



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**POLIMORFISMO DA ALA16VAL MnSOD
NA HIPERCOLESTEROLEMIA E SUA ASSOCIAÇÃO
COM BIOMARCADORES DE INFLAMAÇÃO E
ESTRESSE OXIDATIVO**

TESE DE DOUTORADO

Marta Maria Medeiros F. Duarte

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**POLIMORFISMO DA ALA16VAL MnSOD NA
HIPERCOLESTEROLEMIA E SUA ASSOCIAÇÃO COM
BIOMARCADORES DE INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO**

por

Marta Maria Medeiros F. Duarte

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Prof^a. Dra. Vânia Lúcia Loro
Co - orientadores: Prof^a. Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger
Prof^a. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, Rs, Brasil

2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Tese de Doutorado

**POLIMORFISMO DA ALA16VAL MnSOD NA
HIPERCOLESTEROLEMIA E SUA ASSOCIAÇÃO COM
BIOMARCADORES DE INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO**

elaborada por
MARTA MARIA MEDEIROS F. DUARTE

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^ª. Dra. Vânia Lúcia Loro
(Presidente/Orientador)

Prof^ª. Dra. Solange Cristina Garcia (UFRGS)

Prof^ª. Dra. Cristina Wayne Nogueira (UFSM)

Prof^ª. Dra. Maribel Antonello Rubin (UFSM)

Prof. Dr. José Edson Paz da Silva (UFSM)

Santa Maria, 11 de março de 2010.

DEDICATÓRIA

Ao meu filho Thiago, o meu maior motivo de viver! Desejo que a busca por novos conhecimentos nunca deixe de existir na sua vida, independente da idade. Alerto a você que o conhecimento por si só não propicia a felicidade verdadeira se não estiver acompanhado de satisfação e calma. Calma para pensar, para avançar, para olhar. Calma para ver coisas e pessoas importantes, que passam ao nosso redor o tempo todo. Calma para aprender a sugar, da vida, o que ela tem de mais belo, puro, simples e poderoso: o amor.

Ao Paulo, meu amado, meu refúgio! Exemplo de caráter, generosidade, companheirismo, coragem, determinação e otimismo. Obrigado por tem me colocado em sua vida sempre em primeiro plano.

Aos meus pais, que me ensinaram o valor da dignidade... Antônio e Maria de Lourdes. Que sempre me permitiram ir de encontro às minhas aspirações e que me ensinaram que humildade e honestidade são passos fundamentais para a concretização de todo e qualquer objetivo

Aos meus “filhos de coração” Rafael Moresco e Patrícia Gomes, por esse elo inexplicável de carinho, companheirismo e afeto. Pelo ombro amigo, pelos conselhos, pelas parcerias, pela confiança. Vocês foram muito especiais nesta trajetória. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida, me concedendo saúde, paz e a realização de sonhos. “A graça é dada por Deus, mas o conhecimento nasce do esforço” (Autor desconhecido).

Muitas pessoas foram importantes durante toda minha formação acadêmica em diferentes aspectos. De fato, creio ser indispensável, o agradecimento às pessoas que foram fundamentais para a realização deste trabalho, que se agregaram ao grupo daquelas que, desde sempre, contribuíram para meu amadurecimento profissional e pessoal. Desta maneira, segue-se esta pequena lista, pois uma lista completa se torna inviável:

À Professora Dra. Vânia Lúcia Loro, por ter me aceito como orientada, pela amizade, conhecimentos transmitidos e pela atenção dispensada durante o desenvolvimento do meu trabalho.

À Professora Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger, (co-orientadora), pelo zelo, disponibilidade, eficiência e incentivo, que contribuiu de maneira decisiva na realização desta tese.

À Professora Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz (co-orientadora) pelo apoio, amizade, e as lições de garra e sabedoria que dedicou a mim durante o desenvolvimento da minha tese. Obrigado por conduzir-me gentilmente pelo caminho do conhecimento molecular, abrindo-me as portas de novas oportunidades.

Ao Professor Dr. Rafael Noal Moresco, pela amizade e carinho com que sempre me recebeu, e em especial pela sua dedicação e grandiosa contribuição, nas análises estatísticas e em todo o desenvolvimento da tese, que conferiram a este trabalho características singulares, sem as quais, muito se teria perdido. “Os nossos conhecimentos são a reunião do raciocínio e experiência de numerosas mentes.” (Ralph Waldo Emerson).

Sejam também consignados os melhores agradecimentos as minhas colegas Adriana Santi e Margarete D. Bagatini, pelo auxílio técnico, dedicação e pela convivência agradável.

Aos meus sócios, diretores do Labimed, os quais me incentivaram, confiaram no meu trabalho, oportunizando o meu crescimento profissional.

Aos pacientes e seus familiares, que aceitaram participar deste projeto de pesquisa e compartilharam suas histórias de vida; meu muito obrigado;

Aos professores do Programa de Pós Graduação de Bioquímica Toxicológica, pelo espírito empreendedor e pela luta constante para a qualificação profissional de seus alunos.

Aos colegas pela convivência, companheirismo e amizade que certamente continuará por toda nossa existência.

As professoras Cristina Wayne Nogueira, Solange Cristina Garcia Pomblum, e o professor José Edson Paz da Silva, por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta tese. Obrigada Cristina e Solange por estarem acompanhando a minha caminhada na bioquímica toxicológica desde o projeto até este momento tão especial, contribuindo de forma exponencial ao meu crescimento.

Aos amigos cujo apoio e palavras de incentivo, me auxiliaram a manter forte o desejo de conquistar meus objetivos e realizar os meus sonhos, a minha eterna gratidão.

“Os únicos limites das nossas realizações de amanhã são as nossas dúvidas e hesitações de hoje.

(Franklin Roosevelt)

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

Polimorfismo da Ala16Val MnSOD na hipercolesterolemia e sua associação com biomarcadores de inflamação e estresse oxidativo

AUTORA: MARTA MARIA MEDEIROS F. DUARTE
ORIENTADORA: Vânia Lúcia Loro
CO - ORIENTADORES: Maria Rosa Chitolina Schetinger
Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Data e local de Defesa: Santa Maria, 2010.

Este estudo analisou a associação entre o polimorfismo genético da superóxido dismutase dependente de manganês (Ala16Val MnSOD) e biomarcadores oxidativos e inflamatórios em sujeitos hipercolesterolêmicos e controles. Os níveis de colesterol no grupo controle foram de 104 a 178 mg/dL (2.69–4.61 mmol/L) e hipercolesterolêmicos foram de 250 a 529 mg/dL (6.47–13.70 mmol/L). Os biomarcadores estudados foram: colesterol-LDL oxidado (ox-LDL), anticorpos anti-LDL oxidado (Anti-ox-LDL), proteína C reativa ultra-sensível (PCR-us), TBARS, proteína carbonil, grupos tióis, glutathiona (GSH), vitamina C e E, bem como enzimas antioxidantes [superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)]. Adicionalmente foram avaliados os níveis da albumina modificada na isquemia (IMA), bem como o perfil lipídico. Os resultados mostraram uma associação significativa entre hipercolesterolemia e altos níveis de ox-LDL, Anti-ox-LDL, IMA e PCR-us. Esses resultados mostraram uma correlação positiva entre IMA e Anti-ox-LDL, e uma correlação negativa entre HDL e PCR-us associado a hipercolesterolemia. A influência do polimorfismo Ala16Val nos biomarcadores oxidativos e inflamatórios mostrou que os níveis de HDL foram mais baixos em hipercolesterolêmicos com o alelo V (VV + AV). A presente investigação destacou uma correlação positiva entre níveis de colesterol total, TBARS, proteína carbonil e grupos tióis. Nos sujeitos hipercolesterolêmicos ocorreu uma redução dos níveis de GSH e da atividade da SOD, provavelmente devido à inativação da enzima causada pela oxidação da proteína. A atividade da CAT foi aumentada provavelmente para compensar parcialmente o estresse oxidativo. Um aumento nos níveis sorológicos da Vitamina E também foi observado em sujeitos hipercolesterolêmicos. Baseado nos resultados encontrados, sugere-se uma correlação significativa entre hipercolesterolemia e biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo. Estudos prévios tem demonstrado a interação entre o genótipo VV e biomarcadores oxidativos como ox-LDL. Contudo, a redução nos níveis de HDL é relevante em hipercolesterolêmicos VV quando comparados com outros grupos. Funcionalmente, a variante Val MnSOD reduz a eficiência MnSOD aumentando a probabilidade de disfunção endotelial e quando associado a hipercolesterolemia pode contribuir para aumentar o risco de eventos cardiovasculares.

Palavras chave: polimorfismo MnSOD; Ala16Val MnSOD; hipercolesterolemia; inflamação; espécies reativas de oxigênio; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Programme of Post Graduation in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

Ala16Val MnSOD polymorphism in the hypercholesterolemia and its association with inflammation biomarkers and oxidative stress

AUTHOR: MARTA MARIA MEDEIROS F. DUARTE

ADVISER: Vânia Lúcia Loro

CO - ADVISERS: Maria Rosa Chitolina Schetinger
Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Place and Date of the Defense: Santa Maria, 2010.

This study aimed to analyze the association between the genetic polymorphism of the manganese-dependent superoxide dismutase (Ala16Val MnSOD) and the oxidative and inflammatory markers in hypercholesterolemic and control individuals. Cholesterol levels in the control group were 104 to 178 mg/dL (2.69–4.61 mmol/L), while the hypercholesterolemic group presented levels 250 to 529 mg/dL (6.47–13.70 mmol/L). The following biomarkers were also investigated: cholesterol-LDL oxidized (ox-LDL), antibodies anti-LDL oxidized (Anti-ox-LDL), ultra-sensitive C reactive protein (us-CRP), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), carbonyl protein, thiol groups, glutathione (GSH), Vitamins C and E, as well as the superoxide dismutase antioxidant enzymes (SOD) and catalasis (CAT). Additionally, we evaluated the levels of ischemia-modified albumin (IMA), as well as the lipid profile. IMA levels were higher in the hypercholesterolemic group and a significant association between hypercholesterolemia and ox-LDL, Anti-ox-LDL, IMA and us-CRP was observed. A negative correlation between HDL and us-CRP was observed as well. Ala16Val polymorphism influenced the oxidative and inflammatory markers and HDL cholesterol levels were lower in the hypercholesterolemic individuals with the allele V (VV + AV). The present study demonstrated a positive correlation between the total cholesterol levels, TBARS, carbonyl protein and thiol groups. In the hypercholesterolemic individuals there was a reduction in the GSH levels and in the SOD activity, probably due to the enzyme inactivation caused by the protein oxidation. The CAT activity significantly increased probably to partially compensate the oxidative stress. An increase in the Vitamin E serum levels was also observed in the hypercholesterolemic individuals. The group with hypercholesterolemia presented an increase of the oxidative stress, especially for the individuals with a VV genotype to Ala16Val MnSOD polymorphism. TBARS levels, carbonyl protein, thiols groups, Vitamin E and the catalasis activity were significantly higher in the hypercholesterolemic individuals with a VV genotype while GSH and SOD were lower in these individuals. Functionally, the Val MnSOD variant reduces the MnSOD efficiency thus increasing the probability of development of endothelial dysfunction and contributing to the increase in the risk of cardiovascular events, especially when associated to hypercholesterolemia states.

Key words: MnSOD polymorphism; Ala16Val MnSOD; hypercholesterolemia; inflammation; oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 – Formação da placa de ateroma	29
FIGURA 2 – Estrutura e sítios de ligação da albumina	33
FIGURA 3 – Esquema geral de formação de espécies reativas nas células eucarióticas.....	36
FIGURA 4 – Redução completa do O ₂ a H ₂ O.....	37
FIGURA 5 – Dano oxidativo nas macromoléculas biológicas e antioxidantes.	39
FIGURA 6 – Etapas do processo de peroxidação lipídica.....	41
FIGURA 7 – Mecanismo enzimático antioxidante.....	45
FIGURA 8 – Mecanismo de ação da GSH	48
FIGURA 9 – Polimorfismo Ala16Val da MnSOD.....	52

ARTIGO 1

FIGURE 1 – Significant correlations between (A) IMA and total cholesterol, (B) IMA and LDL cholesterol, (C) IMA and ox-LDL antibodies and (D) IMA and hs-CRP.....	58
FIGURE 2 – Significant correlations between (A) hs-CRP and total cholesterol, (B) hs-CRP and HDL cholesterol, (C) hs-CRP and LDL cholesterol, (D) hs-CRP and ox-LDL, (E) hs-CRP and ox-LDL autoantibodies and (F) hs-CRP and triglycerides	59

MANUSCRITO 2

FIGURE 1 – The values of TBARS (A), carbonyl protein (B), GSH (C), thiols (D), SOD (E), catalase (F), vitamin C (G), and vitamin E (H) in control and hypercholesterolemia groups.....	104
--	-----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

TABLE 1 – Baseline characteristics of study participants.....	58
---	----

MANUSCRITO 1

TABLE 1 – Clinical and laboratory characteristics.....	81
TABLE 2 – MnSOD polymorphism genotype frequencies in hypercholesterolemia and healthy (control) groups	82
TABLE 3 – Interaction between Ala16Val MnSOD gene polymorphism and hypercholesterolemia with respect to lipid and inflammatory biomarkers.....	83

MANUSCRITO 2

TABLE 1 – Baseline characteristics of study subjects.....	105
TABLE 2 – Correlations between total cholesterol, hs-CRP and oxidative stress biomarkers.....	106
TABLE 3 – MnSOD polymorphism genotypes and baseline levels of biochemical and oxidative stress parameters of study subjects.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenosina di-fosfato

Ala16Val MnSOD – Polimorfismo da superóxido dismutase dependente de manganês Ala/Val

Anti-ox-LDL – Anticorpos colesterol LDL oxidado

Apo A – Apoproteína A

Apo – Apoproteína

Apo B – Apoproteína B

Apo C – Apoproteína C

Apo E – Apoproteína E

ATP – Adenosina tri-fosfato (ATP).

