipídicos e os óxidos de colesterol alteram o relaxamento vascular dependente do endotélio (Bruckdorfer, 1998, Rikitake e cols., 2000), uma partícula de

LDL contendo concentrações maiores desses produtos oxidados, poderia promover uma diminuição do RDE (Bruckdorfer, 1998).

As endotelinas são uma família de peptídeos com múltiplas ações biológicas, como por exemplo a regulação do tônus vascular, da pressão sanguínea e da homeostase dos eletrólitos e da água (Yanagisawa e cols., 1988). A endotelina-1 é derivada do endotélio e, devido aos seus efeitos sobre o endotélio vascular, propõe-se que a endotelina-1 tem um importante papel na patogênese da aterosclerose, hipertensão e doenças cardiovasculares (Cesari e cols., 1996, Schiffrin, 1995 e Luscher e cols., 1993). Nosso trabalho mostrou um aumento da concentração plasmática de endotelina na hipertensão e na hipercolesterolemia. Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores que demonstraram concentrações elevadas de endotelina-1 em placas ateroscleróticas, na hipercolesterolemia e na hipertensão (Uyama e cols., 1996 e Schiffrin, 1998). Tem sido demonstrado que a produção desse peptídeo pelas células endoteliais é maior onde existe estresse hemodinâmico, sendo que a força de cisalhamento (shear stress) e a LDL oxidada poderiam aumentar a produção de endotelina-1 (Maley e cols., 1990 e Uyama e cols., 1996). Portanto, um aumento das concentrações de endotelina favorece uma maior vasoconstrição arterial, reforçando ainda mais a deficiência no relaxamento vascular dependente do endotélio, tanto na hipertensão como na hipercolesterolemia. Além disso, a endotelina exerce um papel mitogênico sobre as células musculares lisas (Takuwa e cols., 1989), tem propriedades quimiotáticas para monócitos (Achmad e Rao, 1992) e estimula a produção de moléculas de adesão do endotélio (McCarron e cols., 1993). Em conjunto, essas ações indicam que a endotelina pode ser considerada como um mediador crítico na aterosclerose.

Tem sido demonstrado na literatura recente que os antioxidantes podem preservar a função endotelial (Frei e Carr, 2000, May, 2000, Boger e cols., 1998, Lyons, 1997 e Levine e cols., 1996). Portanto, uma menor quantidade de antioxidantes poderia levar a uma maior disfunção endotelial na hipertensão e na aterosclerose.

Nosso trabalho mostrou uma diminuição da concentração plasmática de ascorbato na hipertensão e na hipercolesterolemia. Esse dado é importante, uma vez que vários estudos demonstram que o ascorbato pode proteger os lipídeos do plasma e das lipoproteínas contra a peroxidação lipídica (Frei, 1991, Frei e cols., 1988 e 1989) e diminuir a produção do ânion radical superóxido (Nunes e cols., 1997). Além disso, o ascorbato tem a capacidade de regenerar o radical tocoferil (Halliwell e Gutteridge,



1990) e, conseqüentemente, uma menor concentração plasmática de ascorbato prejudicaria essa via, diminuindo o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol regenerado nas lipoproteínas. Em adição ao seu papel antioxidante, estudos em humanos indicam que o ascorbato está envolvido no metabolismo do colesterol, na síntese de prostaciclina pelas células endoteliais dos vasos sanguíneos (Simon, 1992) e na manutenção da integridade vascular, revertendo a disfunção endotelial em pacientes com doença coronariana crônica (Levine e cols., 1996). Portanto, uma menor concentração de ascorbato na hipertensão e na hipercolesterolemia pode ser relevante para a progressão do processo aterosclerótico. Outro importante papel do ascorbato seria a sua capacidade de aumentar o relaxamento vascular dependente do endotélio na hipertensão, restaurando a atividade biológica do óxido nítrico (May, 2000, Levine e cols., 1996 e Taddei e cols., 1998).

Neste trabalho, observamos uma menor concentração plasmática de urato na hipertensão e na hipercolesterolemia. Em relação ao urato, o fato interessante é que existe um paralelismo entre as concentrações plasmáticas desse e a incidência de eventos coronarianos (Konneh e cols., 1995). Embora o urato tenha sido descrito como um fator de risco para a aterosclerose e coronariopatias, estudos epidemiológicos recentes não mostram um valor preditivo do mesmo para o infarto do miocárdio (Konneh e cols., 1995). O urato parece não estar diretamente envolvido na fisiopatologia desses processos, uma vez que é considerado um metabólito final e atóxico no organismo. A atividade antioxidante do urato está relacionada com sua capacidade de ligação com o ferro e cobre ou de seqüestrar espécies oxidantes como o ácido hipocloroso, ozônio e oxigênio singlete (Konneh e cols., 1995). Tem sido mostrado que o urato, metabólito final formado endogenamente a partir dos nucleotídeos guanina e adenosina, é liberado do coração de muitas espécies (Achterberg e cols., 1986, Becker e Gerlach, 1987 e Becker e cols., 1987), incluindo o homem, sendo este originado exclusivamente na microvasculatura endotelial (Gerlach e cols., 1985 e Jarasch e cols., 1981). Portanto, a diminuição da concentração plasmática de urato tanto na hipercolesterolemia como na hipertensão pode ser importante, já que o urato pode atuar como seqüestrador de radicais livres, colaborando para a manutenção da capacidade funcional do sistema coronariano e do miocárdio (Becker e cols., 1989).

Em relação aos antioxidantes lipossolúveis,  $\alpha$ -tocoferol, licopeno e  $\beta$ -caroteno, observou-se uma diminuição significativa da concentração plasmática de  $\alpha$ -tocoferol no grupo hipercolesterolêmico, de  $\beta$ -caroteno nos grupos hipercolesterolêmico



e hipertenso e de licopeno no grupo hipertenso, em relação ao grupo controle, quando o conteúdo destes antioxidantes foi normalizado pela concentração de colesterol total do plasma. Vários autores têm demonstrado a existência de correlações positivas entre as concentrações plasmáticas dos antioxidantes lipossolúveis e as concentrações de lipídeos totais e de colesterol (Konneh e cols., 1995, Horwitt e cols., 1972 e Widhalm e cols., 1985), possivelmente, devido à maior incorporação destes às lipoproteínas, as quais encontram-se aumentadas nos estados hiperlipidêmicos. Portanto, a forma mais correta de se expressar o conteúdo dos antioxidantes lipossolúveis no plasma é em relação à concentração de colesterol total (Traber e cols., 1992).

O  $\alpha$ -tocoferol é o principal antioxidante presente nas lipoproteínas, inibindo tanto a fase de iniciação como a de propagação da peroxidação lipídica (Traber e cols., 1992). Outra importante função do  $\alpha$ -tocoferol no processo aterosclerótico seria seu efeito inibitório sobre a expressão de moléculas de adesão de leucócitos nas células endoteliais vasculares, atuando assim sobre a interação celular endotélio-leucócitos (Terasawa e cols., 1996). Portanto, a diminuição da concentração de  $\alpha$ -tocoferol na hipertensão e na hipercolesterolemia, além de facilitar a oxidação das lipoproteínas, poderia promover indiretamente um aumento da expressão de moléculas de adesão, e conseqüentemente, a entrada de monócitos na íntima arterial, propiciando uma maior formação de células espumosas. Outro mecanismo antiaterogênico do  $\alpha$ -tocoferol foi proposto por Shige e cols. (1998), no qual este antioxidante reduz a captação da LDL modificada e suprime a atividade da ACAT, resultando em uma menor esterificação do colesterol em macrófagos e em menor quantidade de ésteres de colesterol nas "foam cells". A correlação negativa da concentração plasmática de colesterol, LDL colesterol, apo B e CE-OOH com a de  $\alpha$ -tocoferol, observada no presente trabalho, sugere a existência de um maior consumo deste antioxidante em estados hipercolesterolêmicos.

A enzima paraoxonase também tem sido considerada, mais recentemente, como um elemento importante na defesa antioxidante. A paraoxonase está associada à HDL e protege a LDL do estresse oxidativo, *in vitro* (Watson e cols., 1995). A expressão da paraoxonase está correlacionada com a HDL, com a diminuição da modificação oxidativa da LDL e com a inibição da modificação da HDL por peróxidos lipídicos, preservando assim a função dessa partícula (Mackness e cols., 1993 e 1996; Navab e cols., 1996 e Aviram e cols., 1998). Esta proteção à oxidação está relacionada à capacidade da paraoxonase de hidrolisar fosfolipídeos oxidados e hidroperóxidos de

colesterol linoleato (Aviram e cols., 1998 e Navab e cols., 1996). A paraoxonase também é capaz de hidrolisar os peróxidos lipídicos presentes em lesões ateroscleróticas humanas (Aviram e cols., 2000). Nossos resultados mostraram uma diminuição da concentração plasmática de paraoxonase nos pacientes hipercolesterolêmicos normotensos. Essa diminuição poderia estar correlacionada a um polimorfismo do gene da paraoxonase, já demonstrado anteriormente (Imai e cols., 2000 e Leus e cols., 2000). A paraoxonase correlacionou-se negativamente com a concentração de isoprostanos e positivamente com a do  $\alpha$ -tocoferol e licopeno. Portanto, essa diminuição pode ser importante para o desenvolvimento da aterosclerose, uma vez que a paraoxonase exerce um papel antiaterogênico.

O endotélio vascular libera  $^{\bullet}\text{NO}$ , o qual exerce um importante papel na regulação do tônus vascular. A disfunção do relaxamento vascular dependente do endotélio, como citado anteriormente, está associada à redução da biodisponibilidade/síntese do  $^{\bullet}\text{NO}$ . Para avaliarmos a biodisponibilidade/síntese do  $^{\bullet}\text{NO}$ , neste trabalho determinamos as concentrações plasmáticas de nitrato, nitrito, S-nitrosotióis e de nitrotirosina no plasma e nas partículas de LDL.