AVC – Acidente vascular cerebral

CAT – Catalase

CD4 – Linfócitos T CD4

CD8 – Linfócitos T CD8

CE – Células espumosas

CETP – Proteína de transferência de colesterol esterificado

Cis – Cisteína

CT – Colesterol total

Da – Daltons

DC – Doenças cardiovasculares

DM – Diabetes *mellitus*

DM2 – Diabetes *mellitus* tipo II

DNA – Ácido desoxirribunucleíco

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FDA – *Food and Drug Administration*

GO – Glutathione oxidase

GR – Glutathione reductase

GSH – Glutathione

GSHPx – Glutathione peroxidase

GSSG – Glutathiona dissulfeto ou glutathiona oxidada
HDL – Lipoproteína de alta densidade
His – Histidina
HMG-CoA redutase – Hidróxi-metil-glutaril CoA redutase
HNE– 4-hidroxi-2-nonenal
hs-CRP– Proteína C reativa ultrasensível
IAM – Infarto agudo do miocárdio
IDL – Lipoproteína de intermediária densidade
IFN- γ – Interferom γ
IL-1 – Interleucina 1
IL-1 β – Interleucina-1 β
IL-2 – Interleucina - 2
IL-6 – Interleucina 6
IMA – Albumina modificada na isquemia
LCAT – Lecitina colesterol acil transferase
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
Lis – Lisina
LP – Lipoperoxidação
Lp(a) – Lipoproteína A
MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos-1
M-CSF – Fator estimulador das colônias de monócitos
MDA – Malonaldeído
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
MnSOD – Superóxido dismutase dependente de manganês
MTS – *Mitochondrial target sequence*
NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
ox-LDL – Colesterol LDL oxidado
PAF-AH – Fator ativador de plaquetas acetil-hidrolase
PAI-1 – Inibidor do ativador de plasminogênio
PCR – Proteína C reativa
PCR-us – Proteína C reativa ultrasensível
PON1 – Paraoxonase
pro-BNP – Peptídeo natriurético

R[•] – Radical de fosfolípídeo

RH – Ácido graxo insaturado

RL – Radicais livres

SMC – Células musculares lisas

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TG – Triglicerídeos

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

TT – Tióis totais

Vit C – Vitamina C

Vit E – Vitamina E

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1 Dislipidemia.....	22
2.2 Lipoproteínas.....	23
2.3 Metabolismo das Lipoproteínas.....	24
2.4 Hipercolesterolemia.....	26
2.5 Aterosclerose.....	26
2.6 Isquemia.....	30
2.6.1 Albumina Humana.....	31
2.6.2 Albumina Modificada pela Isquemia (IMA).....	33
2.7 Radicais Livres, Espécies Reativas e Estresse Oxidativo.....	35
2.7.1 Indicadores do status oxidante.....	40
2.7.1.1 Oxidação de lipídios.....	40
2.7.1.2 Oxidação de proteínas.....	42
2.7.1.3 Oxidação de DNA.....	43
2.7.2 Defesas antioxidantes	43
2.7.2.1 Antioxidantes enzimáticos	44
2.7.2.1.1 Superóxido Dismutase (SOD).....	44
2.7.2.1.2 Catalase (CAT).....	46
2.7.2.1.3 Sistema Glutationa Peroxidase/Glutationa Redutase (GSHPx)/ (GSHR).....	47
2.7.2.2 Antioxidantes não-enzimáticos.....	48
2.7.2.2.1 Glutationa (GSH).....	49
2.7.2.2.2 Vitamina C (Vit C).....	49
2.7.2.2.3 Vitamina E (Vit E).....	50
2.8 Polimorfismo da Superóxido Dismutase (MnSOD).....	51
3 OBJETIVOS.....	54
3.1 Objetivo geral.....	54
3.1 Objetivos específicos.....	54
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	55

4.1 Artigos 1: Associação entre Albumina Modificada na Isquemia, Lipídios e Biomarcadores Inflamatórios em Pacientes com Hipercolesterolemia.....	56
4.2 Manuscrito 1: Associação entre Hipercolesterolemia e o Polimorfismo da ALA16VAL Superóxido Dismutase.....	63
4.3 Manuscrito 2: Estresse Oxidativo na Hipercolesterolemia e sua Associação com o Polimorfismo da ALA16VAL Superóxido Dismutase.....	85
5 DISCUSSÃO.....	108
6 CONCLUSÕES.....	117
7 PERSPECTIVAS.....	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
ANEXO.....	146
Anexo 01 – Demais trabalhos realizados durante o curso de doutorado.....	135

APRESENTAÇÃO

No item 1, **INTRODUÇÃO**, está descrita uma breve introdução sobre a tese. Os objetivos, geral e específicos, estão organizados no final da introdução.

No item 2, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**, está descrita uma revisão sobre os temas trabalhados nesta Tese.

Os **RESULTADOS** estão dispostos na forma de artigos, um já publicado e os outros dois na forma de manuscritos submetidos à publicação, organizados no item 3. Os artigos científicos estão descritos na íntegra, contendo as seções introdução, materiais e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas.

No item 4, **DISCUSSÃO**, estão apresentados as interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos aqui apresentados.

No item 5, **CONCLUSÕES**, são apresentadas as conclusões gerais do presente trabalho.

No item 6, **PERSPECTIVAS**, estão expostos alguns possíveis estudos para a continuação desse trabalho.

O item 7, **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**, refere-se somente às citações que aparecem nos itens 1, 2 e 5 (Introdução, Revisão Bibliográfica e Discussão).

O item 8, **ANEXO**, refere-se aos demais trabalhos realizados durante o Curso de Doutorado e os artigos aceitos para publicação durante este período.

1 INTRODUÇÃO

A hipercolesterolemia está epidemiologicamente ligada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DC) sendo um importante fator de risco para estas doenças e determinante para o surgimento da aterosclerose. A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica que afeta os vasos sanguíneos incluindo as artérias de grande e médio calibre. Esta doença é caracterizada pela presença de anormalidades lipídicas, inflamação, disfunção endotelial, estresse oxidativo e acúmulo de leucócitos e plaquetas nas paredes das artérias (ROSS, 1999; LUSIS, 2000; HANSSON, 2005; ROCHA e LIBBY, 2009).

A aterogênese ocorre pela excessiva proliferação de vários tipos celulares na íntima arterial, as quais são controladas por fatores de crescimento e citocinas, e pela oxidação e acúmulo do colesterol transportado pela lipoproteína de baixa densidade (colesterol – LDL) intracelular e extracelular. Uma das fases iniciais da aterogênese é a mudança oxidativa do LDL e a absorção das partículas dessa lipoproteína modificada pelos macrófagos que, por sua vez, se transformam em células carregadas, ricas em colesterol, denominadas células espumosas (CE) ou *foam cell*, (MOREL, 1994; ARMSTRONG et al., 2006 a).

A formação do ateroma ou placa aterosclerótica, que diminui o diâmetro interno dos vasos e que pode romper o endotélio levando a eventos cardiovasculares (coronarianos, cerebrais e periféricos), é um processo complexo. No caso, o ateroma é formado por uma capa fibrosa com várias camadas achatadas que estão embebidas em uma matriz extracelular de tecido conjuntivo denso e que contém moléculas como o colágeno e proteoglicanos, além de algumas células musculares lisas (SMC), (ROSS, 1999).

A oxidação do LDL é uma fase obrigatória para a formação das CE, (BATLOUNI, 1997). O LDL atinge a camada íntima dos vasos, onde sofre oxidação por substâncias secretadas por células endoteliais, SMC e macrófagos. Este processo é mediado por espécies reativas de oxigênio (EROs) e catalisado por metais de transição como ferro e cobre (HEINECKE, 1998; HOLVOET, 1998; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; ROCHA e LIBBY, 2009). O LDL oxidado (ox-LDL) estimula a sua captação pelos macrófagos, que através de processos

fagocitários englobam estas moléculas para o seu interior. O ox-LDL é capaz de induzir a produção de moléculas modificadas com efeitos biológicos diversos, capazes de acentuar a disfunção endotelial (SCALIA et al., 1998; KAWAKAMI e YOSHIDA, 2009; WOLBERG e MACKMAN, 2009).

O ox-LDL, por possuir lisofosfatidina, induz a expressão de moléculas como a proteína quimiotáxica para monócitos (MCP-1) e o fator estimulador das colônias de monócitos (M-CSF), os quais estimulam o crescimento e diferenciação de monócitos em macrófagos (LIBBY, 2000). Adicionalmente, o ox-LDL induz os linfócitos B a produzirem anticorpos contra o colesterol ox-LDL (Anti-ox-LDL), a produção de mediadores inflamatórios como a proteína C reativa (PCR), a interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- α), (LAMACK et al., 2005; ARMSTRONG et al., 2006 b; DUARTE et al., 2007; EMMANUEL et al., 2009).

Dada a importância do LDL no processo aterogênico, é conhecido que o estado de hipercolesterolemia está associado ao processo inflamatório que contribui na produção de radicais livres (RL), alterações estruturais e moleculares dos vasos, em especial das artérias e parece também contribuir na modificação da albumina humana, o que aumentaria ainda mais o risco às DC (SBAROUNI et al., 2006; DUARTE et al., 2007; CHO et al., 2007; KONDO et al., 2009). A albumina humana é uma proteína constituída por 585 aminoácidos, sendo que o grupamento N-terminal de sua estrutura constitui um sítio específico de ligação com alguns metais como cobalto (II), cobre (II) e níquel (II), sendo a região mais susceptível à degradação, quando comparadas a outras regiões da albumina. A ligação dessa região da albumina a estes metais pode ser alterada devido à isquemia, hipóxia, acidose ou pela formação e ação de RL, induzindo a formação da albumina modificada na isquemia (IMA), (BAR-OR et al., 2000; FAGAN et al., 2002; MOTHEs e FALLER, 2007; TUREDI et al., 2008), a qual está sendo considerada como um biomarcador de estresse oxidativo (GAZE et al., 2009).

As EROs geradas devido à hipercolesterolemia (PRASAD e KALRA,1993; KOTUR-STEVLJEVIC et al., 2007; TASOULIS et al., 2009), são observadas no sangue, em eritrócitos de ratos e no tecido aórtico de coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol. Nesses animais foi observado um aumento nos níveis plasmáticos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), indicando a ocorrência de peroxidação lipídica. Também foi observado um aumento da atividade das enzimas antioxidantes como as do sistema glutatona peroxidase

(GSHPx)/glutathione redutase (GSHR) e catalase (CAT), bem como a redução da atividade da superóxido dismutase (SOD) e dos níveis de glutathione (GSH), (MANTHA et al., 1996; ERDINÇLER et al., 1997; DELANTY et al., 1997; ZOU et al., 2005; VALKO et al., 2007).

O organismo, a fim de controlar a geração de RL, possui dois sistemas antioxidantes que atuam de modo concomitante: um sistema endógeno enzimático e um sistema não-enzimático que é composto por moléculas oriundas, principalmente da dieta. Entre estas podemos citar a vitamina E (Vit E) que confere proteção à membrana celular por atuar como quelante dos oxidantes produzidos durante a lipoperoxidação. É um importante antioxidante lipofílico e a associação entre as concentrações plasmáticas de Vit E e a redução na gravidade das DC pode ser explicada pela habilidade da Vit E em proteger contra danos teciduais induzidos por oxidantes produzidos na aterosclerose (FREI et al., 1989; AZZI et al., 1995; SALONEN et al., 2001; HASTY et al., 2007). Outro mecanismo proposto para a Vit E é sua ação na inibição das proteínas quinases, prevenindo, assim, o desenvolvimento de lesão aterosclerótica (ROSS e MOLDEUS, 1991). O ácido ascórbico ou vitamina C (Vit C) é um antioxidante hidrossolúvel importante para o organismo. Tem múltiplas propriedades antioxidantes incluindo a habilidade de regenerar α -tocoferóis e neutralizar diretamente os RL (BHATT et al., 2006).

Além das moléculas antioxidantes exógenas outras moléculas são importantes no processo antioxidante como é o caso da lipoproteína de alta densidade (colesterol – HDL). Esta molécula facilita o transporte reverso do colesterol, processo pelo qual o excesso de colesterol proveniente dos tecidos periféricos é transferido para o plasma para ser reciclado ou excretado pelo fígado via bile. O HDL protege o endotélio vascular por apresentar uma ação antitrombótica e antiinflamatória, pois inibe a modificação oxidativa do LDL, o qual é o agente iniciador do processo aterogênico (NG et al., 2005; MINEO et al., 2006; SEETHARAM et al., 2006). Assim, vários estudos sugerem que o HDL atua como um antioxidante devido à sua associação molecular com a paraoxonase (PON1) e com o fator ativador de plaquetas acetil-hidrolase (PAF-AH) (MATTES, 2000; NINO, 2005; VAN ECK et al., 2007; SEO e GOLDSCHMIDT-CLERMONT, 2009).

O sistema antioxidante endógeno envolve a ação de enzimas antioxidantes, uma vez que a respiração celular faz com que haja constante produção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Este é produzido a partir de cerca de 5% do oxigênio inspirado que

não é utilizado nas cadeias bioquímicas mitocondriais para a geração de energia como o composto adenosina tri-fosfato (ATP). Por este motivo, o organismo produz uma enzima, superóxido dismutase (SOD) que dismuta o superóxido em uma molécula de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esta enzima possui três isoformas produzidas a partir de informações oriundas de genes nucleares. Duas SODs, a citoplasmática e a extracelular, são dependentes de cobre/zinco enquanto que uma SOD, mitocondrial, é dependente de manganês para o seu funcionamento metabólico (ZELKO et al., 2002).

A MnSOD é, talvez, a mais potente enzima antioxidante intracelular, pois decompõe os radicais superóxidos em H_2O_2 e O_2 dentro da mitocôndria (WAN et al., 1994). É codificada por um gene (MnSOD), localizado no cromossoma 6q25-2 (ROSENBLUM et al., 1996), que tem sua expressão induzida pelo ox-LDL e pelos mediadores inflamatórios. Por ser produzida no citoplasma, existe na proteína recém formada no retículo endoplasmático rugoso uma pequena sequência que direciona a MnSOD ainda não ativa para dentro da mitocôndria onde será ativada e vai funcionar. Esta sequência é genericamente denominada sequência alvo mitocondrial (*mitochondrial target sequence*, MTS). Estudos genéticos observaram que o gene MnSOD apresenta um polimorfismo genético em sua estrutura composto por uma mutação de base que substitui uma citosina por uma timina. Esta substituição resulta na substituição do resíduo 16 (Ala16Val MnSOD) (WISPE et al., 1989; SHIMODAMATSUBAYASHI et al., 1996) da região MTS. Foi observado que a isoforma MnSOD-Val apresenta dificuldade para ser transportada para o interior da mitocôndria bem como seu funcionamento é menos eficiente quando comparada com a MnSOD-Ala. Esta condição parece diminuir a sua ação antioxidante (SUTTON et al., 2003; KAKKO et al., 2003).

O polimorfismo resulta em três possíveis genótipos: AA, VV e AV (SUTTON et al., 2003; TAUFER et al., 2005; BICA et al., 2008). Os portadores do genótipo VV possuem uma enzima superóxido dismutase menos eficiente, o que também pode produzir estresse oxidativo por acúmulo de superóxido que, por sua vez, atua diretamente na fisiologia e disfunção vascular. Estudos têm demonstrado uma associação entre o polimorfismo Ala16Val MnSOD e DC, disfunção endotelial, e obesidade (KAKKO et al., 2003; LI et al., 2005; GOTTLIEB et al., 2005; DEDOUSSIS et al., 2008;. MONTANO et al., 2009).

Apesar do acúmulo de evidências epidemiológicas que sugerem a associação entre a hipercolesterolemia, marcadores inflamatórios, moleculares, estresse oxidativo e a influência de fatores genéticos envolvendo as DC, ainda sua fisiopatologia não está completamente elucidada. Por tal motivo, a busca de um modelo experimental em seres humanos que possa ser investigado em condições *in vivo*, é de grande relevância. Acredita-se que o polimorfismo do gene da MnSOD seja um modelo-candidato no sentido de agregar maiores informações sobre os processos envolvidos nas patologias caracterizadas por alta morbidade e mortalidade, como a aterosclerose indutora das DC. Adicionalmente, marcadores bioquímicos associados a condições clínicas e sub-clínicas relacionadas com o impacto da hipercolesterolemia no desenvolvimento da aterosclerose e DC é de grande interesse científico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dislipidemias

Dislipidemias são alterações metabólicas lipídicas decorrentes de distúrbios em qualquer fase do metabolismo lipídico, que ocasionam repercussão nos níveis séricos das lipoproteínas. As dislipidemias primárias ou sem causa aparente podem ser classificadas genotipicamente ou fenotipicamente através de análises bioquímicas. Na classificação genotípica, as dislipidemias dividem-se em monogênicas, causadas por mutações em um só gene; e poligênicas causadas por associações de múltiplas mutações que isoladamente não seriam de grande repercussão (JONES et al., 2009).

A classificação fenotípica ou bioquímica considera os níveis do colesterol total (CT), LDL, HDL e triglicerídeos (TG). Compreende quatro tipos principais bem definidos: hipercolesterolemia isolada, ou seja, elevação isolada do LDL, sendo maior ou igual a 160 mg/dL; hipertrigliceridemia isolada: verifica-se elevação isolada dos TG com valores maiores ou iguais a 150 mg/dL, refletindo em um aumento da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL); hiperlipidemia mista onde encontra-se valores aumentados de ambos LDL (maior ou igual a 160 mg/dL) e TG (maior ou igual 150 mg/dL); HDL baixo (homens menor que 40 mg/dL e mulheres menor que 50 mg/dL) isolada ou em associação com aumento de LDL ou de TG (FREDRICKSON et al., 1967; ALWAILI et al., 2009).

Na prática clínica, a grande maioria das dislipidemias primárias é do tipo poligênico, com influência em múltiplos fatores genéticos e ambientais. Em uma pequena porção de casos, é possível identificar formas hereditárias com características peculiares e valores muito elevados de determinada lipoproteína. Quando a dislipidemia é resultado de ações medicamentosas ou conseqüência de alguma doença de base é chamada de secundária como hipotireoidismo, doenças renais parenquimatosas, *diabetes mellitus* (DM), entre outras (OH et al., 2009).

As dislipidemias, especialmente a hipercolesterolemia, estão entre os mais importantes fatores de risco de DC (OSIPOV et al., 2009; KUMAR e CANNON,

2009). São caracterizadas por distúrbios nos níveis de lipídios circulantes com ou sem repercussão sobre o território vascular, associadas a manifestações clínicas diversas. Podem ser influenciadas por distúrbios genéticos e/ou adquiridos (JONES et al., 2009). As variáveis ambientais envolvidas na determinação do perfil lipídico incluem o tabagismo, sedentarismo e dieta. A ingestão calórica excessiva, com elevado teor de gordura e colesterol, está associada a níveis séricos aumentados de CT e da LDL. A redução da HDL, além de hipertensão arterial, tabagismo, diabetes e obesidade estão associados a lesões avançadas de aterosclerose e maior risco de manifestações clínicas da referida doença. Existem também outros fatores envolvidos, porém não controláveis, como a idade, o sexo, a raça e hereditariedade (DE GROOT et al., 2009). Toda hiperlipidemia com hipercolesterolemia isolada, independente da origem, é classificada, de maneira geral, como dislipidemia do tipo IIa de acordo com a ainda válida classificação fenotípica de Fredrickson et al. (1967). Esta classificação é baseada na determinação eletroforética das lipoproteínas e dosagens dos lipídios plasmáticos.

2.2 Lipoproteínas

As lipoproteínas são partículas esféricas que transportam lipídios apolares (insolúveis em água) em seu núcleo. Esses complexos são constituídos por quantidades variáveis de colesterol e seus ésteres, triglicerídios, fosfolipídios e proteínas (apoproteínas). São solúveis no plasma devido à natureza hidrófila da parte protéica (BADIMÓN et al., 2009).

As quatro grandes classes de lipoproteínas plasmáticas em humanos são representadas pelos: Quilomícrons - principal forma de transporte dos triglicerídios da dieta (exógeno) até os tecidos; VLDL - transportam triglicerídios de origem endógena desde o fígado e, em menor quantidade, do intestino delgado para os tecidos; LDL - ricas em colesterol que são transportadas até as células; HDL - atuam na captação do colesterol ao nível celular conduzindo-o até o fígado onde é catabolizado e eliminado. Existe ainda uma quinta classe, as lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) (COOPER, 1997).

As apoproteínas (Apo) promovem e controlam o transporte dos lipídios no plasma e sua captação pelos tecidos. São divididas em vários grupos, mas as mais importantes são: ApoA, ApoB, ApoC, ApoE e a Lipoproteína A [LP(a)]. A ApoA é sintetizada no fígado e intestino e está inicialmente presente nos quilomícrons na linfa, mas é rapidamente transferida para as HDL. A ApoB apresenta-se no plasma em duas formas: apoB100 e apoB48. A apoB100 é o componente protéico das LDL e está também presente nos quilomícrons e VLDL. A apoB48 é somente encontrada nos quilomícrons. A apoB100 é reconhecida por receptores específicos nos tecidos periféricos (BAUMEISTER et al., 2009). A ApoC integra uma família de três proteínas (apoC-I, apoC-II e apoC-III), sendo sintetizadas no fígado e incorporadas pelas HDL. A ApoE é sintetizada no fígado, incorporada ao HDL e transferida, na circulação, para os quilomícrons e VLDL. É, provavelmente, a principal apoproteína envolvida na captação hepática dos quilomícrons remanescentes, ligando-se aos receptores apoB nos tecidos (WILSIE et al., 2006). A Lipoproteína A [LP(a)], por ser homóloga do fibrinogênio, tem sido considerada como aterogênica e trombogênica, independente dos outros valores dos lipídios sanguíneos (AL-BUSTAN et al., 2009; KAWAKAMI e YOSHIDA, 2009).

A estrutura das partículas lipoprotéicas é geralmente formada por um núcleo hidrofóbico de ésteres de colesterol e triglicerídios. A camada externa hidrófila é constituída por compostos polares tais como: proteínas solúveis, porção hidrófila dos fosfolipídios e colesterol livre com seu grupo hidroxila (posição 3) direcionado para a periferia do complexo. As concentrações dos lipídios plasmáticos são índices estáticos do metabolismo lipoprotéico utilizados no estudo do risco cardiovascular (KHAWAJA e KULLO, 2009).

2.3 Metabolismo das Lipoproteínas

O transporte dos lípidos (via exógena) da dieta é realizado pelos quilomícrons (KAMOUN e ALAIN - VERNEUIL, 2006). As VLDL e LDL transportam os lípidos de origem hepática, que contém lipoproteína apoB-100 (via endógena). Os triglicerídios das VLDL, assim como os dos quilomícrons, são hidrolizados pela lipase lipoprotéica (GOLDBERG, 1996). Os ácidos graxos são liberados para os tecidos e

metabolizados. Os quilomícrons transformam-se em remanescentes e são removidos, pelo fígado, por receptores específicos, sendo que o mais aparente é o receptor da LDL (COOPER, 1997).

As IDL são formadas quando parte das VLDL perdem componentes de superfície lipídicos e protéicos. As VLDL trocam triglicerídios por ésteres de colesterol com as HDL e LDL por intermédio da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP). As VLDL, como as LDL, serão removidas no fígado por intermédio de ligação com receptores específicos (SORENSEN et al., 2009). A expressão desses receptores é a principal responsável pelo nível de colesterol no sangue e depende da atividade da enzima hidróxi-metil-glutaril CoA redutase (HMG-CoA redutase), que é a enzima limitante da síntese do colesterol hepático (PEASE e LEIPER, 1996).

A LDL geralmente transporta 70% do total de colesterol do plasma. Quando as concentrações de LDL estão elevadas, ocorre um aumento do risco de aterosclerose (ARMSTRONG et al., 2006 a), pois induz a ativação plaquetária e a expressão do fator tecidual (RAY e ROSENDAAL, 2001). As partículas de HDL são constituídas predominantemente por proteínas e por fosfolipídeos, são formadas no plasma e no compartimento extravascular. A apo A-I e a apo A-II constituem o principal conteúdo protéico da HDL. O colesterol livre da HDL é esterificado pela ação da lecitina colesterol acil transferase (LCAT). A HDL transporta o colesterol dos tecidos para o fígado, que faz a conversão desse colesterol para sais biliares. O colesterol será eliminado no chamado transporte reverso do colesterol (FIELDING e FIELDING, 1995; TCHOUA et al., 2009). O aumento dos níveis de HDL confere um efeito protetor contra a cardiopatia isquêmica (YOKOYAMA, 2006; PATEL et al., 2009). Isto porque tal molécula apresenta propriedades antitrombóticas por inibir a agregação plaquetária, reduzir a viscosidade do sangue, suprimir a atividade do fator tecidual e do inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1) e inativar o fator V da coagulação pela ativação da proteína C (KARADAG e AKBULUT, 2009).