O óxido nítrico, em presença do oxigênio, é rapidamente oxidado, via trióxido de dinitrogênio, à nitrito (Kelm e cols., 1988). O nitrito tem sido utilizado como um marcador de produção de  $^{\bullet}\text{NO}$  em muitos experimentos *in vitro*. Contudo, no sangue humano, o nitrito é rapidamente convertido ao seu produto final, o nitrato (> 95 % em 1 hora) (Moshage e cols., 1995, Wennmalm e cols., 1993; Kelm e cols., 1996). A determinação das concentrações de nitrito e nitrato, freqüentemente denominadas de  $\text{NO}_x$ , tem sido utilizada como um marcador da atividade da NOS e da produção endógena de  $^{\bullet}\text{NO}$ . Neste trabalho, observamos um aumento na concentração de nitrato na hipercolesterolemia, sugerindo assim, um aumento da produção de  $^{\bullet}\text{NO}$  nesta doença. Outra via de formação de nitrato que não podemos descartar é a formação a partir do rearranjo do ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ) (peroxinitrito protonado), o qual se decompõe originando nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Portanto, um aumento de peroxinitrito também pode levar a um aumento de nitrato.

As concentrações de nitrotirosina foram aqui determinadas para testar a hipótese de que o aumento da reação do  $^{\bullet}\text{NO}$  com  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , formando peroxinitrito, ocorre em pacientes com hipertensão ou hipercolesterolemia. O  $^{\bullet}\text{NO}$  pode ser degradado por  $\text{O}_2^{\bullet-}$  por uma reação que têm uma velocidade ( $1.9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ) dez vezes maior que a

dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  pela superóxido dismutase ( $2.0 \times 10^9 M^{-1} sec^{-1}$ ) (Kissner e cols., 1997). Uma diminuição da degradação do  $O_2^{\bullet-}$  pela superóxido dismutase e um aumento da destruição do  $^{\bullet}NO$  têm sido demonstrados na hipertensão (Nakazono e cols., 1991 e Tschudi e cols., 1996). Tem sido descrito que a atividade da superóxido dismutase é baixa no plasma dos pacientes hipertensos (Kumar e Das, 1993), o que poderia favorecer a reação entre  $^{\bullet}NO$  e  $O_2^{\bullet-}$  resultando em peroxinitrito, ou  $^{\bullet}NO_2$  mais  $CO_3^{\bullet-}$ , aumentando assim a possibilidade de nitração de proteínas e de compostos de baixo peso molecular presentes na circulação sistêmica. Estudos com radiólise mostraram que existe um aumento de nitração quando os fluxos de  $O_2^{\bullet-}$  e  $^{\bullet}NO$  são semelhantes (Goldestein e cols., 2000). Em condições fisiológicas, a concentração do  $^{\bullet}NO$  ( $0.1-3.0 \times 10^{-9}M$ ) excede a concentração de  $O_2^{\bullet-}$  ( $10^{-9} - 10^{-12} M$ ), resultando em um aumento da razão  $^{\bullet}NO/O_2^{\bullet-}$  na parede arterial (Wever e cols., 1998).

A nitração de resíduos de proteína pode ter importantes implicações para a fisiopatologia da hipertensão. Por exemplo, a nitração das proteínas pode afetar a atividade enzimática, a expressão gênica, a apoptose e a resposta celular ao "shear stress", além de outros eventos (Ischiropoulos, 1998). Mihm e cols. (2000) demonstraram que, além de ser um biomarcador de nitração, a nitrotirosina pode contribuir para a disfunção endotelial por promover danos ao DNA e/ou por induzir apoptose. Os sistemas de nitração que atuam *in vivo* ainda não estão totalmente elucidados e existe a possibilidade de múltiplas vias de nitração funcionarem simultaneamente ou de diferentes agentes nitrantes poderem operar em diferentes etapas durante a progressão de uma doença (Ischiropoulos, 1998). Contudo, a nitração de resíduos tirosina em proteínas parece ser um processo seletivo, dependendo da estrutura molecular, como por exemplo a exposição do anel aromático na superfície da proteína e associação com cargas negativas vizinhas (Souza e cols., 1999). As reações de nitração dependentes de hemeoproteínas, como as mediadas por mieloperoxidase (Hanzen e cols., 1999), prostaciclina sintase (Zou e cols., 1999) e ciclooxigenase-2 (Baker e cols., 1999) poderiam estar influenciando na patologia da hipertensão. Contudo, o peroxinitrito formado pela reação do óxido nítrico com o ânion radical superóxido, em pH fisiológico, permanece sendo uma espécie importante na nitração de tirosina *in vivo* (Reiter e cols., 2000).

Em relação à hipercolesterolemia, a reação entre o de  $O_2^{\bullet-}$  e  $^{\bullet}NO$  também pode ser favorecida, uma vez que ocorre diminuição da atividade da superóxido dismutase

nesta condição (Silva e cols., 1995 e Ohara e cols., 1993). De fato, nossos resultados demonstraram um aumento da concentração de nitrotirosina na LDL dos pacientes hipercolesterolêmicos, o que está de acordo com nossos dados obtidos anteriormente na hipercolesterolemia induzida em coelhos (Moriel e cols., 1997).

A proporção entre a geração de nitrotirosina intracelular/intravascular ainda é desconhecida, mas a presença de proteínas nitradas tem sido demonstrada no plasma de humanos (Schwedhelm e col., 1999 e Steege e cols., 1998). O aumento da concentração de nitrotirosina no plasma tem sido descrito em doenças que estão associadas com o processo inflamatório, como doença celíaca (Steege e cols., 1998), artrite reumatóide (Kuar e Halliwell, 1994), e choque séptico (Fukuwama e cols., 1997). Contudo, a concentração de nitrotirosina presente no plasma pode representar os componentes celulares nitrados que são liberados das células após citólise ou nitrocompostos que foram gerados na circulação sanguínea. Outro fator que contribui para as concentrações plasmáticas de nitrotirosina é a degradação e o *clearance* da mesma no plasma. A nitrotirosina livre tem uma meia vida de 68,5 minutos no plasma, sendo então metabolizada e excretada na urina (Tabrizi-Fard e cols., 1999). As proteínas nitradas sofrem proteólise mais rapidamente que as proteínas não nitradas (Ischiropoulos, 1998) e a denitração de proteínas pelas nitratasases tem sido descrita em coração e cérebro de ratos (Kuo e cols., 1999). Portanto, a concentração plasmática de nitrotirosina livre ou ligada a proteínas reflete a sua produção por vias de nitração intra e extracelulares do metabolismo endógeno e da excreção renal.

Tem sido descrito que os S-nitrosotióis (RSNOs) exercem a função de transporte e armazenamento do  $\text{NO}$ , *in vivo*. Recentemente, foi proposto que a geração dos RSNO pode ser catalisada pela ceruloplasmina (Inoue e cols., 1999). A ceruloplasmina é uma proteína que transporta cobre e também é considerada uma enzima com atividade de ferroxidase e amino-oxidase (Inoue e cols., 1999). Essa proteína pode catalisar a oxidação do  $\text{NO}$  via um elétron, formando  $\text{NO}^+$ , acoplada à redução de quatro elétrons do  $\text{O}_2$  para gerar RSNO, na presença de tióis (Inoue e cols., 1999). Os nossos resultados, assim como estudos anteriores (Kozlov e cols., 1984), mostraram que na hipercolesterolemia ocorre um aumento da concentração plasmática de ceruloplasmina. Portanto, a geração de RSNO catalisada pela ceruloplasmina pode ser uma via para o armazenamento de  $\text{NO}$  na circulação sistêmica.

O  $\cdot\text{NO}$  é rapidamente liberado RSNOs via redução por metais de transição, tióis e ascorbato. A CuZn-SOD também pode catalisar a decomposição de S-nitrosopeptídeos, como a S-nitrosoglutationa, resultando na liberação do  $\cdot\text{NO}$  (Jourdeuil e cols., 1999). Portanto, enquanto a ceruloplasmina pode representar um importante catalisador na via de formação de RSNO, a CuZn-SOD poderia atuar como um modulador da liberação do  $\cdot\text{NO}$  a partir dos RSNOs. A decomposição dos RSNOs pode resultar em um aumento de  $\cdot\text{NO}$  com conseqüente formação de nitrato. De acordo com isso, nossos resultados mostraram um aumento de RSNOs e nitrato no plasma dos pacientes hipercolesterolêmicos. O ascorbato poderia ser outro composto importante na decomposição dos RSNO no plasma (Williams e cols., 1996). Contudo, as concentrações de ascorbato foram menores nos pacientes hipercolesterolêmicos, em comparação aos pacientes normolipidêmicos, e não correlacionadas com as concentrações de nitrito, nitrato ou RSNO.

A concentração de nitrotirosina no plasma e na LDL dos pacientes com hipertensão leve/moderada não foi maior que aquela de pacientes normotensos. Contudo, a concentração de nitrotirosina ligada à LDL foi significativamente maior nos pacientes hipercolesterolêmicos, em comparação àquela dos controles. Portanto, na hipercolesterolemia, pudemos demonstrar claramente a ocorrência do aumento das concentrações de nitrato, nitrotirosina e S-nitrosotióis, assim como a correlação destes analitos com o aumento da concentração de LDL-colesterol.