O tecido adiposo e o muscular constituem os principais depósitos de triglicerídios no organismo humano. Os triglicerídios também contribuem para o desenvolvimento de DC, pois aumentariam os níveis do fator VII de coagulação, PAI-1 e a viscosidade do sangue. Como são os constituintes principais dos quilomícron e das VLDL, eles contribuem para o acúmulo de lipídios no interior dos macrófagos,

promovendo a formação das CE, sendo considerados fatores de aterogenicidade (CORDERO et al., 2009).

2.4 Hipercolesterolemia

A hipercolesterolemia está associada a diversas disfunções endoteliais, sendo considerada como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento das DC. Quando associada a fatores biológicos e/ou ambientais, leva à formação da placa ateromatosa aumentando os índices de morbidade ou mortalidade (KANDEL et al., 1979; LIBBY, 2002).

É definida quando a concentração de colesterol total for igual ou superior a 200 mg/dL ou quando a concentração de LDL for igual ou superior a 160 mg/dL (SKILTON et al., 2007). Essa desordem pode ser genética ou secundária a outras patologias ou, ainda, de etiologia incerta, provavelmente refletindo uma interação entre a dieta e fatores poligênicos indefinidos. A base patofisiológica parece ser a combinação de produção excessiva e catabolismo defeituoso do colesterol. O defeito celular foi identificado como uma deficiência nos receptores B e E da superfície celular para a LDL, que normalmente controla o metabolismo do colesterol intracelular, assim como, a degradação da LDL (EMMANUEL et al., 2009). As distorções no transporte do colesterol podem favorecer seu depósito na parede das artérias e vasos, contribuindo para o desenvolvimento da aterosclerose (ECKARDSTEIN et al., 2001; MCKENNEY et al., 2009).

2.5 Aterosclerose

A aterosclerose é uma patologia inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (LIBBY, 2000; ROCHA e LIBBY, 2009). Os principais fatores de risco são a elevação de lipoproteínas

aterogênicas (LDL, IDL, VLDL, remanescentes de quilomícrons), hipertensão arterial, obesidade, tabagismo, entre outros (OSIPOV et al., 2009).

A hipercolesterolemia provoca uma disfunção endotelial, a qual aumenta a permeabilidade da íntima às lipoproteínas plasmáticas favorecendo a retenção das mesmas no espaço subendotelial. Retidas, as partículas de LDL sofrem oxidação, formando o ox-LDL e causando a exposição de diversos neo-epítomos, tornando-as imunogênicas (SKALEN et al., 2002; SKILTON et al., 2007).

O depósito de ox-LDL, na parede arterial, é o processo-chave no início da aterogênese, (HOLVOET et al., 1998; HARRISON et al., 2003). A oxidação do LDL é induzida pelos RL produzidos pelos macrófagos, células endoteliais ou células musculares lisas (HEINECKE, 1998; HARRISON et al., 2003; ARMSTRONG et al., 2006 b; GAUTIER et al., 2009). A peroxidação lipídica inicia nos ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípidios, propagando-se aos lípidios do núcleo, como o colesterol livre e ésteres de colesterol (ALBERTINI et al., 2002). A presença do ox-LDL provoca outra manifestação da disfunção endotelial, representada pelo surgimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial. As moléculas de adesão são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a parede arterial. Estimula a liberação de interleucina-1 β (IL-1 β) e Interleucina-6 (IL-6) (LIBBY, 2000; LIBBY et al., 2005; LEVITAN et al., 2009). O ox-LDL induz as células endoteliais a expressar a molécula de adesão intercelular - 1 (ICAM-1) e a molécula de adesão da célula vascular - 1 (VCAM - 1), permitindo que os monócitos e linfócitos T possam se aderir às células endoteliais, através de seus receptores da proteína quimiotática de monócitos - 1 (MCP-1), (SCALIA et al., 1998).

Induzidos por proteínas quimiotáticas, os monócitos migram para o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos, que por sua vez captam ox-LDL através dos receptores específicos. Os receptores limpadores (*scavenger*), (SRA-I, SRA-II, LRP e CD36), localizados na superfície dos macrófagos, reconhecem ox-LDL e este é internalizado pelos macrófagos, formando as células espumosas. Os macrófagos processam o auto-antígeno promovendo a ativação dos linfócitos T e secreção de citocinas (KOUNNAS et al., 1992; QIN et al., 2006; EMMANUEL et al., 2009). Os macrófagos ativados secretam citocinas pro-inflamatórias como interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e IL-6, as quais podem potencializar a expressão dos receptores *scavenger* a induzirem fatores pró-coagulantes,

fibrinolíticos e aumentar as propriedades adesivas das células endoteliais (PERSSON et al., 2006).

A resposta inflamatória está ativada e os linfócitos T (CD4) ativados proliferam e passam também a secretar as citocinas pró-inflamatórias como, TNF- α e β , Interleucina-2 (IL-2) e IFN- γ , que causam ainda uma maior ativação de macrófagos, ativação vascular e inflamação (CHARAKIDA et al., 2009). O IFN- γ , TNF- α e IL-1 estimulam a proliferação das SMC e a síntese de colágeno, as quais se agregam as CE, completando a formação da placa ateromatosa (LIBBY, 2002; BERG et al., 2009).

A placa aterosclerótica plenamente desenvolvida é constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular e núcleo lipídico. Esses elementos formam na placa aterosclerótica, o núcleo lipídico, rico em colesterol e a capa fibrosa, rica em colágeno. As placas estáveis caracterizam-se por predomínio de colágeno, organizado em capa fibrosa espessa, escassas células inflamatórias e núcleo lipídico de proporções menores. As instáveis apresentam atividade inflamatória intensa, especialmente nas suas bordas laterais, com grande atividade proteolítica, núcleo lipídico proeminente e capa fibrótica tênue. A ruptura desta capa expõe material lipídico altamente trombogênico, levando à formação de um trombo subjacente. Esse processo, também conhecido por aterotrombose, é um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose (KUSUMOTO, 2001; KUMAR et al., 2004; WOLBERG e MACKMAN, 2009).

Durante o processo inflamatório, a produção de IL-6, IL-1 e TNF- α , induzem a expressão dos genes hepáticos a sintetizarem as proteínas de fase aguda como a PCR e amilóide sérica A (AMBERGER et al., 1997). As concentrações elevadas de PCR atuam diretamente no recrutamento de leucócitos e apoptose na parede do vaso (VERMA et al., 2004, KUBO et al., 2009). A PCR provoca efeitos pró-inflamatórios e pró-arterosclerótico no endotélio vascular. Seus níveis elevados aumentam a síntese das moléculas de adesão leucocitária e plaquetária (E-selectina e P-selectina), estimulando a quimiotaxia e favorecendo a transmigração leucocitária para a íntima vascular e a adesão plaquetária (LEY et al., 2003; PRASAD, 2006). A presença de PCR em altas concentrações inibe a síntese do óxido nítrico nas células endoteliais, facilitando a apoptose destas células e bloqueando a angiogênese (VERMA et al., 2002). Seus efeitos pró-aterogênicos são evidenciados por estimular

a migração, proliferação das SMC e produção de EROs (VERMA et al., 2004; ROCHA e LYBBY, 2009). (Figura 1).

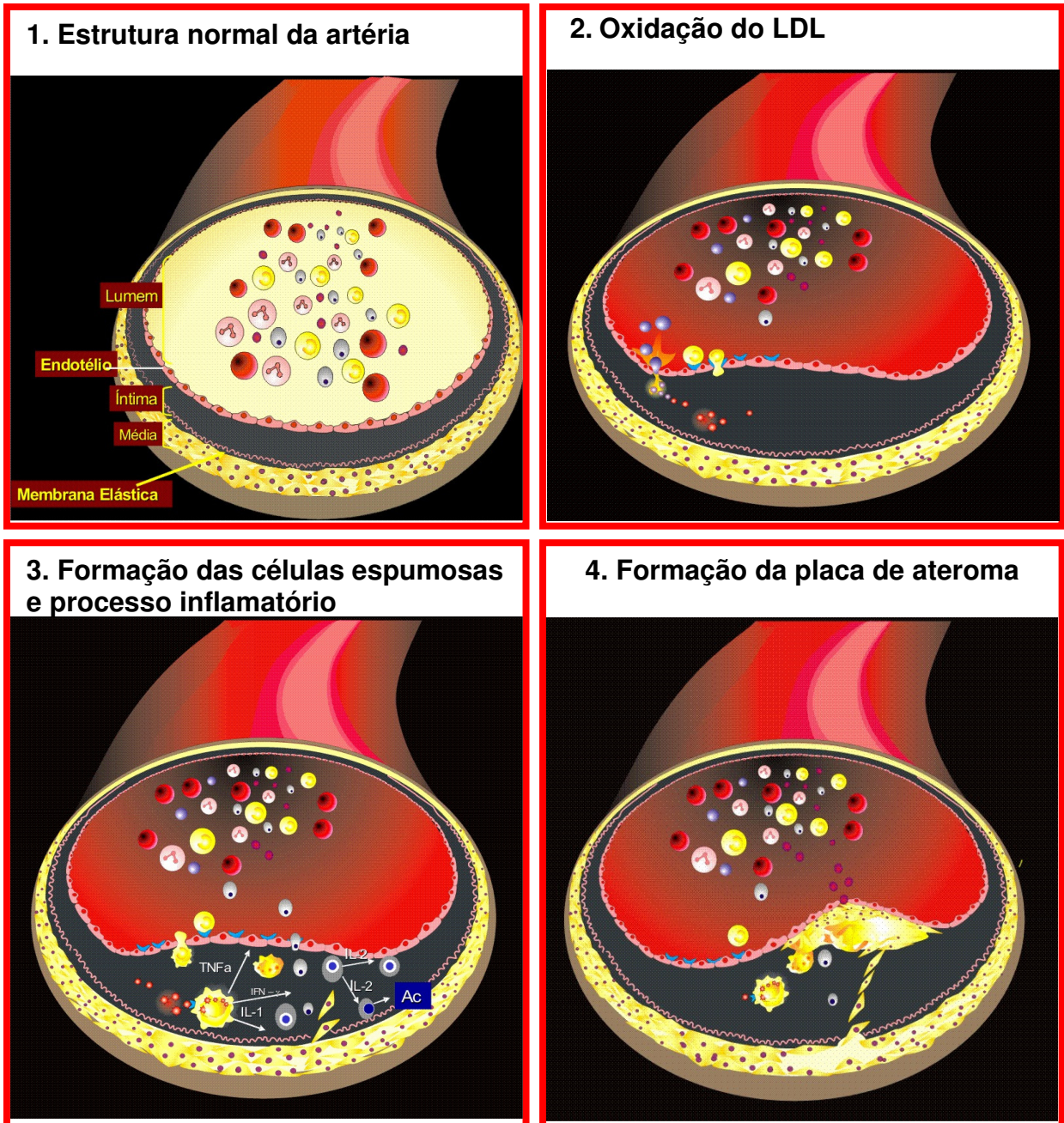


Figura 1 – Formação da placa de ateroma.
Adaptado de Kumar et al. (2004)

Os linfócitos T (CD8), que também participam da resposta imune, causam um ataque citotóxico nas SMC quando as mesmas estão apresentando fragmentos lipídicos associados a proteínas de classe I do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), levando a apoptose dessas células (GENG et al., 1997). Os linfócitos B podem ocorrer na camada adventícia e no tecido conectivo e são os responsáveis pela síntese dos anticorpos anti-ox-LDL (HANSSON, 2005; POLI et al., 2009). Os Anti-ox-LDL desempenham uma função imunoprotetora contra o desenvolvimento da arterosclerose, pois neutralizam e catabolizam o ox-LDL (FUKUMOTO et al., 2000; MATSUURA et al., 2006).

A hipercolesterolemia, ox-LDL, proteínas de fase aguda, como a PCR, e o estresse oxidativo são fatores predisponentes à adesão, ativação e agregação plaquetária (TOUSOULIS et al., 2003, 2006). Essa associação com a ativação de células endoteliais e acúmulo de leucócitos e plaquetas, na parede das artérias, causa uma restrição ao fluxo sanguíneo. O estreitamento da luz do vaso pode levar a uma obstrução e, conseqüentemente, a uma isquemia tecidual e, desse modo, predispor a doenças cardíacas, cerebrais e vasculares (VICTOR et al., 2009; RIDKER, 2009).

2.6 Isquemia

A isquemia desenvolve-se em consequência de vários fatores biológicos e ambientais e pode coexistir com outras patologias. Estão incluídos entre os fatores de risco a hipercolesterolemia, a hipertensão, o DM e a resistência a insulina, bem como o envelhecimento (ROCHA e LIBBY, 2009). A principal causa de isquemia é o processo de aterosclerose, caracterizado pela formação de placas de ateroma nas artérias (FERDINANDY et al., 2007).

A isquemia tecidual resulta de uma inadequada perfusão sanguínea devido a obstruções de artérias, levando à deficiência de oxigênio, de nutrientes e do retardo na retirada dos metabólitos, comprometendo suas funções vitais. A isquemia pode ser total quando o fluxo arterial for insuficiente para manter a vida celular ou tecidual, ou parcial, que mantém a viabilidade celular, porém com risco de evoluir para a

morte celular (necrose), dependendo das necessidades do tecido e do tempo em isquemia (ROBBINS et al., 2005).

As conseqüências da isquemia estão relacionadas com a sua duração e a sua intensidade. Além disso, muitas das lesões ocorrem na fase de reoxigenação tecidual em conseqüência da reperfusão. Durante a isquemia, há acúmulo de hipoxantina nas células, enquanto no início da reperfusão ocorre redução da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) desidrogenase, do carreador de ADP/ATP e da ATP sintetase, aumento da fosfolipase A2 e acúmulo de cálcio nas mitocôndrias, levando à geração de EROs (PARK, 2009; TASOULIS et al., 2009).

O déficit energético celular leva a falha do transporte ativo transmembrana. Com isso, ocorre tumefação endotelial, acúmulo leucocitário e agregação plaquetária vascular. Ocorre ainda, falência da microcirculação, resultante desse edema. A vasoconstrição, por sua vez, é resultado da deterioração entre o balanço de óxido nítrico e endotelina. Estes processos ativam, ainda mais, os neutrófilos, que produzem citocinas inflamatórias e mais EROs, gerando um ciclo vicioso (PRASAD, 2006; SEIXAS-CAMBÃO e LEITE-MOREIRA, 2009; REAL et al., 2009).

As lesões causadas pela isquemia aumentam a concentração de RL que levam à alterações estruturais e moleculares das artérias e parece também contribuir na modificação da albumina humana, o que aumentaria ainda mais o risco às DC (LAMACK et al., 2005; CHO et al., 2007).

2.6.1 Albumina Humana

A albumina é uma proteína sintetizada pelo fígado. Representa mais de 50% do conteúdo total de proteínas do plasma, sendo a proteína mais importante e abundante presente no plasma sanguíneo humano. Atua na manutenção da osmolaridade entre o compartimento sanguíneo e o intersticial. Está envolvida na ligação e transporte de hormônios, ácidos graxos, metabólitos, diversas drogas e a íons metálicos (DOWEIKO e NOMPLEGGI, 1991).

Comparada a outras proteínas, ela é uma molécula relativamente pequena, apresentando um peso molecular em torno de 69.000 Da, arranjada predominantemente em α -hélices. É constituída por uma cadeia simples de 585

aminoácidos e contêm 35 resíduos de cisteína, a maioria deles formam pontes de dissulfídeo (17 pontes ao todo), que contribuem para sua estrutura tridimensional, a qual foi determinada cristalograficamente (WHICHER e SPENCE, 1987; HE e CARTER, 1992).

Nos seus resíduos, está presente a cisteína livre redox ativa (Cis-34), que representa cerca de 80% dos tióis livres (-SH) do plasma. Este tiol da Cis-34 é reativo e capaz de tiolação (albumina-S-R) e nitrosilação (albumina-S-NO), processos esses que contribuem para numerosas funções *in vivo*. Ela é composta por três domínios homólogos (I-III) e cada um contém dois subdomínios (A e B) compostos por 4 e 6 α -hélices, respectivamente. Estes subdomínios têm um movimento adicional por meio de voltas flexíveis, proporcionado pelo resíduo de prolina, que auxilia na acomodação de substâncias ligantes (KRAGH-HANSEN, 1990). As principais regiões de ligação à albumina estão localizadas na cavidade hidrofóbica nos subdomínios IIA e IIIA, as quais exibem química similar (QUINLAN et al., 2005).

A flexibilidade da estrutura da albumina faz com que ela se adapte facilmente a ligantes, e seus três domínios proporcionam uma variedade de sítios de ligação. O grupamento N-terminal possui a seqüência de N-Asp-Ala-His-Lis que tem demonstrado ser um sítio de fortes ligações aos metais de transição de sua estrutura. Constitui um sítio específico de ligação com alguns metais como cobalto (II), cobre (II) e níquel (II), é a região mais susceptível à degradação, quando comparadas a outras regiões da albumina (BAR-OR et al., 2001; CHO et al., 2007; MOTHE e FALLER, 2007; GAZE et al., 2009), (Figura 2).

Existem numerosas proteínas de transporte no plasma sangüíneo, mas somente a albumina está apta a ligar-se reversivelmente e com alta afinidade a uma diversidade de compostos tanto endógenos como exógenos (KRAGH-HANSEN, 1990).

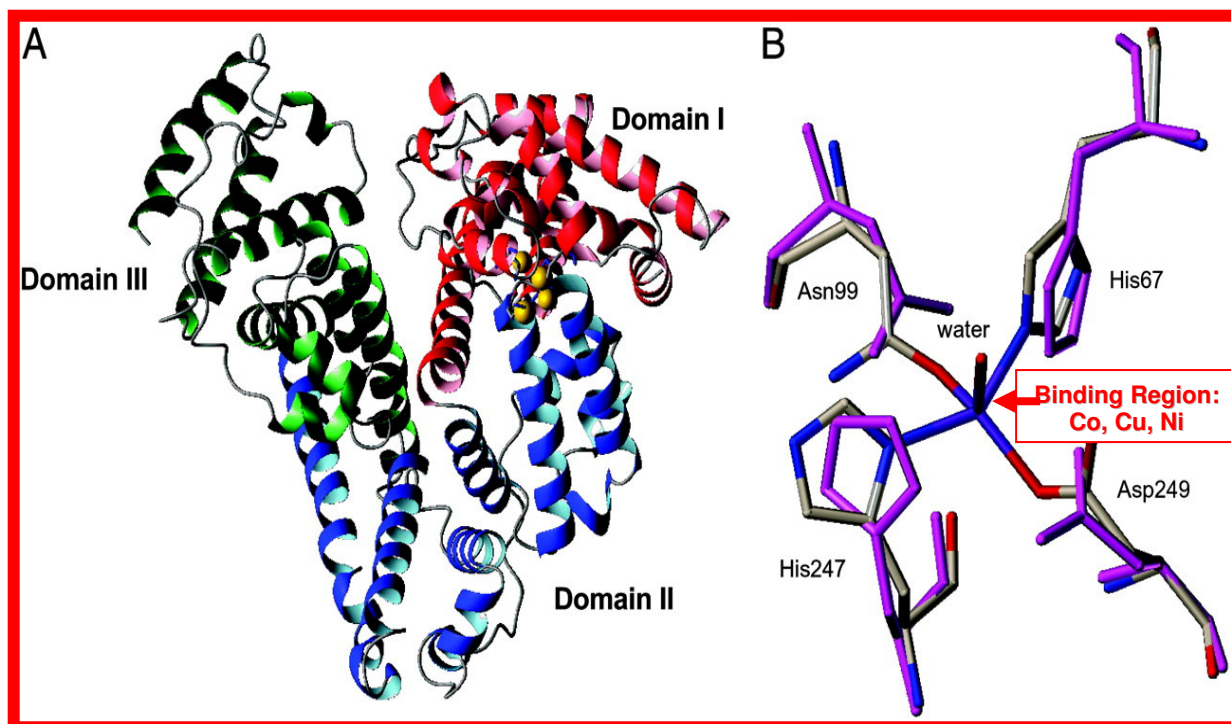


Figura 2 – Estrutura e sítios de ligação da albumina.
Adaptado de Stewart (2003)

2.6.2 Albumina Modificada pela Isquemia (IMA)

A isquemia, hipóxia, acidose ou a geração e a ação de RL reduzem a capacidade de ligação da albumina com os metais, principalmente com o cobalto, levando à formação da Albumina Modificada pela Isquemia (IMA), sendo este considerado um novo biomarcador para a detecção da isquemia (BORDERIE et al., 2004; VAN DER ZEE et al., 2005). Alguns autores descrevem também uma variedade de locais de ligação da albumina a metais com diferentes especificidades (BAL et al., 1998; MARTINS et al., 1982). Appelton e Sarkar (1971) indicaram que a albumina humana e bovina contém mais de um local de ligação ao Cu (II), entretanto o principal local no N-terminal tem atraído a atenção devido à sua relevância fisiológica e distinção estrutural.

O ensaio colorimétrico que detecta a ligação da albumina ao cobalto através da IMA, foi desenvolvido por Bar-Or et al. em 2000, e foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para ser um marcador a mais na avaliação da isquemia

do miocárdio (FDA, 2003). A partir desse marco, numerosos estudos estão surgindo para avaliar a utilização do “Teste da Ligação da Albumina ao Cobalto” como um teste útil para um rápido diagnóstico de vários e importantes processos isquêmicos.

Vários estudos têm demonstrado a importância da IMA como marcador de processos isquêmicos. Falkensammer et al. (2007), verificaram que a IMA representa um marcador clínico na isquemia do músculo esquelético. Cichota et al. (2008), encontraram níveis elevados de IMA e lactato em pacientes com anemia associada à doença renal crônica. Essa elevação poderia estar associada à hipóxia devido aos baixos níveis de hemoglobina encontrados nos pacientes com doença renal crônica. Polk et al. (2008) utilizaram a IMA como marcador diagnóstico em pacientes com sintomas de isquemia intestinal. Nesse estudo houve significativo aumento nos níveis de IMA comparados com indivíduos sem isquemia intestinal e obtiveram uma sensibilidade de 100% e especificidade de 85,7% para os valores de IMA.

Amirtharaj et al. (2008) demonstraram que o estresse oxidativo em pacientes com esteatose hepática está associado com um decréscimo na capacidade do cobalto se ligar à albumina. Isso está acompanhado por um aumento de ácidos graxos ligados à albumina nestes pacientes. Gunduz et al. (2008) analisaram a IMA em doenças cerebrovasculares e também observaram uma elevação de seus níveis, e sua medida pode ser usada para distinguir hemorragia sub-aracnoídea de infarto cerebral durante a fase aguda do evento cerebrovascular. Piwowar et al. (2008) avaliaram a IMA em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) e analisaram sua correlação com complicações vasculares, controle glicêmico, hipertensão, dislipidemia e obesidade. Níveis elevados de IMA ocorreram nos pacientes diabéticos do estudo, confirmando que eram de origem não-cardíaca, e sugerem que a molécula de albumina do plasma, em pacientes diabéticos, é modificada em condições de hipóxia crônica provocadas principalmente por hiperglicemia e pelo estresse oxidativo no diabetes.

Estudos recentes são concordantes com a importância da IMA, como marcador isquêmico. Ukinç et al. (2009) encontraram uma correlação positiva entre os níveis elevados de IMA, PCR-us e microalbuminúria em sujeitos diabéticos, indicando a presença de um processo isquêmico crônico. Turedi et al. (2009), demonstraram que a avaliação da concentração da IMA pode ser utilizada como um dos marcadores de isquemia em portadores de embolia pulmonar. Kazanis et al.

(2009), verificaram que a dosagem de IMA pode prever precocemente a presença de DC, antes mesmo da elevação da PCR-us ou da elevação do peptídeo natriurético (proBNP). Gaze (2009), concluiu recentemente que a IMA é um biomarcador clínico atual que pode ser usado para o diagnóstico de pacientes com suspeita de isquemia cardíaca.

A isquemia aumenta de forma significativa a produção de EROs, como ânions superóxido, radicais hidroxila, ácido hipocloroso, peróxido de hidrogênio e peroxinitrito. A produção anormal e excessiva de EROs resulta em peroxidação lipídica, ativação leucocitária e elevada produção de citocinas, fatores que contribuem para o dano tecidual. As EROs interrompem o ciclo celular, desestabilizam o citoesqueleto e a integridade celular, decompondo os componentes lipídicos, protéicos e especialmente o ácido desoxirribonucleíco (DNA). Instalado o estresse oxidativo as lesões vasculares tornam-se progressivas e contínuas, progredindo para as DC (DI LISA et al., 2009).

2.7 Radicais Livres, Espécies Reativas e Estresse Oxidativo

Os RL são todas as espécies químicas que possuam um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica. Essa característica confere um alto poder de reatividade aos RL (HALLIWELL, 2006). Outras moléculas, além do oxigênio, como o carbono, o enxofre e o nitrogênio, também podem produzir RL ou espécies reativas, no entanto, o O_2 é a que mais recebe atenção dada sua importância nos processos metabólicos celulares (HALLIWELL, 2001; DRÖGE, 2002).

As EROs são produzidas de forma contínua pelas células como parte de seus processos metabólicos. O desequilíbrio entre a formação e a remoção dessas espécies, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou ainda do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante, chamado de estresse oxidativo (FINKEL e HOLBROOK, 2000; WARNHOLTZ et al., 2004; VALKO et al., 2007).

O estresse oxidativo favorece a ocorrência de ataques das EROs a componentes celulares, podendo resultar em lesões oxidativas em macromoléculas

e diversas estruturas celulares que, se não forem reparadas, alterarão a funcionalidade de células, tecidos e órgãos. Ele está presente em uma grande variedade de condições patológicas e acredita-se que funcione como agente patogênico em muitas dessas condições (DHALA et al., 2000; VICTOR et al., 2009).