## 6.2 - Conclusões

Analisando conjuntamente os nossos resultados, podemos sugerir algumas vias que poderiam contribuir para a diminuição do vasorrelaxamento dependente do endotélio na hipertensão e na hipercolesterolemia (Figura 41 e 42)

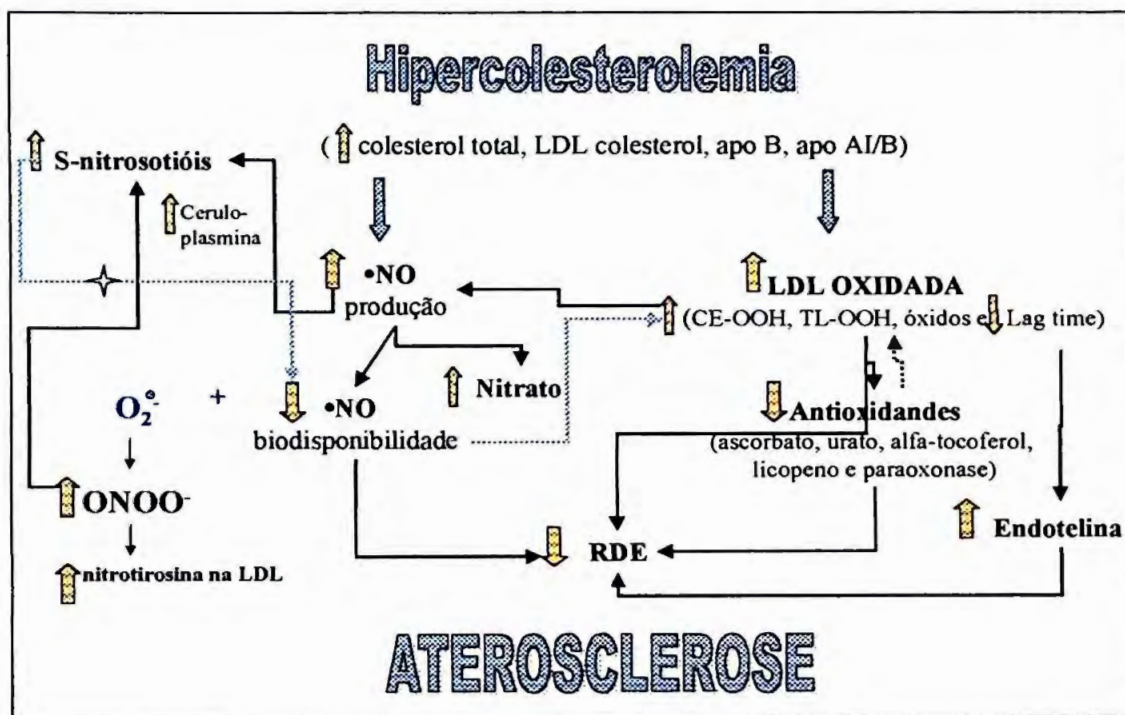


Figura 41 – Vias que poderiam contribuir para a diminuição do vasorrelaxamento dependente do endotélio na hipercolesterolemia



Figura 42 - Vias que poderiam contribuir para a diminuição do vasorrelaxamento dependente do endotélio na hipertensão

Na hipercolesterolemia, o aumento das concentrações de colesterol total, LDL colesterol e apo B pode influenciar: 1) no aumento da LDL oxidada; 2) na produção de óxido nítrico. O aumento dos produtos de oxidação lipídica, observados neste trabalho, sugere a presença de uma maior quantidade de LDL oxidada no plasma destes pacientes, as quais podem estar influenciando: 1) o consumo de antioxidantes; 2) a síntese de endotelina; 3) a produção de óxido nítrico. A produção de óxido nítrico parece estar aumentada, uma vez que as concentrações de nitrato e S-nitrosotióis estão aumentadas. Além desses dois parâmetros de avaliação da produção de óxido nítrico, observamos um aumento na concentração de nitrotirosina na LDL dos pacientes hipercolesterolêmicos, sugerindo um aumento na formação de peroxinitrito pelo aumento simultâneo do óxido nítrico e do ânion radical superóxido. Apesar desse aumento aparente da produção de óxido nítrico, parece existir uma menor biodisponibilidade do mesmo, uma vez que o relaxamento derivado do endotélio está diminuído na hipercolesterolemia. Outros fatores, observados neste trabalho, que poderiam estar influenciando no relaxamento vascular dependente do endotélio, na hipercolesterolemia, são: 1) diminuição dos antioxidantes; 2) aumento de endotelina; 3) aumento da LDL oxidada.

Na hipertensão nossos resultados não demonstraram nenhuma diferença significativa nos produtos de decomposição do óxido nítrico. Contudo, o relaxamento vascular dependente do endotélio também está diminuído na hipertensão. Podemos sugerir, por este trabalho, alguns fatores que poderiam estar influenciando na disfunção endotelial nestes pacientes: 1) aumento da LDL oxidada; 2) diminuição dos antioxidantes; 3) aumento da endotelina.

Em resumo, nossos resultados demonstram que: (1) a oxidação lipídica, determinada pelo conteúdo plasmático de hidroxi/hidroperóxidos lipídicos, é maior na hipercolesterolemia e na hipertensão; (2) a LDL dos pacientes hipertensos ou hipercolesterolêmicos é mais susceptível à oxidação do que a dos controles normolipidêmicos e normotensos; (3) a concentração dos óxidos de colesterol é maior na hipercolesterolemia; (4) ocorre uma diminuição do relaxamento vascular dependente do endotélio nos pacientes hipertensos e hipercolesterolêmicos, a qual correlaciona-se negativamente com a quantidade de LDL colesterol; (5) a concentração de endotelina plasmática está aumentada na hipertensão e na hipercolesterolemia, sugerindo uma relação entre as concentrações de endotelina e a disfunção endotelial nestas doenças; (6) a concentração plasmática de fibrinogênio está relacionada com a concentração de colesterol total e de LDL-colesterol, sugerindo o seu uso potencial como indicador de risco coronariano; (7) a menor quantidade de antioxidantes no plasma e nas lipoproteínas, observada nos pacientes com hipertensão ou hipercolesterolemia, poderia influenciar no relaxamento dependente do endotélio; (8) as concentrações plasmáticas de nitrotirosina não diferiram entre os grupos estudados. Contudo, a concentração de nitrotirosina na LDL foi maior na hipercolesterolemia; (9) a disfunção do vasorrelaxamento dependente do endotélio, descrita nos pacientes hipercolesterolêmicos, parece não estar relacionada com um defeito na formação ou decomposição de RSNOs no plasma; (10) há um aumento nas concentrações dos produtos formados pela decomposição do óxido nítrico, nitrato, S-nitrosotióis e nitrotirosina na hipercolesterolemia.

Portanto, tanto na hipertensão como na hipercolesterolemia, as concentrações de lipoproteínas oxidadas, os antioxidantes, a biodisponibilidade do  $^{\bullet}\text{NO}$  e a concentração de endotelina podem estar alterando o endotélio vascular e o vasorrelaxamento dependente do endotélio, o que seria relevante para o desenvolvimento da aterosclerose.

## ***7. RESUMO E ABSTRACT***

---



### 7.1 - Resumo

A disfunção endotelial tem um importante papel na patogênese de doenças cardiovasculares. Tem sido sugerido que o colesterol plasmático, particularmente o que está associado à LDL, é um dos principais fatores de risco para a aterosclerose. Contudo, a oxidação da LDL é um evento crucial na patogênese da aterosclerose. Além disso, a redução da biodisponibilidade do óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) tem sido relacionada à disfunção endotelial presente na aterosclerose. A redução da bioatividade do  $\text{NO}$  na hipercolesterolemia, na hipertensão e em outras desordens metabólicas associadas com a aterogênese parece ser multifatorial. Contudo, as alterações da produção/biodisponibilidade do  $\text{NO}$  na hipercolesterolemia e na hipertensão é ainda controverso. A proposta deste estudo foi examinar as relações entre a peroxidação lipídica, os antioxidantes, a biodisponibilidade do óxido nítrico e o relaxamento vascular dependente do endotélio (RDE) em pacientes hipercolesterolêmicos normotensos (HC) ( $n = 18$ ), hipertensos normocolesterolêmicos (H) ( $n = 11$ ) e normotensos normolipidêmicos (N) ( $n = 11$ ). As concentrações de ascorbato, urato,  $\alpha$ -tocoferol, licopeno,  $\beta$ -caroteno e dos hidroxil/hidroperóxidos lipídicos foram determinadas por HPLC. As concentrações de paraoxonase, isoprostanos e endotelina foram determinadas por ELISA. A cinética de oxidação da LDL, induzida pelo  $\text{Cu}^{2+}$ , foi monitorada pela formação de dienos conjugados. Os óxidos de colesterol foram determinados por cromatografia gasosa. O RDE foi determinado por ultrassonografia modo B, em relação à diferença de diâmetro da artéria braquial no basal e após hiperemia reativa. As concentrações plasmáticas de nitrito, nitrato e S-nitrosotióis foram determinadas por quimioluminescência, gerada pela reação do  $\text{NO}$  com ozônio, no analisador de  $\text{NO}$  (NOA<sup>TM280</sup>, Sievers, Corp.). A nitrotirosina do plasma e da LDL foi determinada através do método de ELISA competitivo, utilizando-se quimioluminescência e um anticorpo policlonal anti-nitrotirosina. O ascorbato, os antioxidantes lipossolúveis, o lag time e o RDE foram menores nos pacientes H e HC quando comparados aos N. As concentrações de hidroxil/hidroperóxidos lipídicos e de endotelina foram maiores na hipertensão e na hipercolesterolemia. As concentrações de nitrato, S-nitrosotióis, colesterol total, LDL-colesterol apo B e de nitrotirosina da LDL foram maiores na hipercolesterolemia. O LDL-colesterol correlacionou-se negativamente



---

com o RDE. Portanto, tanto na hipertensão como na hipercolesterolemia, as concentrações de lipoproteínas oxidadas, os antioxidantes, a biodisponibilidade do  $^{\circ}\text{NO}$  e a concentração de endotelina podem estar influenciando na alteração da função endotelial e do relaxamento vascular dependente do endotélio, o que seria relevante para o desenvolvimento da aterosclerose.

## 7.2 - Abstract

Endothelial dysfunction plays an important role in the pathogenesis of coronary artery disease. Plasma cholesterol, particularly that associated to LDL, has been suggested to be an important risk factor in the development of cardiovascular disease. Moreover, LDL oxidation is a crucial event in the pathogenesis of atherosclerosis. By the other hand, a reduced bioactivity of endothelial nitric oxide ( $^{\bullet}\text{NO}$ ) has been implicated in the pathogenesis of atherosclerosis. The reduction of  $^{\bullet}\text{NO}$  activity in hypercholesterolemia and in other metabolic disorders associated with atherogenesis appears to be multifactorial. However, the alterations of  $^{\bullet}\text{NO}$  production in hypercholesterolemia and hypertension is still controversial. The purpose of this study was to examine the relationship of lipid peroxidation, antioxidants and nitric oxide bioavailability with the impairment of endothelium dependent vasodilation in hypercholesterolemic (HC) (n = 18), hypertensive (H) (n = 11), and normolipidemic normotensive subjects (N) (n = 11). Ascorbate, urate,  $\alpha$ -tocopherol, lycopene and  $\beta$ -carotene, as well as, lipid hydroxy/hydroperoxides were determined by HPLC. Paraoxonase, isoprostanes and endothelin were determined by ELISA. The kinetics of LDL oxidation was monitored by incubating LDL with  $\text{Cu}^{2+}$ . Oxysterols were determined by CG. Mode B ultrasonography was used to measure the blood flow and diameter in response to reactive hyperemia of brachial artery. Nitrate and S-nitrosothiols in plasma were determined by chemiluminescence elicited by reaction of  $^{\bullet}\text{NO}$  with ozone in the  $^{\bullet}\text{NO}$  analyzer (NOA<sup>TM280</sup>, Sievers, Corp.). Nitrotyrosine concentrations in plasma, LDL and HDL were determined by a chemiluminescence competitive ELISA developed in our laboratory with polyclonal antibody. Plasma ascorbate, lipid soluble antioxidants, the lag time and the endothelium dependent relaxation were lower in H and HC than in N. Lipid hydroxy/hydroperoxides and endothelin were higher in hypertension and hypercholesterolemia. The levels of plasma nitrate, S-nitrosothiols, total cholesterol, apo B, LDL-nitrotyrosine and LDL-cholesterol were significantly higher in HC than in N subjects. LDL cholesterol was negatively correlated to the percentage of diameter increase in response to hyperemia. The lower levels of the lipid soluble antioxidants may be important for the impairment of endothelial dependent vasodilation in hypercholesterolemia and hypertension. In conclusion, in hypertension and hypercholesterolemia the levels of

---

oxidized lipids, antioxidants, \*NO bioavailability, and endothelin may contribute to the impairment of endothelial function and endothelium dependent relaxation, which is crucial to the development of atherosclerosis.

---

## **8. BIBLIOGRAFIA**

---

- ABDALLA, D.S.P., CAMPA, A., MONTEIRO, H.P. Oxidation of LDL by ferritin and stimulated neutrophils. *Free Radical Biol. Med.*, 9:74, 1990.
- ABDALLA, D.S.P., COSTA-ROS, L.F.B.P., MONTEIRO, H.P., CAMPA, A., CURI, R. Human macrophage metabolism of low-density lipoprotein oxidized by stimulated neutrophils and ferritin. *Atherosclerosis*, 107:157-163, 1994.
- ACHMAD, T.H., RAO, G.S. Chemotaxis of human blood monocytes towards endothelin-1 and the influence of calcium channel blockers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189:994-1000, 1992.
- ACHTERBERG, P.W., STROEVE, R.J., DE JONG, J.W. Myocardial adenosine cycling rates during normoxia and under conditions of stimulated purine release. *Biochem. J.*, 235:13-17, 1986.
- AKASAKA, K., OHRUI, H., MEGURO, H. Simultaneous determination of hydroperoxids of phosphatidylcholine, cholesterol esters and triacylglycerols by column switching high performance liquid chromatography with a post-column detection system. *J Chromatogr*, 622:153-159, 1993.
- AVIRAM, M., HARDAK, E., VAYA, J., MAHMOOD, S., MILO, S., HOFFMAN, A., BILLICKE, S., DRAGANOV, D., ROSENBLAT, M. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation*, 30:101(21):2510-7, 2000.
- AVIRAM, M., ROSENBLAT, M., BISGAIER, C.L., NEWTON, R.S., PRIMOPARMO, S.L., LA DU, B.N. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. *J. Clin. Invest.*, 101:1581-1590, 1998.
- AVONTUUR J.A., BOOMSMA, F., VAN DEN MEIRACKER, A.H., JONG, F.H., BRUINING, H.A. Endothelin-1 and blood pressure after inhibition of nitric oxide synthesis in human septic shock. *Circulation*, 19:271-275, 1999.
- BAKER, C.S., HALL, R.J., EVANS, T.J., POMERANCE, A., MACLOUF, J., CREMINON, C., YACOUB, M.H., POLAK, J.M. Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesion affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19:646-655, 1999.
- BARANOWSKI, A., ADAMS, C. W. M., BAYLISS HIGH O. B., BOPWYER, D. B. Connective tissue responses to oxysterols. *Atherosclerosis*, 41:255-266, 1982.
- BASU, S. Radioimmunoassay of 8-iso-prostaglandin F2alpha: an index for oxidative injury via free radical catalyzed lipid peroxidation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 58:319-325, 1998.
- BECKER, B.F., GERLACH, E. Uric acid, the major catabolite of cardiac adenine nucleotides and adenosine, originates in the coronary endothelium. In: Gearlach E., Becker, B. F. eds. Topics and perspectives in adenosine research. Berlin: Springer, p. 209-222, 1987.
- BECKER, B.F., PERMANETTER, B., SEBENING, H, BLUMER, H., GERLACH, E. Uric acid in heart patient: cardiac production and disappearance in the lung. *Pflugers Arch.*, 408:14, 1987
- BECKER, B.F., RENHOLZ, N., ÖZÇLIK, T., LEIPERT, B., GERLACH, E. Uric acid as radical scavenger and antioxidant in the heart. *Pflugers Arch.*, 415:127-135, 1989.
- BECKMAN, J.S., BECMAN, T.W., CHEN, J., MARCHALL, P.A., FREEMAN, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. USA*, 87:1620-1624, 1990.



- 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 mechanism: oxidation, inflammation and genetics. *Circulation*; 91:2488-2496, 1995.
- BOGER, R.H., BODE-BOGER, S.M., PHIVTHONG-NGAM, L., BRANDES, R.P., SCHWEDHELM, E., MUGGE, A., BOHME, M., TSIKAS, D., FROLICH, J.C. Dietary L-arginine and  $\alpha$ -tocopherol reduce vascular oxidative stress and preserve endothelial function in hypercholesterolemic rabbits via different mechanisms. *Atherosclerosis*, 141:31-43, 1998.
- BOLTON, E.J., JESSUP, W., STANLEY, K.J., DEAN, R.T. Enhanced LDL oxidation by murine macrophage foam cells and their failure to secrete nitric oxide. *Atherosclerosis*, 106:213-223, 1994.
- BOULANGER, C.M., TANNER, F.C., BEA, M.L., HAHN, A.W., WERNER, A., LUSCHER, T.F. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ. Res.*, 70:1191-1197, 1992.
- BROWN, A. J., JESSUP, W. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 142:1-28, 1999.
- BROWN, M. S., GOLDSTEIN, J. L. Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts. *Cell* 6:307-316, 1975.
- BROWN, M.S., GOLDESTINEIN, J.L. Lipoprotein receptors in the liver control signs for plasma cholesterol traffic. *J. Clin. Invest.*, 72:743-747, 1983.
- BROWN, M.S., MASU, S.K., FALCK, J.R., HO, Y.K., GOLDSTEIN, J.L. The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation : specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively charged LDL by macrophages. *J. Supramol. Struct.*, 13:67-81, 1980.
- BRUCKDORFER, K.R. Lipid oxidation products and vascular function. *Free Rad. Res.* , 28:573-581, 1998.
- BRUCKDORFER, K.R., JACOBS, M., RICE-EVANS, C. The protective action of nitric oxide against membrane damage induced by myoglobin radicals. *Biochem. Soc. Trans.*, 18:1061-1063, 1990.
- BUSSE, R., FLEMING, I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann. Med.*, 27:331-340, 1995.
- CADENAS, E., SIES, H. The lag phase. *Free Rad. Res.*, 28:601-609, 1998.
- CAI, H., HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.*, 10;87(10):840-4, 2000.
- CATHCART, M.K., MOREL, D.W., CHISOLM, G.M. Monocytes and neutrophils oxidize low-density lipoprotein making it cytotoxic. *J. Leukocyte Biol.*, 38:341-350, 1985.
- CESARI, M., PAVAN, E., SACCHETTO. A., ROSSI, G. P. Endothelin-1: a scientist's curiosity, or a real player in ischemic heart disease? *Am. Heart J.*, 132:1236-1243, 1996.
- CHAKMAKJIAN, G.J. Endocrinology. In Race GJ, ed. Laboratory medicine. Philadelphia:Harper & Row, 1982:1-3.
- CHANG, Y. H., ABDALLA, D. S. P., SEVANIAN, A. Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein. *Free Rad. Biol.*, 32:202-214, 1997.
- CHARO, S., GOKCE, N., VITA, J.A. Endothelial dysfunction and coronary risk reduction. *J Cardiopulm Rehabil* , 18:60-67, 1998.

- CHESEBRO, J.H., FUSTER, V. Dynamic thrombosis and thrombolysis. *Circulation*, 83:1815-1817, 1991.
- CHIN, J.H., AZHAR, S., HOFFMAN, B.B. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J. Clin. Invest.*, 89:10-18, 1992.
- CREAGER, M.A., SELWYN, A. When normal cholesterol levels injure the endothelium, *Circulation*, 96:3255-3257, 1997.
- CYBULSKI, M.I., GIMBRONE, M.A. Endothelial expression of mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*, 251:278-791, 1991.
- DARLEY-USMAR, V.M., HOGG, J., O'LEARY, V.J., WILSON, M.T., MONCADA, S. The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Radical Res. Commun.*, 17:9-20, 1992.
- DELANTY, N., REILLY, M., LAWSON, J.A., MCCARTHY, J., WOOD, F., FITZGERALD, D.G., FITZGERALD, G.A. 8-Epi PGF<sub>2α</sub> generation during coronary reperfusion: a potential quantitative marker of oxidant stress in vivo. *Circulation*, 95:2492-2499, 1997.
- DELANTY, N., REILLY, M., PRATICO, D., FITZGERALD, D.G., FITZGERALD, G.A. 8-Epi PGF<sub>2α</sub>: specific analysis of an isoicosanoid as an index of oxidant stress in vivo. *Br. J. Clin. Pharm.*, 42:15-19, 1996
- DERGUNOV, A.D., ROSSENEU, M. The significance of apolipoprotein E structure to the metabolism of plasma triglyceride-rich lipoproteins. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 375:485-495, 1994.
- ERNST, E. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: interrelationship with infections and inflammation. *Eur. Heart J.*, 14:82-87, 1993.
- ESTERBAUER H, DIEBER-ORTHENERDER, M., WAEG, G., STRIEGL, G., JURGENS, G. Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low density lipoprotein. *Chem. Res. Toxicol.*, 3:77-92, 1990.
- ESTERBAUER, H., GEBICKI, J., PUHL, H., JÜRGENS, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biol. Med.*, 13:341-390, 1992.
- EWING, J.F., JANERO, D.R. Specific S-nitrosothiol (thionitrite) quantification as solution nitrite after vanadium (III) reduction and ozone-chemiluminescent detection. *Free Radic. Biol. Med.*, 25:621-628; 1998.
- FOLCIK, V.A., CATHCART, M.K. Predominance of esterified hydroperoxyl-linoleic acid in human monocyte-oxidized LDL. *J. Lipid Res.*, 35:1570-1582, 1994.
- FRANGOS J.A., ESKIN, S.G., MCINTIRE, L.V., IVES, C.L. Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science*, 227:1477-1479, 1984.
- FREEMAN, B.A., CRAPO, J.D. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 47:412-426, 1982.
- FREI, B., CARR, A. C., ZHU, B. Z. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circ. Res.*, 1;87(5):349-54, 2000.
- FREI, B.B. Ascorbic Acid protects lipids human and low density lipoprotein against oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54:1113S-1118S, 1991
- FREI, B.B., ENGLAND, L., AMES, B.N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:6377-6381, 1989
- FREI, B.B., STOCKER, R., AMES, B.N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:9748-9752, 1988.