A hipercolesterolemia, principal causa da aterosclerose, provoca danos em toda a rede vascular, promovendo a isquemia tecidual. Durante a isquemia, os carreadores mitocondriais encontram-se no seu estado reduzido. Durante a reperfusão, a interação entre o oxigênio molecular e a cadeia respiratória reduzida leva a formação EROs (KASPAROVA et al., 2005, OSIPOV et al., 2009). As EROs podem surgir também de outras fontes como NADPH oxidase, xantina oxidase, óxido nítrico sintase, auto-oxidação de catecolaminas, aumento dos níveis de angiotensina II e aldosterona, e liberação de citocinas pró-inflamatórias (LANDMESSER et al., 2002; BERRY e HARE, 2004, CHATTERJEE et al., 2009), (Figura 3).

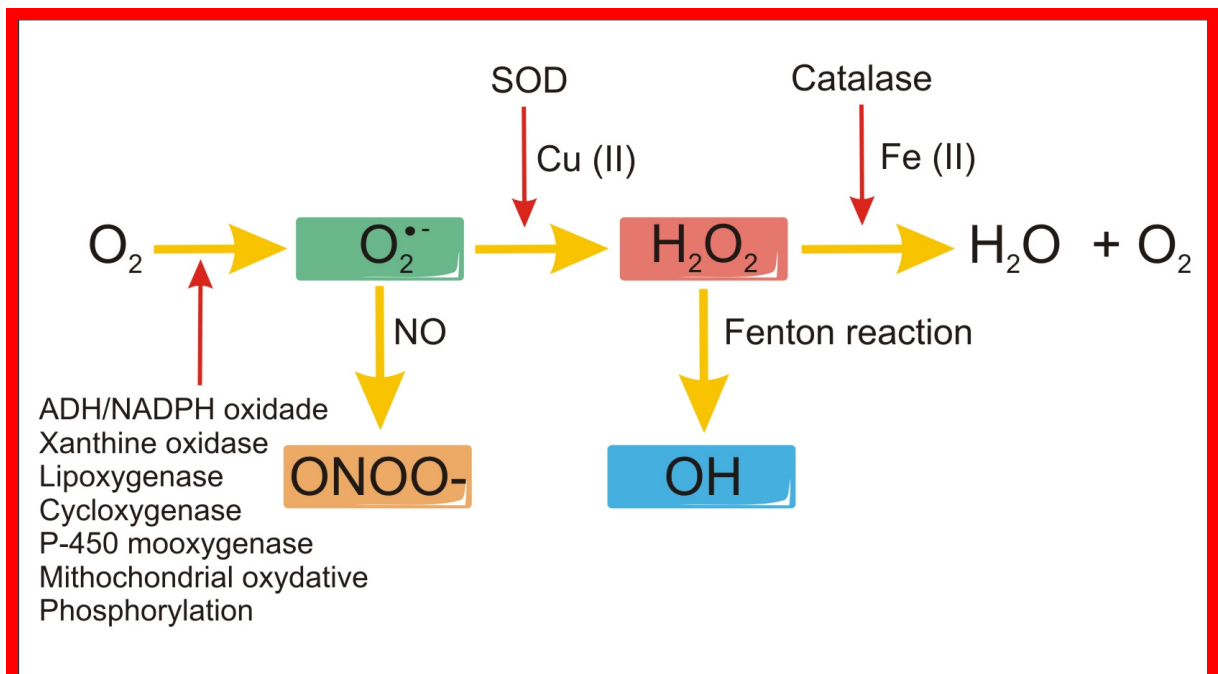


Figura 3 - Esquema geral de formação de espécies reativas nas células eucarióticas.
Adaptado de Halliwell et al.(1999)

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Durante esse processo, são formados intermediários reativos como radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), hidroxila, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outros oxidantes (Figura 4). Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade das EROs é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990; SMITH et al., 2007; MANDELKER, 2008).

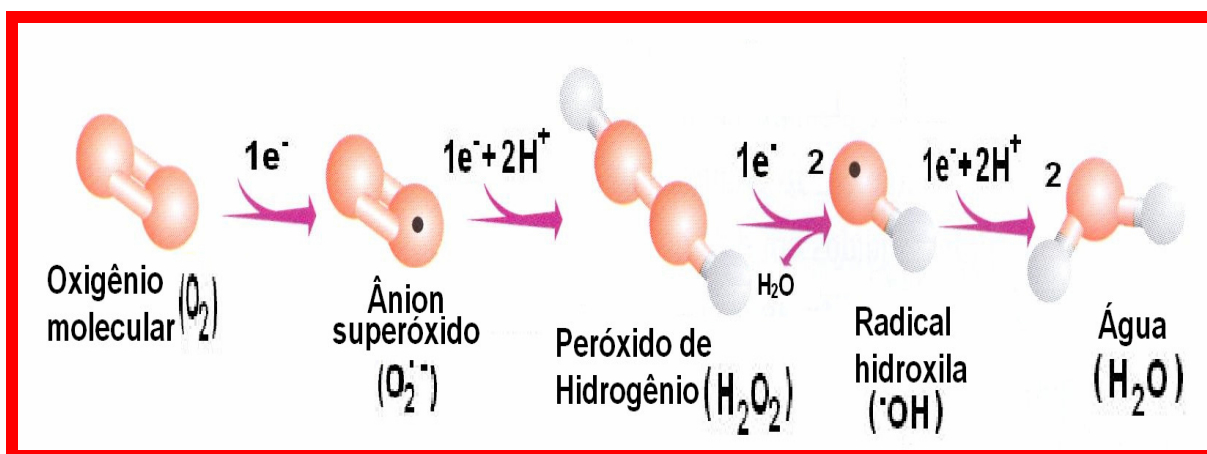


Figura 4 - Redução completa do O_2 a H_2O .
Adaptado de Augusto (2006).

O radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é gerado pela redução incompleta do oxigênio (O_2 – elétron). Este radical é formado por reações de auto-oxidação na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (MANDELKER, 2008). Não é reativa, a menos que entre em contato com outros radicais. Quando entra em contato com o ON^{\cdot} , reage, ocasionando a formação de peroxinitrito, uma espécie reativa de nitrogênio extremamente reativa. Além disso, o $O_2^{\cdot-}$ é capaz de inativar enzimas que possuem um centro ferro-enxofre, causando a liberação do íon ferro (HALLIWELL et al., 1999).

Diversos processos metabólicos geram o radical hidroxila (OH^{\cdot}), a qual é altamente reativa (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007), que ataca especialmente o DNA e produz uma variedade de produtos, incluindo base purínica e pirimídica

modificadas, as quais podem ser as precursoras da carcinogenicidade (HALLIWELL e ARUOMA, 1991; TOYOKUNI, 2009). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é considerado radical por não possuir um elétron desemparelhado, mas é considerado como uma ERO pelas reações que pode desencadear e os radicais que pode gerar. Pode ser gerada pela dismutação do superóxido e por ação de algumas enzimas, como a xantina oxidase. O H_2O_2 pode degradar algumas hemeproteínas como a mioglobina e hemoglobina, liberando ferro (HALLIWELL e GUTTERRIDGE, 2007). Os radicais orgânicos alcóxila/peróxila são formados por reações de peroxidação lipídica (AIKENS e DIX, 1991; GUPTA et al., 2009).

O nitrogênio também participa na geração de espécies reativas, e as mais danosas são o óxido nítrico ($ON\bullet$) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (HALLIWELL et al., 1999). O $ON\bullet$ é um gás muito reativo, formado no organismo pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o qual se difunde facilmente nas membranas celulares. Ao reagir com o radical ânion superóxido, gera o $ONOO^-$ que é um agente oxidante e nitrante, pois oxida especialmente as proteínas e o DNA (DUBININA e PUSTYGINA, 2009). É citotóxico no pH 7,4 e sua adição às células causa morte celular geralmente por apoptose (HALLIWELL, 2001). Seu efeito tóxico contribui de modo importante, para a lesão tecidual que ocorre nos processos inflamatórios crônicos como na aterosclerose (REAL et al., 2009).

O desequilíbrio entre a geração de EROs e a sua remoção, através dos antioxidantes químicos e enzimáticos disponíveis, gera o estresse oxidativo o qual promove a oxidação e o dano nas macromoléculas como proteínas, lipídios, DNA (Figura 5). Essas alterações contribuem para a morte celular através da apoptose e da necrose as quais estão relacionadas à etiologia e à fisiopatologia de várias doenças, incluindo as degenerativas, como a aterosclerose promotora das DC (VALKO et al., 2007; NAGAYOSHI et al., 2009).

Os danos no DNA causados pelas EROs também desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (VALKO et al., 2006). As mutações podem ocorrer nos genes das próprias enzimas antioxidantes (MATES, 2000; FORTUNATO e DI TARANTO, 2007; MONTANO et al., 2009).

Retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis é o papel dos antioxidantes, reduzindo dessa forma, o dano celular. São importantes como forma de prevenção e tratamento de doenças nas quais o estresse oxidativo está envolvido (VASALLE et al., 2008; BRAMBILLA et al., 2008; DODD et al., 2008).

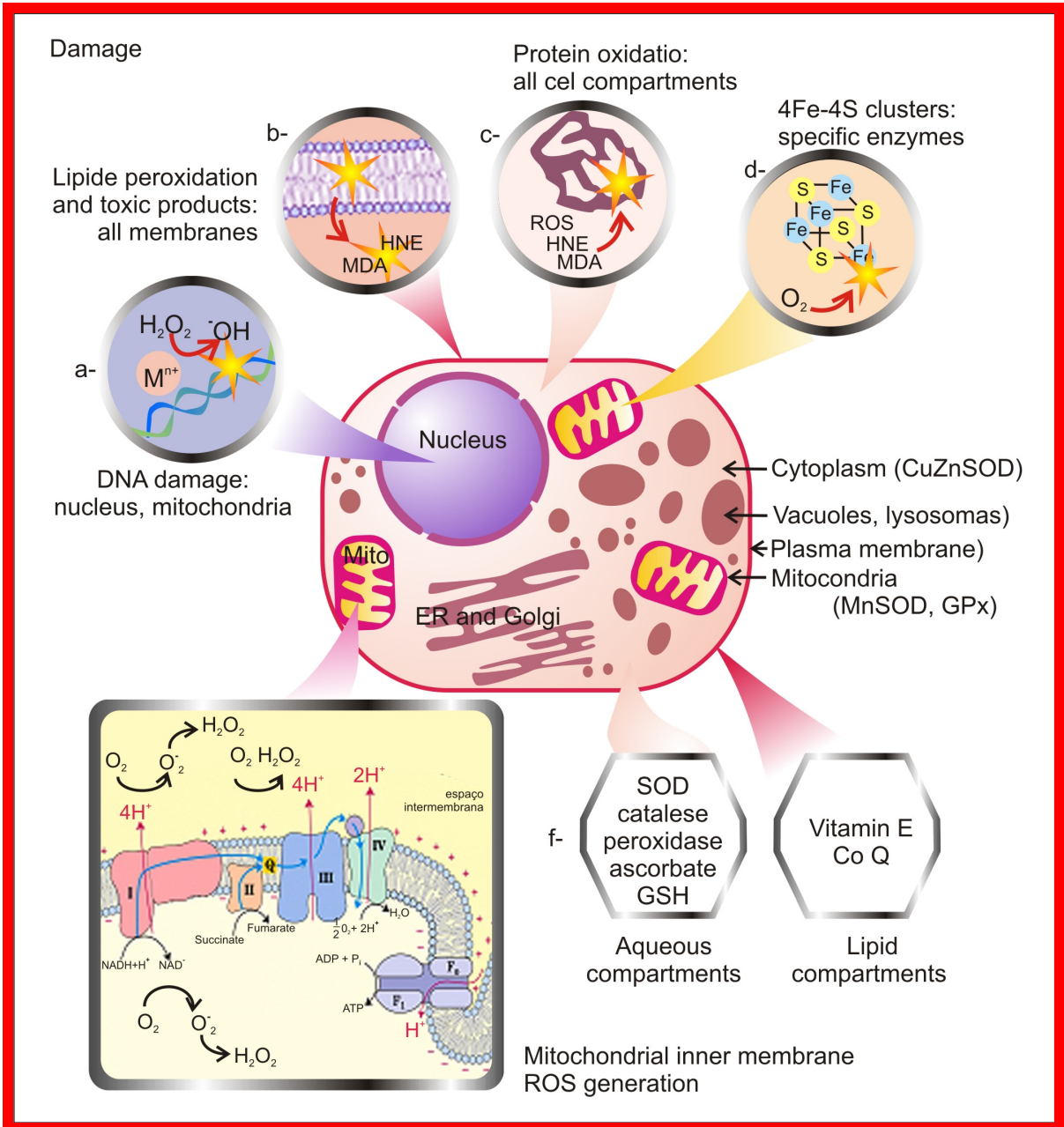


Figura 5 - Dano oxidativo nas macromoléculas biológicas e antioxidantes.
 Adaptado de Torres (2003).