- FRIEDWALD, W.T., LEVY, R.I., FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol without the use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.*, 18:499-502, 1972.
- FRIES, D.M., PENHA, R.G., D'AMICO, E.A., ABDALLA, D.S.P., MONTEIRO, H.P. Oxidized low-density lipoprotein stimulates nitric oxide release by rabbit aortic endothelial cells. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 207:231-237, 1995.
- FUKUWAMA, N., TAKEBAYASHI, Y., HIDA, M., ISHIDA, H., ICHIMORI, K., NAKAZAWA, H. Clinical evidence of peroxynitrite formation in chronic renal failure patients with septic shock. *Free Rad. Biol. Med.*, 22:771-774, 1997.
- GARCIA, C.E., KILCOYNE, C.M., CADILLO, C., CANNON, R.O.3RD., QUYYUMI, A.A., PANZA, J.A. Effect of copper-zinc superoxide dismutase on endothelium-dependent vasodilatation in patients with essential hypertension. *Hypertension*, 26:863-868, 1996.
- GAUBATZ, J.W., HEIDMAN, C., GOTTO, A.M.J., MORRISSETT, J.D., DAHLEN, G.H. Human plasma lipoprotein(a): structural properties. *J. Biol. Chem.*, 258:4582-4589, 1982.
- GENG, Y., LIBBY, P. Evidence for apoptosis in human atheroma: Colocalization with IL-1 beta converting enzyme. *Am. J. Pathol.*, 147:251-256, 1995.
- GERLACH, E., NESS, S., BECKER, B.F. the vascular endothelium: a survey of some newly involving biochemical and physiological features. *Basic Res. Cardiol.*, 80:459-474, 1985
- GERRITY, R.G. The role of monocyte in atherogenesis: Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *Am. J. Pathol.*, 103:190-20, 1981.
- GIRARD, P., POTIER, P. NO, thiols and disulfides. *FEBS Lett.*, 320:7-8, 1993.
- GIUGLIANO, D., CERIELLO, A., POLISSO, G. Diabetes mellitus, hypertension and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? *Metabolism*, 4:4363-368, 1995.
- GOLDESTAIN, S., CZAPSKI, G., LIND, J., MERÉNYI, G. Tyrosine nitration by simultaneous generation of  $^{\bullet}\text{NO}$  and  $\text{O}_2^{\bullet-}$  under physiological conditions. *J. Biol. Chem.*, 275:3031-3036, 2000.
- GOSS, S.P.A., HOGG, G., KALYANARAMAN B. The antioxidant effect of spermine NONOate in human low-density lipoprotein. *Chem. Res. Toxicol.*, 8:800-806, 1995.
- GOTTO JR., A.M. High density lipoproteins : biochemical and metabolic factors. *Am. J. Cardiol.*, 52:2-4. 1993.
- GRAHAM, A., HOGG, N., KALYANARAMAN, B., O'LEARY, V.J., DARLEY-USMAR, V.M, MONCADA, S. Peroxynitrite modification of low-density-lipoprotein leads to recognition by macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett.*, 330:181-185, 1993.
- HABERLAND, M.E., STEINBRECHER, U.P. Modified low-density lipoprotein: Diversity and biological relevance in atherogenesis. In: LUSIS, A. J., ROTTER, J. I., SPAKERS, R. S., eds., *Molecular genetics of coronary artery disease*. Basel: Karger, 1992. p. 35-61.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 2.ed. New York: Oxford University Press, 1989.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 280:1-8, 1990.
- HAMES, B.D., RICKWOOD, D. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. 1991 IRL Press, Oxford and Washington, D.C.

- HANZEN, S.L., ZHANG, R., SHEN, Z., WU, W., PODREZ, E.A., MACPHERSON, J.C., SCHMITT, D., MITRA, S.N., MUKHOPADHAYAY, C., CHEN, Y., COHEN, P.A., HOFF, H.F., ABU-SOUD, H.M. Formation of nitric oxide derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes. *Circ. Res.*, 85:950-958, 1999.
- HARIK-KHAN, R., HOLMES, R. P. Estimation of 26-hydroxycholesterol in serum by high-performance liquid chromatography and its measurement in patients with atherosclerosis. *J. Steroid Biochem.*, 4;36(4):351-5, 1990.
- HARMAN, D. Free Radical theory of aging : role of free radicals in the orientation and evolution of life, aging and disease process. In: *Free radicals, aging and degenerative diseases*. New York: Alan R. Liss, 1986. p. 3-40.
- HARRISON, D.G., ARMSTRONG, M.L., FREIMAN, P.C., HEISTAD, D.D. Restoration of endothelial-dependent relaxation by dietary treatment of atherosclerosis. *J. Clin. Invest.*, 80:1808-1811, 1987.
- HAVEL, R.J., EDER, H.A., BRADSON, H.J. *J. Clin. Invest.*, 34:1345-1353, 1955.
- HEINECKE, J. W., BACKER, L., ROSEN, H., CHAIT, A. Superoxide-mediated modification of low-density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.*, 77:757-761, 1986.
- HENNING, B., SHASBY, D.M., SPECTOR, A.A. Exposure to fatty acid increases human low density lipoprotein transfer across cultured endothelial monolayers. *Circ. Res.*, 57:776-780, 1986.
- HENRIKSEN, T., MAHONEY, E. M., STEINBERG, D. Interactions of plasma lipoproteins with endothelial cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 401:102-115, 1982.
- HEUIL, D.J., HALLÉN, K., FEELISCH, M., GRISHAM, M.B. Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood. *Free Rad. Biol. Med.*, 28:409-417, 2000.
- HIRAMATSU, K., ARIMORI, S. Increased superoxide production by mononuclear cells of patients with hypertriglyceridemia and diabetes. *Diabetes*, 37:832-837, 1988.
- HIXSON, J. E., BRITEN, M. L., MANIS, G. S., RAINWATER, D. Apoprotein(a) apo(a) glycoprotein isoforms result from size deferences in apo(a) mRNA in baboons. *J. Biol. Chem.*, 264:6013-6016, 1989.
- HODIS, H.N., KRAMSCH, D. M., AVOGARO, P., BITTOLO-BON, G., CAZOLATO, G., HWANG, J., PETERSON, H., SEVANIAN, A. Biochemical and citotoxic characteristics of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL-). *J. Lipid Res.*, 35:669-677, 1994.
- HODIS, H.N., MACK, W.J., LABREE, L., SELZER, R.H., LIU, C.H., ALAUPOVIC, P., KWONG-FU, H., AZEN, S.P., Reduction in carotid arterial wall thickness using lovastatin and dietary therapy: a randomized, controlled clinical trial. *Ann. Intern. Med.*, 124:548-556, 1996.
- HOGG, N., DARLEY-USMAR, V.M., WILSON, M.T., MONCADA, S. The oxidation of  $\alpha$ -tocopherol in human low-density-lipoprotein by the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *FEBS Lett.*, 326:199-203, 1993.
- HOGG, N., KALYNARAMAN, B., JOSEPH, J., STRUCK, A., PARTHESARATHY, S. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. *FEBS Lett.*, 334:170-174, 1993.
- HOPKINGS, G.L., WILLIAMS, R.R. A survey of 246 suggested coronary risk factors. *Atherosclerosis*, 40:1-52, 1981.
- HORWITT, M.K., HARVEY, C.C., DAHM, D.H., SEARCY, M.T. Relationship between tocopherol and serum lipid levels for determination of nutritional adequacy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 203:223-236, 1972.