2.7.1 Indicadores do status oxidante

2.7.1.1 Oxidação de lipídios

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica (lipoperoxidação). A lipoperoxidação acarreta alterações na fluidez, permeabilidade e integridade das membranas celulares. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos como o malondialdeído (MDA), culminando com a morte celular (HALLIWELL e CHIRICO, 1993; CHERUBINI et al., 2005).

As reações catalisadas pelas Eros, no processo de peroxidação lipídica, são realizadas em três etapas, sendo elas: iniciação, propagação e término (Figura 6), Na fase de iniciação, o hidrogênio do ácido graxo insaturado (LH) do fosfolipídio de membrana é removido por uma ERO produzindo o radical lipídico L•. Em seguida, na fase de propagação, o radical lipídico formado na reação anterior reage com o oxigênio molecular, formando o radical peroxila (LOO•), este radical pode dar início a um novo processo de remoção de hidrogênio de uma nova molécula de ácido graxo gerando mais um radical L• e hidroperóxido (LOOH) (OGA, 2003).

Os radicais peroxilas formados podem facilmente atacar as proteínas de membrana, produzindo maiores danos (BARREIROS et al., 2006). Através de outras reações como, por exemplo, as catalisadas por metais de transição como o cobre e o ferro, o hidroperóxido lipídico pode formar LOO• e o radical alcoxila (LO•), que participam na propagação da cadeia radicalar. A maioria dessas reações são degradativas e produzem aldeídos e alcanos de diferentes pesos moleculares (VALKO et al., 2006). Estes produtos são utilizados para monitorar o processo de peroxidação lipídica em condições fisiológicas, e o MDA, uma substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é comumente dosada (AUGUSTO, 2006).

O MDA pode reagir com as bases nitrogenadas do DNA, sendo um agente mutagênico tanto em bactérias quanto em células de mamíferos, e ainda carcinogênico em ratos. 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), outro produto aldeídico do

processo de peroxidação lipídica é considerado um agente mutagênico fraco, mas parece ser o principal produto tóxico da peroxidação lipídica por se ligar ao grupamento sulfidril ou amina das proteínas. HNE, apesar de tóxico, apresenta fortes efeitos nas vias de transdução de sinais que afetam importantes características fenotípicas das células (VALKO et al., 2006). A fase de terminação do processo pode ocorrer pela interação entre duas EROs, formando compostos carbonilados no estado fundamental ($L = O$) ou no estado excitado triplete ($3L=O$) e os álcoois correspondentes (OGA, 2003; AUGUSTO, 2006).

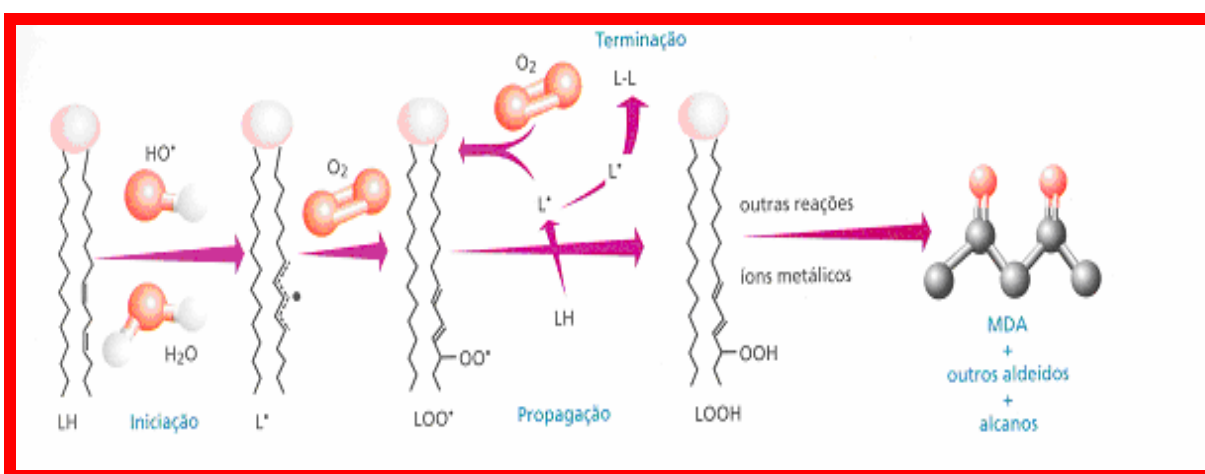


Figura 6 - Etapas do processo de peroxidação lipídica.

Adaptado de Oga (2003).

O MDA é, portanto, o produto final da degradação não enzimática de ácidos graxos poliinsaturados. Altos níveis de MDA elevam a formação de lipoperóxidos e indicam um aumento da lipoperoxidação (ALEXANDROVA e BOCHEV, 2005).

A hipercolesterolemia associada ao processo inflamatório contribui para que ocorra a lipoperoxidação das membranas das células vasculares o que pode ser comprovado pelos altos níveis de MDA presentes nos sujeitos portadores de aterosclerose e, conseqüentemente, de DC (OGUNRO et al., 2009; SHAO e HEINECKE, 2009).

2.7.1.2 Oxidação de proteínas

As enzimas e as proteínas podem ser atacadas pelos EROs gerados nos diversos processos metabólicos. As EROs podem atacar os resíduos de aminoácidos (especialmente prolina, arginina, lisina e treonina) para produzir grupos carbonila (DEAN et al., 1997; MAISONNEUVE et al., 2009), os quais podem ser quantificados por espectrofotometria (LEVINI et al., 1990). O principal indicador e marcador de oxidação protéica é a determinação do conteúdo de proteína carbonilada (BEAL, 2002; MAISONNEUVE et al., 2009).

As alterações provocadas pelas EROs modificam a atividade biológica das macromoléculas, especialmente das enzimas, podendo alterar a sua atividade catalítica, devido à desorganização estrutural. As células que apresentarem as membranas danificadas ficam sujeitas a citólise, apoptose e prejuízo no transporte ativo de substâncias (PILKA et al., 2009).

A proteína carbonilada pode ser gerada também através da clivagem oxidativa das proteínas por um sistema de α -amidação ou por oxidação das cadeias laterais de glutamato. Também, os grupos carbonilados podem ser introduzidos nas proteínas por uma reação secundária das cadeias laterais nucleofílicas de cisteína (Cis), Histidina (His) e lisina (Lis) com aldeídos produzidos durante a peroxidação lipídica (como o malondialdeído, entre outros). Além disso, derivados carbonilados reativos (cetoaminas, cetoaldeídos) gerados como uma consequência da reação de açúcares redutores, ou seus produtos de oxidação com resíduos de Lis das proteínas (reações de glicação ou glicooxidação) com a eventual formação de produtos finais de glicação-lipoxidação avançados, podem levar a formação de grupos carbonilados (DONNE et al., 2003; STADTMAN, 2004, PILKA et al., 2009).

O mecanismo do carbonilação ainda não está bem estabelecido, entretanto os mais aceitos são um aumento no número de espécies oxidantes; um decréscimo nos *scavengers* dessas espécies (GALVANI et al., 2008); um aumento na susceptibilidade dessas proteínas a oxidação e um decréscimo na remoção das espécies oxidadas (DAVIES, 2000).

A modificação oxidativa das proteínas por EROs implica na progressão de várias patologias humanas como as doenças cardíacas (CORREA et al., 2007), neoplasias (BATTISTI et al., 2008) e aterosclerose (FANDOS, et al., 2009).

2.7.1.3 Oxidação de DNA

As EROs oxidam o DNA por atingir as bases nitrogenadas e/ou as moléculas de açúcar. As lesões oxidativas que provocam a modificação das bases nitrogenadas estão associadas à formação de mutações e perda da integridade do DNA (HALLIWELL e ARUOMA, 1991). As mutações permanentes são as indutoras da mutagênese, carcinogênese e do envelhecimento (VALKO et al., 2007; ALEXEYEV, 2009).

Os danos causados no DNA promovem a quebra das fitas duplas e a formação de sítios abásicos (sítios com perda de bases nitrogenadas). As lesões no DNA podem resultar tanto na inativação quanto na ativação da sua transcrição, replicação de erros e instabilidade genômica. Todas essas alterações podem ser associadas à carcinogênese (MARNETT, 2000; VALKO et al., 2006).

Eventos de recombinação intracromossomiais e intercromossomiais também são observados durante a exposição ao H₂O₂. Essas recombinações estão associadas à mutagênese e à indução de tumores (TEMPLE et al., 2005). Dessa forma, a existência de um mecanismo de defesa e reparo é de extrema importância para as células, visto que lesões oxidativas, em certas biomoléculas, como no DNA e na membrana celular, podem se tornar letais para as células.

2.7.2 Defesas antioxidantes

As células humanas desenvolveram um elaborado mecanismo de defesa celular para combater a intensa produção das EROs provenientes de diversas fontes. Esse mecanismo é denominado sistema de defesa antioxidante e atua na prevenção e no reparo físico e químico dos diversos sistemas orgânicos (VALKO et al., 2007).

Antioxidantes são todas as substâncias capazes de diminuir ou inibir a oxidação do substrato passível de ser oxidado, mesmo estando presente em baixa concentração. Portanto, são compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de

macromoléculas ou de estruturas celulares (JORDÃO et al., 1998; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; BRAMBILLA et al., 2008). Os antioxidantes podem ser enzimáticos ou não enzimáticos e podem atuar independentemente ou associados, dependendo do grau de lesão e da localização do dano celular (VALKO et al., 2007).

2.7.2.1 Antioxidantes enzimáticos

A defesa enzimática envolve a ação cooperativa de três principais enzimas antioxidantes: SOD, que é encontrada no citosol ou no entorno extracelular (Cu/ZnSOD) e na mitocôndria (MnSOD); o sistema glutatona GSHPx/GSHR e CAT que estão presentes no citosol e peroxissomos, respectivamente (BOVERIS e CADENAS, 1997; NELSON et al., 2006; HALLIWELL e GUTTERIDGE 2007).

As enzimas constituem a primeira linha de defesa endógena de neutralização das EROs. Através delas, as células tentam manter reduzidas as quantidades do radical superóxido e de peróxidos de hidrogênio evitando, assim reações oxidativas com impacto negativo como a peroxidação lipídica e a formação de outras moléculas altamente reativas, como é o caso do radical hidroxila (BOVERIS e CADENAS, 1997; GAŁECKA et al., 2008).

2.7.2.1.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD (EC1.15.1.1) é uma metaloenzima que desempenha importante papel, já que catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. O H_2O_2 , por sua vez, é degradado pela CAT ou GSHPx, resultando em água e O_2 (Figura 7).

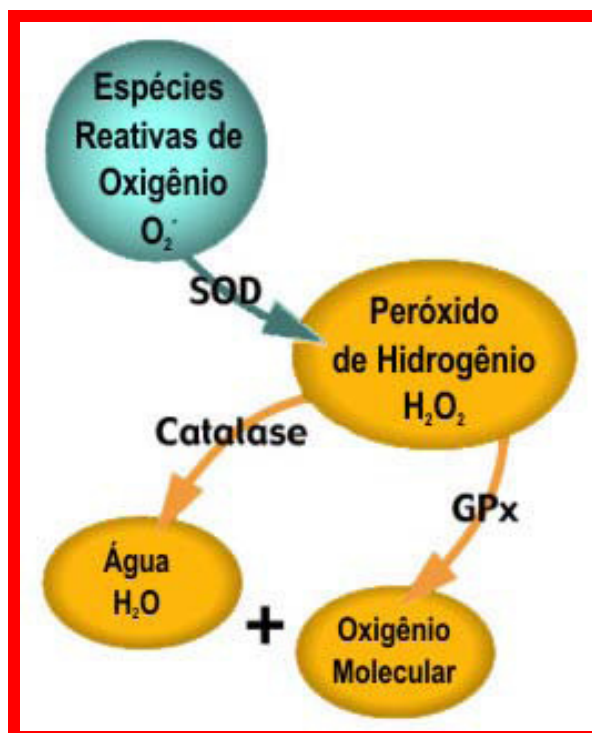


Figura 7 - Mecanismo enzimático antioxidante.
Adaptado de Nordberg e Arner (2001).

Existem três classes de SOD, dependendo de sua localização e do metal componente: SOD1, SOD2 e SOD3. A SOD1 é uma enzima citosólica dependente de cobre e zinco (CuZnSOD), possui peso molecular de aproximadamente 32.000 Da e é encontrada no citoplasma, compartimentos nucleares e lisossomos de células de mamíferos (ZELKO e MARIANI, 2002).

A SOD2 é uma enzima mitocondrial dependente de manganês (MnSOD) possui um peso molecular de 23.000 Da e é encontrada somente em mitocôndrias de células aeróbicas (SEIZI, 2003; GAŁECKA et al., 2008). Estruturalmente apresenta-se como uma molécula homotetrâmera e tem demonstrado desempenhar um papel fundamental na promoção da diferenciação celular, tumorigênese e na proteção contra toxicidade do excesso de oxigênio em pulmões de pacientes com oxigenoterapia (KINNULA e CRAPO, 2004; CONNOR, 2007; GALLAGHER et al., 2009). Alta expressão dessa enzima ocorre no coração, cérebro, fígado e rins de mamíferos (LUO, 2001).