- HUI, D.Y., BRECHT, W.J., HALL, E.A., FRIEDMAN, G., INNERARITY, T.L., MAHLEY, R. W. Isolation and characterization of the apolipoprotein E receptor from canine and human liver. *J. Biol. Chem.*, 261:4256-4257, 1986.
- IMAI, H., WERTHESSEN, N. T., TAYLOR, C. B., LEE, K. T. Angiotoxicity and arteriosclerosis due to contaminants of USP-grade cholesterol. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 100(11):565-72, 1976.
- IMAI, H., WETHESSEN, N. T., SUBRAMANYAM, V., LEQUOSNE, P. W., SOLOWAY, A. H., KANISAWA, M. Angiotoxicity of oxygenated sterols and possible precursors. *Science*, 207:651-653, 1980.
- IMAI, Y., MORITA, M., KURIHARA, H., SUGIYAMA, T., KATO, N., EBIHARA, A., HAMADA, C., KURIHARA, Y., SHINDO, T., OH-HASHI, Y., YAZAKI, Y. Evidence for association between paraoxonase gene polymorphisms and atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis*, 149:435-442, 2000.
- INOUE, A., YANAGISAWA, M., KIMURA, S. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:2863-2867, 1989.
- INOUE, K., AKAIKE, T., MIYAMOTO, Y., OKAMOTO, T., SAWA, T., OTAGIRI, M., SUZUKI, S., YOSHIMURA, T., MAEDA, H. Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin. *J. Biol. Chem.* 274:27069-27075, 1999.
- ISCHIROPOULOS, H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.*, 356:1-11, 1998.
- JARASCH, E. D., GRUND, C., BRUDER, G., HEID, H. W., KEENAN, T.W., FRANKE, W.W. Localization of xantine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell*, 25:67-82, 1981.
- JIALAL, I., DEVARAJ, S. Low density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin. Chem.*, 42:498-506, 1996.
- JOHNSON, W.J., MAHLBERG, F.H., ROTHBLAT, G.H., PHILLIPS, M.C. Cholesterol transport between cells and high-density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Acta*, 1085:273-298, 1991.
- JOURD'HEUIL, D., LAROUX, F.S., MILES, A.M., WINK, D.A., GRISHAN, M.B. Effect of superoxide dismutase on the stability of S-nitrosothiols. *Arch. Biochem. Biophys.* 361:323-330, 1999.
- JÜRGENS, G., HOFF, H.F., CHISOLM, G.M., ESTERBAUER, H. Modification of human serum low density lipoprotein by oxidation - characterization and pathophysiological implications. *Chem. Phys. Lipids*, 45:315-336, 1987.
- KEANEY, J.F., GAZIANO, J.M., XU, A., FREI, B.B., CURRAM-CELENTANO, J., SHWAERY, G.T., LOSCALZO, J.A. Low-dose  $\alpha$ -tocopherol improves and High-dose  $\alpha$ -tocopherol worsens endothelial vasodilatador function in cholesterol-fed rabbits. *J. Clin. Invest.*, 93:844-851, 1994.
- KELM, M., FEELISCH, M., SPAHR, R., PIPER, H. M., NOACK, E., SCHRADER, J. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 15;154(1):236-44, 1988.
- KELM, M., PREIK, M., HAFNER, D. J., STRAUER, B. E. Evidence for a multifactorial process involved in the impaired flow response to nitric oxide in hypertensive patients with endothelial dysfunction. *Hypertension*, 27(3 Pt 1):346-53, 1996.



- KHAN, J., BRENNAN, D.M., BRADLEY, N., GAO, B., BRUCKDORFER, R., JACOBS, M. 3-nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method. *Biochem. J.*, 330:795-801, 1998.
- KISSNER, R., NAUSER, T., BUGNON, P., LYE, P. G., KOPPENOL, W. H. Formation and properties of peroxyxynitrite as studied by laser flash photolysis, high pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chem. Res. Toxicol.*, 10:1285-1292, 1997.
- KOBAYASHI, M., UESUGI, S. The role of hypertension as a risk factor of atherosclerosis. *Rinsho Byori*, 43:104-110, 1995.
- KONNEH, M.K., RUTHERFORD, C., ANGGARD, E., FERNS, G.A. Tissue distribution of alpha-tocopherol following dietary supplementation in the rat: effects of concomitant cholesterol feeding. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 210:156-161, 1995.
- KONTUSH, A., HUBNER, C., FINCKH, B., KOHLSCHUTTER, A., BEISIEGEL, U. How different constituents of low density lipoprotein determine its oxidizability by cooper: a correlational approach. *Free Rad. Res.*, 24:135-147, 1996.
- KOZLOV, A.V., SERGIENKO, V.I., VLADIMIROV, I.A., AZIZOVA, O.A. The antioxidant system of transferrin-ceruloplasmin in experimental hypercholesterolemia. *Biull. Eksp. Biol. Med.*, 98:668-671, 1984.
- KRIEGER, M., ACTON, S., ASHKENAS, J., PEARSON, A., PENMAN, M., RESNICK, D. Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis. Structure, binding properties, and functions of macrophage scavenger receptors. *J. Biol. Chem.*, 268(7):4569-72, 1993.
- KUAR, H., HALLIWELL, B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS letters*, 350:9-12, 1994.
- KUMAR, K.V., DAS, U.N. Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? *Free Rad. Res. Comms.*, 19:59-66, 1993.
- KUO, W. N., KANADIA, R. N., SHANBLHAG, V. P., TORO, R. Denitration of peroxyxynitrite-treated proteins by "protein nitrates" from rat brain and heart. *Mol. Cell Biochem.*, 201:11-16, 1999.
- LAURINDO, F. R. M., PEDRO, M. A., BARBEIRO, H. V., PILEGGI, F., CARVALHO, M. H. C., AUGUSTO, O., LUZ, P. L. vascular free radical release. ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism. *Circ. Res.*, 74:700-709, 1994.
- LEUS, F.R., WITTEKOEK, M.E., PRINS, J., KJASTELEIN, J.J.P., VOORBIJ, H.A.M. Paraonase gene polymorphisms are associated with carotid arterial wall thickness in subjects with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 149:371-377, 2000.
- LEVINE, G.N., FREI, B. B., KOULOURIS, S.N., GERHARD, M.D., KEANEY, J.F., VITA, J.A. Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 93:1107-1113, 1996.
- LIND, L., GRANSTAM, S. O., MILLGARD, J. Endothelium-dependent vasodilation in hypertension: a review. *Blood Press.*, 9(1):4-15, 2000.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGHT, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-269, 1951.
- LUDENBERG, J.O.N., WEITZBERG, E. Non enzymatic nitric oxide production in humans. *Nitric oxide: Biol. Chem.*, 2:1-7, 1998.
- LUSCHER T., NOLL G. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis*, Suppl 118:81-90, 1995.

- LUSCHER, T. F., SEO, B.G., BUHLER, F.R. Potential role of endothelin in hypertension: controversy on endothelin in hypertension. *Hypertension*, 21:752-757, 1993.
- LYNCH, S.M., FREI, B.B. Antioxidants as anti-atherogens: animal studies. In: FREI, B.B., ed. *Natural Antioxidants in human health & disease*. Academic Press, 1994.
- LYONS, D. Impairment and restoration of nitric oxide-dependent vasodilatation in cardiovascular disease. *Int J Cardiol*, 62:Suppl.2:101-109, 1997.
- MACKNESS, M.I., ARROL, S., ABBOTT, C., DURRINGTON, P.N., Protection of low density lipoprotein against oxidative modification by high density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis*, 104:129-135, 1993.
- MACKNESS, M.I., MACKNESS, B., DURRINGTON, P.N., CONNELLY, P.W., HEGELE, R.A. Paraoxonase : biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.*, 7:69-76, 1996.
- MALEY, A. M., GREENE, A. L., IZUMO, S. Regulation of endothelin-1 gene by fluid shear stress is transcriptionally mediated and independent of protein kinase C and cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:5999, 1990.
- MALO-RANTA, U., YLÄ-HERTTUALA, S., METSÄ-KETELÄ, T., JAAKKOLA, O., MOILANEN, E., VUORINEN, P., NIKKARI, T. Nitric oxide donor GEA 3162 inhibits endothelial cell mediated oxidation of low density lipoprotein. *FEBS Lett.*, 337:179-183, 1994.
- MANUCK, S.B., KAPLAN, J.R., MATTHEWS, K.A. Behavioral antecedents of coronary heart disease and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*, 6:2-14, 1986.
- MARTIN, W., VILLANI, G., JOTHIANANDAN, D., FURCHGOTT, R.F. Blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation of rabbit aorta by certain ferrous hemoproteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 233:679-685, 1985.
- MATTHYS, K.E., VAN HOVE, C.E., JORENS, P.G., ROSSENEU, M., MARESCAU, B., HERMAN, A.G., BULT, H. Dual effects of oxidized low-density lipoprotein on immune-stimulated nitric oxide and prostaglandin release in macrophages. *H. Eur. J. Pharmacol.*, 298:97-103, 1996.
- MAY, J. M. How does ascorbic acid prevent endothelial dysfunction? *Free Radic. Biol. Med.*, 1;28(9):1421-9, 2000.
- MCCARRON, R.M., WANG, L., STANIMIROVIC, D.B., SPATZ, M. Endothelin induction of adhesion molecule expression on human brain microvascular endothelial cells. *Neurosci. Lett.*, 156:31-34, 1993.
- MCLEAN, J.W., TOMLINSON, J.E., KUANG, W.J., EATON, D.L., CHEN, E.Y., FLESS, G.M. cDNA sequence of human apoprotein (a) is homologous to plasminogen. *Nature*, 330:132-137, 1982.
- MEADE, T.Y., NORTH, W.R.S., CHAKRABARTI, R., STIRLING, Y., HAINES, A.P., THOMPSON, S. G. Haemostatic function and cardiovascular death: early results of a prospective study. *Lancet*, 1:1050-1054, 1980.
- MIHM, M. J., JING, L., BAUER, J. A. Nitrotyrosine causes selective vascular endothelial dysfunction and DNA damage. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 36(2):182-7, 2000.
- MINOR JR., R.L., MYERS, P.R., GUERRA JR., R., BATES, J.N., HARRISON, D.G. Diet-induced Atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J. Clin. Invest.*, 86:2109-2116, 1990.
- MOORE, K., ROBERTS, J. Measurement of lipid peroxidation. *Free Rad. Res.*, 28:659-671, 1998

- MOORE, P. K., DARLEY-USMAR, V., MORROW, J., ROBERTS, L.J. Formation of F<sub>2</sub>-Isoprostanes during oxidation of human low-density lipoprotein and plasma by peroxynitrite. *Circ. Res.*, 77:335-341, 1995.
- MOREL, D. W., DICORLETO, P. E., AND CHISOLM, G. M. Endothelium and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerose*, 4:357-364, 1984.
- MOREL, D.W., DICORLETO, P.E., CHILSOM, G.M. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoproteins in vitro by free radical oxidation. *Atherosclerosis*, 4:357-364,1984.
- MORIEL, P., ABDALLA, D.S.P. Nitrotyrosine bound to beta-VLDL-apoproteins: a biomarker of peroxynitrite formation in experimental atherosclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 232:332-335, 1997.
- MORROW, J.D., ROBERTS, L.J. The isoprostanes:unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog. Lipid Res.*, 36:1-21, 1997.
- MOSHAGE, H., KOK, B., HUIZENGA, J. R., JANSEN, P. L. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin. Chem.*,41(6 Pt 1):892-6, 1995.
- MÜGGE, A., ELWELL, J.H., PETERSON, T.E., HOFMEYER T.G., HEISTAD D.D., HARRISON, D.G. Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ. Res.*, 69:1293-300, 1991.
- MURAKAMI, H., TAMASAWA, N., MATSUI, J., YASUJIMA, M., SUDA, T. Plasma oxysterols and tocopherol in patients with diabetes mellitus and hyperlipidemia. *Lipids*, 35(3):333-8, 2000.
- NAKAZONO, K., WATANABE, N., MATSUNO, K., SASAKI, J., SATO, T., INOUE, M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 15;88(22):10045-8, 1991.
- NAVA, E., NOLL, G., LUSCHER, T.F. Nitric oxide in the cardiovascular diseases. *Ann Med*, 27:343-351, 1995
- NAVAB, M., BERLINER, J.A., WATSON, A.D., HAMA, S.Y., TERITTO, M.C., LUSIS, A.J., SHIH, D.M., VAN LENTEN, B.J., FRANK, J.S., DERNER, L.L., EDWARDS, P.A., FOGELMAN, A.M. The Yin and yang of the oxidation in the development of the fatty streak. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 16:831-842,1996.
- NILSSON, J. Growth factors and the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 62:185-199,1986.
- NOGUCHI, N., NUMANO, R., KANEDA, H., NIKI, E. Oxidation of lipids in low-density lipoprotein particles. *Free Rad. Res.*,29:43-52, 1998
- NUNES, G.L., ROBINSOSN, K., KALYNYCH, A., KING, S.B., SGOUTAS, D.S., BERK, B. C. Vitamins C and E inhibit O<sub>2</sub><sup>-</sup> production in the pig coronary artery. *Circulation*, 96:3593-3601, 1997.
- O'BRIEN, K.D., CHAIT, A. The biology of the artery wall in aterogenesis. *Med. Clin. North Am.* 78:41-67, 1994.
- OHARA, Y., PETERSON, T.E., HARRISON, D.G. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.*, 91:2546-2551, 1993.
- PANZA J.A., QUYYUMI A., JR, J. E.B., EPSTEIN S. Abnormal Endothelium-dependent vascular relaxion in patients with essential hypertension. *The New England Journal of Medicine*, 323:22-27, 1990.

- PANZA, J.A., GARCÍA, C.E., KILCOYNE, C.M., QUYYUMI, A.A., CANNON III, R.O. Impaired Endothelium-Dependent Vasodilatation in Patients with Essential Hypertension. *Circulation*, 91:1732-1738, 1995.
- PARTHASARATHY, S., AUGÉ, N., SANTANAN, N. Implications of Lag Time Concept in the oxidation of LDL. *Free Rad. Res.*, 28:583-591, 1998.
- PARUMS, D.V., BROWN, D.L., MITCHINSON, M.J. Serum antibodies to oxidized LDL. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 114:383-387, 1990.
- PENG, S. K., HU, B., MORIN, R. J. Angiotoxicity and atherogenicity of cholesterol oxides. *J. Clin. Lab. Anal.*, 5:144-152, 1991.
- PENG, S. K., SEVANI, A., MORIN, R. J. Cytotoxicity of cholesterol oxides. In: Biological effects of cholesterol oxides, Peng S.K.; Morin, R.J., eds. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, pp 147-166, 1992.
- PENG, S. K., THAM, P., TAYLOR, C. B., MIKKELSON, B. Cytotoxicity of cholesterol oxidation derivatives on cultured aortic smooth muscle cells and their effect on cholesterol biosynthesis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 32:1033-1042, 1979.
- PIGNOLI, P., TREMOLI, E., POLI, A., ORESTE, P., PAOLETTI, R. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation*, 74:1399-1406, 1986.
- PROCTOR, P.H., MCGINNESS, J.E. Superoxide production by homocysteine. *Age*, 7:143, 1984.
- PUDDU, P., PUDDU, G. M., ZACA, F., MUSCARI, A. Endothelial dysfunction in hypertension. *Acta. Cardiol.*, 55(4):221-32, 2000.
- QUINN, M.T., PARTHASARATHY, S., STEINBERG, D. Lysophosphatidyl choline: A chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2805-2809, 1988.
- RADI, R., BECKMAN, J.S., BUSH, K.M., FREEMAN, B.A. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 266:4244-4245, 1991.
- RADI, R., BECKMAN, J.S., BUSH, K.M., FREEMAN, B.A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 288:481-487, 1991.
- RAPACZ, J., TAYLOR, K. M., CHECOVICH, W. J., ATTLE, A. D. Lipoprotein mutations in pigs are associated with elevated plasma cholesterol and atherosclerosis. *Science*, 234:1573-1577, 1986.
- REGNSTRÖM, J., NILSSON, J. Lipid oxidation and inflammation-induced fibrosis in coronary heart disease. *J. Lab. Clin. Med.*, 124:162-168, 1994.
- REILLY, M.P., DELANTY, M.B., ROY, L., ROKACH, J., CALLAGHAN, P.O., CREAN, P., LAWSON, J.A., FITZGERALD, G.A. Increased formation of the isoprostanes IPF<sub>2α</sub> -I and 8-Epi-prostaglandin F<sub>2α</sub> in acute coronary angioplasty. *Circulation*, 96:3314-3320, 1997.
- REILLY, M.P., DELANTY, N., LAWSON, J.A., FITZGERALD, G.A. Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation*, 94:19-25, 1996.
- REINHART, W.R. Shear-dependence of endothelial functions. *Experientia*, 50:87-93, 1994.
- REITER, C. D., TENG, R. J., BECKMAN, J. S. Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J. Biol. Chem.*, 275(42):32460-6, 2000.



- RHODIN, J.A.G. Architecture of the vessel wall. In: BORH, D.F., SOMLYO, A.P., SPARKS JR, H.V., eds. *Handbook of physiology*. Bethesda : American Physiology Society, 1980. v. 2, p. 1-31.
- RIKITAKE, Y., HIRATA, K., KAWASHIMA, S., INOUE, N., AKITA, H., KAWAI, Y., NAKAGAWA, Y., YOKOYAMA, M. Inhibition of endothelium-dependent arterial relaxation by oxidized phosphatidylcholine. *Atherosclerosis*, 152(1):79-87, 2000.
- ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis - an update. *N. Engl. J. Med.*, 314:488-500, 1986.
- RUBANYI, G.M., VANHOUTTE, P.M. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, 250:815-821, 1986.
- RUBBO, H., FREEMAN, B.A. Nitric oxide regulation of lipid oxidation reactions: formation and analysis of nitrogen containing oxidized lipid derivatives. *Methods in Enzimol.*, 269:385-394, 1996.
- RUBBO, H., RADI, R., TRUJILLO, M., TELLERI, R., KALYANARAMAN, B., BARNES, S., KIRK, M., FREEMAN, B.A. *J. Biol. Chem.*, 269:26066-26075, 1995.
- SARKS, T., MODOW, C.F., CRADDOCK, P.R., BOWERS, T.K., JACOBS, H.S. Oxygen radicals mediate endothelial damage complement-stimulated granulocytes. *J. Clin. Invest.*, 61:1161-1167, 1978.
- SCANU, A.M. Lp(a) as a marker for coronary heart disease risk. *Clin. Cardiol.*, 14:35-39, 1991.
- SCHIFFRIN, E.L. Endothelin and endothelin antagonists in hypertension. *J. Hypertens.*, 16:1891-1895, 1998.
- SCHIFFRIN, E.L. Endothelin: potential role in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension*, 25:1135-1143, 1995.
- SCHINI, V.B., VANHOUTTE, P.M. L-arginine evokes both endothelium-dependent and independent relations in L-arginine-depleted aortas of the rat. *Circ. Res.*, 68:209-216, 1991.
- SCHMIDT, K., KLATT, P., GRAIER, W.F., KOSTNER, G.M., KOKOVETZ, W.R. High density lipoprotein antagonize the inhibitory effects of oxidized low density lipoprotein and lysolecithin on soluble guanylyl cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 182:302-308, 1992.
- SCHMIEDER, R.E. Impairment endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia: potential mechanisms and differences. *J. Hypertens.*, 18:363-374, 2000.
- SCHWEDHELM, E., TSIKAS, D., GUTZKI, F.M., FRÖLICH, J.C. Gas chromatographic-tandem mass spectrometric quantification of free 3-nitrotyrosine in human plasma at the basal state. *Anal. Biochem.*, 276:195-203, 1999.
- SELLMAYER, A., HRBOTICKY, N., WEBER, P.C. Lipids in vascular function. *Lipids*, 34:S13-S18, 1999.
- SEVANIAN, A. E PETERSON, A.R. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. *Food Chem. Toxicol.*, 24:1103-1110, 1986.
- SEVANIAN, A., BERLINER, J., PETERSON, H. Uptake, metabolism and cytotoxicity of isomeric cholesterol-5, 6-epoxides in rabbit aortic smooth muscle cells. *J. Lipid Res.*, 32:147-155, 1991.
- SEVANIAN, A., HODIS, H.N., HWANG, J., PETERSON, H. In: Free Radicals, Lipoprotein oxidation and atherosclerosis, Bellomo, G., Finardi, G., Maggi, E., Rice-Evans, C., eds., Richilieu Press, London, pp. 139-161, 1995.
- SEVANIAN, A., SERAGLIA, R., TRALDI, P., ROSSATO, P., URSINI, F., HODIS, H. Analysis of plasma cholesterol oxidation products using Gas- and High



- Performance Liquid Chromatography/Mass spectrometry. *Free Rad. Biol.*, 17, n° 5: 397-409, 1994.
- SHIGE, H., ISHIKAWA, T., SUZUKAWA, M., NISHIWAKI, M., YAMASHITA, T., NAKAJIMA, K., ITO, T., HIGASHI, K., AYAORI, M., YONEMURA, A., NESTEL, P., NAKAMURA, H. Vitamin E reduces cholesterol esterification and uptake of acetylated low density lipoprotein in macrophages. *Lipids*, 33:1169-1175, 1998.
- SILVA, E.L., MORIEL, P., CHANG, Y.H., ABDALLA, D.S.P. Plasma antioxidant enzymes and oxidized lipoproteins in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 36:679-687, 1995.
- SIMON, B.C., CUNNINGHAM, L.D., COHEN, R.A. Oxidized low density lipoproteins cause contraction and inhibit endothelium-dependent relaxation in the pig coronary artery. *J. Clin. Invest.*, 86:75-79, 1990.
- SIMON, J.A. Vitamin C and cardiovascular disease: a review. *J. AM. Coll. Nutr.*, 11:107-125, 1992.
- SIMONSON, M.S., DUNN, M.J. *ACE report*, 64:1-8, 1990.
- SOUZA, J. M., DAIKHIN, E., YUDKOFF, M., RAMAN, C. S., ISCHIROPOULOS, H. Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. *Arc. Biochem. biophys.*, 371:169-178, 1999.
- SRINIVAS, K., BHASKAR, M. V., ARUNA KUMARI, R., NAGARAJ, K., REDDY, K. K. Antioxidants, lipid peroxidation and lipoproteins in primary hypertension. *Indian Heart J.*, 52(3):285-8, 2000.
- STALLER, W., CHRISTISON, J., STOKER, R. Cholesteryl ester hydroperoxide reducing activity associated with isolated high- and low density lipoproteins. *Free Radical Biol. Med.*, 18:421-429, 1995.
- STAMLER, J.S., JARAKI, O., OSBORNE, J., SIMON, D.I., KEANEY, J., VITA, J., SINGEL, D., VALERI, C.R., LOSCALZO, J. Nitric oxide in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89:7674-7677, 1992.
- STEEGE, J.C.A., KOSTER-KAMPHUIS, L., STRAATEN, E.A.V., FORGET, P.P., BUURMAN, W.A. Nitrotyrosine in plasma of celiac disease patients as detected by a new sandwich ELISA. *Free Rad. Biol. Med.*, 25:953-963, 1998.
- STEINBERG, D., PARTHASARATHY, S., CAREW, T. E., KHOO, J.C., WITZTUM, J.L. Beyond cholesterol - Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, 320:915-924, 1989.
- STEINBERG, H.O., BAYAZEED, B., HOOK, G., JOHNSON, A., CRONIN, J., BARON, A.D. Endothelial dysfunction is associated with cholesterol levels in high normal range in humans. *Circulation*, 96:3287-3293, 1997.
- STEINBRECHER, U. P. Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1436(3):279-98, 1999.
- STEINBRECHER, U.P., WITZTUM, J.L., PARTHASARATHY, S., STEINBERG, D. Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. Correlation with changes in receptor-mediated catabolism. *Arteriosclerosis*, 7:135-143, 1987.
- STEINBRECHER, U.P., ZHANO, H., LOUGHEED, M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radical Biol. Med.*, 9:155-166, 1990.
- TABER, D.F., MORROW, J.D., ROBERTS, L.J. A nomenclature system for the isoprostanes. *Prostaglandins*, 53:63-67, 1997.

- TABRIZI-FARD, M. A., MAURER, T. S., FUNG, H. L. In vivo disposition of 3-nitro-L-tyrosine in rats: implications of tracking systemic peroxy-nitrite exposure. *Drug. Metab. Dispos.*, 27:429-431, 1999.
- TADDEI, T., VIRDIS, A., GHIADONI, L., SALVETTI, A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilatation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation*, 97:2222-2229, 1998.
- TAKUWA, Y., YANAGISAWA, M., TAKUWA, N., MASAKI, T. Endothelin, its diverse biological activities and mechanisms of action. *Prog. Growth Factor Res.*, 1:195-206, 1989.
- TAN, M. H., SATA, T., HAVEL, R. J. The significance of lipoprotein lipase in the rat skeletal muscles. *J. Lipid Res.*, 18:363-370, 1977.
- TASAKA, K., KITAZUMI, K. The control of endothelin-1 secretion. *Gen. Pharmacol.*, 25:1059-1069, 1994.
- TAYLOR, C. B., PENG, S. K., WERTHESSEN, N. T., THAM, P., LEE, K. T. Spontaneously occurring angiotoxic derivatives of cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.*, 32(1):40-57, 1979.
- TERAO, J., FUKINO, N. Decomposition of phospholipid hydroperoxides in simulated gastric juice. *Journal of Food Lipids*, 1:79-86, 1993.
- TERASAWA, Y., YOSHIKAWA, T., YOSHIDA, N., MANABE, H., NAKAMURA, Y., TAKEMURA, T., TANIGAWA, Y., KONDO, M. Alpha-tocopherol inhibits expression of adhesion molecules on leukocytes and vascular endothelial cells. In: *Biennial Meeting International Society for Free Radical Research*, 7., 1996. N. 123.2.
- THURNHAN, D.I., SMITH, E., FLORA, P.S. Concurrent liquid-chromatographic assay of retinol,  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -carotene, lycopene and  $\beta$ -cryptoxanthin. *Clin. Chem.*, 34:337-343, 1988.
- THYBERG, J., HEDIN, U., SJÖLUND, M., PALMEMBERG, L., BOTTGER, B. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis*, 10:966-990, 1990.
- TIKKANEN, I. E. FYHRQUIST, F. Nitric oxide in hypertension and renal diseases. *F. Ann. Med.*, 27:353-357, 1995.
- TOWBIN, B., STAEHELIN, T., GORDON, J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:4325-4354, 1979.
- TRABER, M.G., COHN, W., MULLER, D.P.R. Absorption, transport and delivery to tissues. In: PACKER, L., FUCHS, J. eds. *Vitamin E in health and disease*. Marcel Dekker, 1992, p. 35-52.
- TSAO, C.S., SALIMI, S.L. Ultramicromethod for the measurement of ascorbic acid in plasma and white blood cells by high-performance liquid chromatography with electrochemical. *J. Chromatogr.*, 224:477, 1981.
- TSCHUDI, M. R., MESAROS, S., LUSCHER, T. F., MALINSKI, T. Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension*, 27(1):32-5, 1996.
- UTERMANN, G. The mysteries of lipoprotein (a). *Science*, 246, 904-910, 1989.
- UYAMA, H., HARAOKA, S., SHIMOKAMA, T., GOTO, K., DOHI, K., WATANABE, T. Diet-induced hypercholesterolemia increases endothelin-1 release by aortic endothelial cells. *Phatobiology*, 64:328-332, 1996.

- VAN DER VLIET, A., SMITH, D., O'NEILL, C.A., KAUR, H., DARLEY-USMAR, V., CROSS, C.E., HALLIWELL, Interactions of peroxynitrite with human plasma and its constituents: oxidative damage and antioxidant depletion. *B. Biochem. J.*, 303:295-301, 1994.
- VAN LENTE, F. Markers of inflammation as predictors in cardiovascular disease. *Clin. Chim. Acta.*, 293(1-2):31-52, 2000.
- WATSON, A.D., BERLINER, J.A., HAMA, S.Y., LA DU, B.N., FAULL, K.F., FOGELMAN, A.M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J. Clin. Invest.*, 96:2882-2891, 1995.
- WENNMALM, A., BENTHIN, G., EDLUND, A., JUNGERSTEN, L., KIELER-JENSEN, N., LUNDIN, S., WESTFELT, U. N., PETERSSON, A. S., WAAGSTEIN, F. Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. An experimental and clinical study. *Circ. Res.*, 73(6):1121-7, 1993.
- WEVER, R., STROES, E., RABELINK, T. J. Nitric oxide and hypercholesterolemia: a matter of oxidation and reduction? *Atherosclerosis*, 137: S51-S60, 1998.
- WHITE, C.R., BROCK, T.A., CHANG, L.Y., CRAPO, J., BRISCOE, P., KU, D., BRADLEY, W.A., GIANTURCO, S.H., GORE, J., FREEMAN, B.A., TARPEY, M.M. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:1044-1048, 1994.
- WIDHALM, K., HOLZL, M., BRUBACHER, G. Lipids, lipoproteins and alpha-tocopherol: relationship and changes during adolescence. A longitudinal study. *Ann. Nutr. Metab.*, 29:12-18, 1985.
- WILHELMSSEN, L., SVARDSUDD, K., KORSAN-BENGTSEN, K., LARSSON, B., WELIN, L., TIBBLIN, G., Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.*, 311:501-505, 1984.
- WILLIAMS, D.L.H. S-nitrosothiols and role of metal ions in decomposition to nitric oxide. *Methods Enzymol.*, 268:299-308, 1996.
- WITZUM, J.L., STEINBERG, D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.*, 88:1785-1792, 1991
- YAMAGISAWA, M., KURIHARA, H., KIMURA, S., TOMOBE, Y., KOBAYASHI, M., MITSUI, Y., YAZAKI, Y., GOTO, K., MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332:411-415, 1988.
- YANAGISAWA, M., KURIHARA, H., KIMURASS. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332:411-415, 1988.
- YANG, X., CAI, B., SCIACCA, R.R., CANNON, P.J. Inhibition of inducible nitric oxide synthase in macrophages by oxidized low-density lipoproteins. *Circ. Res.*, 74:318-328, 1994.
- YARNELL, J.W.G., BAKER, I.A., SWEETNAM, P.M., BAINTON, D., O'BRIEN, J.R., WHITEHEAD, P.J., ELWOOD, P.C. Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease: the Caerphilly and Speedweel collaborative heart disease studies. *Circulation*, 83:836-844, 1991.
- YLA-HERTTUALA, S., PALINSKI, W., ROSENFELD, M. E., CAREW, T.E. PARTHASARATHY, S., BUTLER, S., WITZUM, J.L., STEINBERG, D. Evidence for the presence of oxidatively modified LDL in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J. Clin. Invest.*, 84:1086-1095, 1989.

- ZHANG, X., ZHAO, S. P., LI, X. P., GAO, M., ZHOU, Q. C. Endothelium-dependent and -independent functions are impaired in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*, 149(1):19-24, 2000.
- ZIEDÉIN, B., KAMINSKAS, A., KRISTENSON, M., KUCINSKIENĖ, Z., VESSBY, B., OLSSON, A. G., DICZFALUSY, U. Increased plasma 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol concentrations in a population with a high risk for cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19:967-971, 1999.
- ZOU, M., JENDRAL, M., ULLRICH, V. Prostaglandin endoperoxide-dependent vasospasm in bovine coronary arteries after nitration of prostacyclin synthase. *Br. J. Pharmacol.*, 126(6):1283-92, 1999.
- ZOU, M.H., LEIST, M., ULLRICH, V. Selective nitration of prostacyclin synthase and defective vasorelaxation in atherosclerotic bovine coronary arteries. *Am. J. Pathol.*, 154:1359-1365, 1999.