Vários estudos têm demonstrado a relevância da MnSOD como agente protetor da DC. A atividade da MnSOD é diretamente induzida pela presença de ox-

LDL, RL e fumo, o qual contém várias substâncias oxidantes em sua composição (KINSCHERF et al., 1997; MARAGON et al., 1997). Segundo Kokoszka et al. (2001), a MnSOD desempenha um papel fundamental no controle do estresse oxidativo em órgãos vitais, pois animais *knock-out* exibem letalidade neonatal em associação à doença cardiovascular e excessivo acúmulo de lípidos no fígado. Também foi verificado que a superexpressão de MnSOD, em modelos experimentais, tem efeito protetor contra isquemia miocárdica e parece reverter disfunções vasculares em artérias carótidas sem placas ateroscleróticas (ZENETTI et al., 2001). Além disso, existem evidências indicando que a superexpressão da MnSOD inibe, in vitro, a oxidação da LDL pelas células endoteliais humanas (FANG et al., 1998).

A MnSOD desempenha uma proteção importante em relação ao sistema vascular em situações de hiperglicemia e hipercolesterolemia. Em células endoteliais, a superexpressão da MnSOD bloqueia a adesão de monócitos, impede a inibição da atividade do óxido nítrico sintetase e impede a inibição de enzimas antiaterogênicas induzidas pela hiperglicemia (BROWNLEE, 2001; SCHWENKE et al., 2003). Yamagishi et al. (2001) realizaram estudos com compostos miméticos da MnSOD e demonstram que esta enzima impede a ativação e agregação plaquetária, que é também estimulada pela hiperglicemia e hipercolesterolemia.

A SOD3 é uma enzima extracelular dependente de cobre e zinco: é a mais recente descoberta dessa família de enzimas, possui um peso molecular de 135.000 Da e uma das suas características é a sua alta afinidade pela heparina. Além disso, SOD3 foi primeiramente detectada em plasma humano, linfa, ascites e fluido cerebrospinal e o padrão de expressão dessa enzima é altamente restrito a células e tecidos específicos, em que a sua atividade pode exceder a da SOD1 e MnSOD (ZELKO e MARIANI, 2002).

2.7.2.1.2 Catalase (CAT)

A CAT (EC1.11.1.6) é uma enzima tetramérica, consistindo de quatro subunidades idênticas de 60.000 Da, que contém um único grupo ferroprotoporfirina por unidade, e tem uma massa molecular de aproximadamente 240.000 Da (MATÉS et al., 1999). Participa da conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio

molecular com alta taxa de *turnover* (uma molécula de catalase pode converter aproximadamente 6 milhões de moléculas de peróxido de hidrogênio por minuto). Sua atividade é dependente de NADPH (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), sendo altamente específica por atuar em hidroperóxidos de hidrogênio, de etila e de metila (DEL MAESTRO, 1980).

A CAT encontra-se enclausurada no peroxissoma que é a principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, fonte inesgotável de peróxidos orgânicos, produtos carbonílicos e oxigênio singlete. A catalase é, também, encontrada nas mitocôndrias das células do tecido cardíaco. Os dois caminhos mais utilizados para estudo de sua atividade referem-se à medida do decaimento na concentração de H_2O_2 e da geração do oxigênio (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

2.7.2.1.3 Sistema Glutationa Peroxidase (GSHPx)/Glutationa Redutase (GSHR)

A GSHPx ou GPx (EC1.11.1.9) e a GSHR ou GR (EC1.11.1.9) são enzimas envolvidas no metabolismo da glutaciona, desempenhando um dos mais importantes mecanismos de defesa antioxidante; catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), potencialmente tóxico, que é convertido em H_2O . Também catalisa peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis à custa da oxidação da glutaciona (GUL et al., 2000, VALKO et al., 2006; KALININA et al., 2008).

Para que a atividade protetora da glutaciona expressa pela redução de espécies oxidantes, e, conseqüente, oxidação da GSH à glutaciona dissulfeto (GSSG) seja mantida, a GSH precisa ser regenerada através do ciclo catalítico, representado na Figura 8. Nela podemos identificar a atividade das enzimas: a glutaciona peroxidase (GSHPx =GPx) e a glutaciona redutase (GR), (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

A glutaciona (GSH) é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glicina, cisteína e ácido glutâmico. Quando GSH é oxidada pela reação da GSHPx, há a interligação de duas moléculas do tripeptídeo por uma ponte dissulfeto, com formação de glutaciona oxidada (GSSG). A queda nos níveis de GSH pode prejudicar as defesas celulares contra a ação tóxica dos RL. As células íntegras

mantêm uma razão GSH/GSSG alta. Para isso, a GSSG formada é reduzida novamente a GSH, à custa de NADPH, pela ação da enzima glutationa redutase (GR), (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; VALKO et al.,2007).

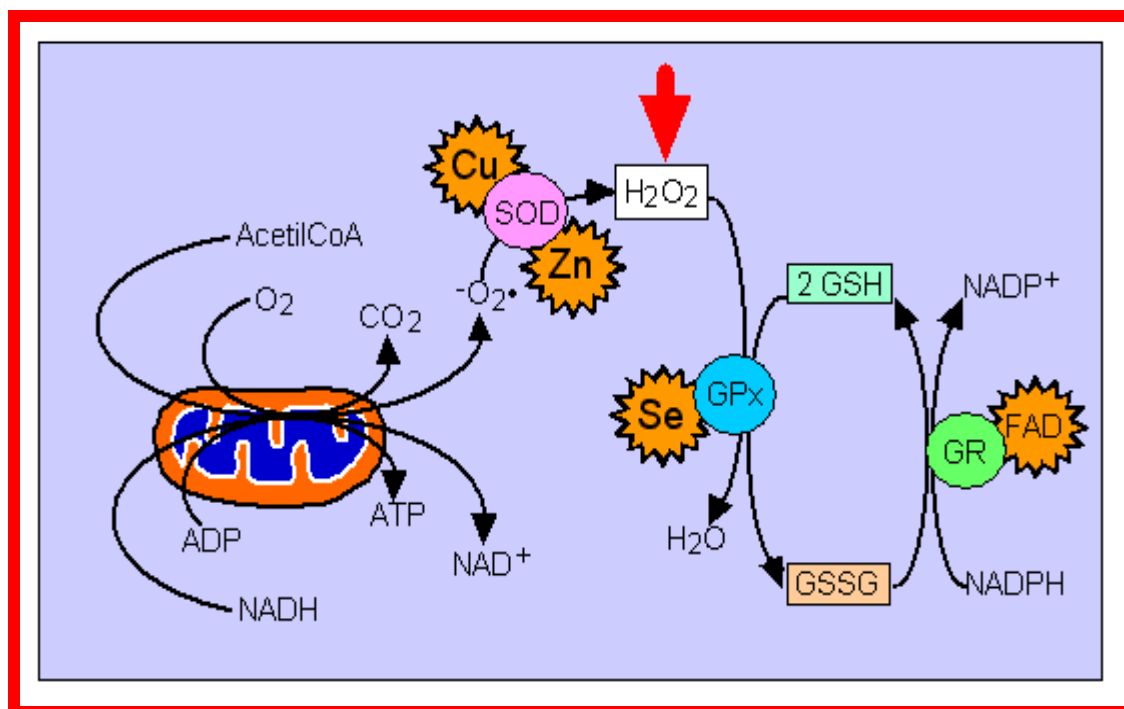


Figura 8 - Mecanismo de ação da GSH.
Adaptado de Halliwell et al.(1999)

A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante do momento de isquemia-reperfusão (SUN et al., 2009).

2.7.2.2 Antioxidantes não-enzimáticos

Os antioxidantes não-enzimáticos são representados pela glutathione (GSH), tióis não-protéicos, ácido ascórbico (vitamina C) e α -tocoferol (vitamina E).

2.7.2.2.1 Glutationa (GSH)

A GSH é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glicina, cisteína e ácido glutâmico. Além de ser o principal tiol não-protéico intracelular livre encontrado em vários tecidos biológicos, é também, o principal antioxidante endógeno, sendo considerado um antioxidante multifatorial (MEISTER e ANDERSON, 1983; NOZAL et al., 1997).

Muitas das reações da GSH envolvem o grupo sulfidril (SH), altamente polarizável, tornando-o um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos. Essa habilidade de doar elétrons a outros compostos também faz da glutatona um bom redutor. A combinação de sua abundância nos organismos aeróbicos e das propriedades químicas do grupo sulfidril suporta a proposta de que a GSH surgiu na evolução bioquímica como uma proteção contra EROs e compostos eletrofílicos gerados por processos oxidativos, tanto no organismo quanto no ambiente em que este vive (CECCONI et al., 1988; SUN et al., 2009).

Dentre outras funções fisiológicas, ela é seqüestradora de RL (NOZAL et al., 1997), detoxificando metabólitos eletrofílicos, não somente como doador imediato de elétrons para neutralizar o H_2O_2 e lipoperóxidos, mas também como um seqüestrador de RLs de oxigênio e nitrogênio (LEICHTWEIS e JI, 2001).

A glutatona está também envolvida no metabolismo do ácido ascórbico, na manutenção da comunicação entre as células, na prevenção da oxidação dos grupos tiol presentes nas proteínas e no transporte do cobre intracelular. A mitocôndria e o núcleo têm a sua própria reserva de GSH de importância crucial na proteção dessas estruturas contra a ação das EROs (QIAO et al., 2009). Os TNP têm uma importante função na defesa contra EROs (MASSELA et al., 2005; KALININA et al., 2008).

2.7.2.2.2 Vitamina C (Vit C)

A vitamina C (ácido ascórbico) é considerada a primeira defesa antioxidante (YAMAMOTO et al., 1998) e interage com as EROs na fase aquosa do plasma antes

que eles possam agir oxidativamente sobre lipídios e lipoproteínas (BENZIE e STRAIN, 1999; FOTI e AMORATI, 2009). Protege as membranas celulares contra a oxidação (RETSKY et al., 1999) e, adicionalmente, tem sido relatada sua habilidade em regular fatores que influenciam algumas funções celulares, conferindo-lhe um papel na modulação do sistema imune (YOU et al., 2000). Está envolvida na regeneração de α -tocoferil em α -tocoferol (CHAN, 1993). Estudos clássicos mostram que, em condições de estresse oxidativo, até que toda a Vit C seja consumida, não ocorre perdas significativas de outros antioxidantes nem aumento da lipoperoxidação em plasma humano (FREI et al., 1988).

2.7.2.2.3 Vitamina E (Vit E)

A vitamina E (ou α -tocoferol), devido à característica lipossolúvel, é o principal antioxidante que age contra o processo de lipoperoxidação (PRYOR, 2000; HASTY et al., 2007). É um antioxidante fenólico e que, dentre eles, o α -tocoferol tem sido considerado o mais ativo biologicamente e o principal antioxidante lipossolúvel nas membranas celulares (MAYNE, 2003; FOTI e AMORATI, 2009). A sua ação antioxidante resulta da converção do radical hidroxila e superóxido em formas menos ativas, e pode ser regenerada, pela Vit C e pela GSH (CHAN, 1993).

De acordo com Bonithon-Kopp et al. (1997), a Vit E é o o mais importante antioxidante endógeno para a LDL. Quando há depleção de antioxidantes na molécula de LDL, ocorre peroxidação lipídica em cadeia e a presença de antioxidantes nessa lipoproteína retarda o início desse processo (MOSCA et al., 1997). Quando os níveis plasmáticos de Vit E estão diminuídos, ocorre aumento da viscosidade do sangue e ativação das plaquetas predispondo à formação de coágulos (STAMPFER e RIMM, 1995; KIRMIZIS e CHATZIDIMITRIOU, 2009).

O seu efeito anti-aterogênico é representado por inibir a proliferação de células musculares lisas e diminuir a adesão e agregação plaquetária (HARRIS et al., 2002). Além disso, ela tem efeito modulador sobre as respostas inflamatória e imune, pois diminui a proliferação de monócitos e linfócitos T. Sua deficiência aumenta os componentes da resposta inflamatória e prejudica a imunidade celular e

humoral (CHAN, 1993; SERDAR et al., 2006; HASTY et al., 2007; KIRMIZIS e CHATZIDIMITRIOU, 2009).

2.8 Polimorfismo da Superóxido Dismutase (MnSOD/SOD2)

A lesão do DNA mitocondrial causada pelo estresse oxidativo merece destaque pelo fato da mitocôndria ser a principal fonte de EROs. Por essa razão, o DNA está exposto a altos níveis EROs, promovendo mutações nos genes das próprias enzimas antioxidantes. Em resposta à hipercolesterolemia, macrófagos, linfócitos e células musculares lisas liberam citocinas à circulação sistêmica, induzindo a ativação da cascata inflamatória que promove dano oxidativo intracelular e mutação gênica, especialmente da MnSOD (MATTES, 2002; FORTUNATO e DI TARANTO, 2007; DEDOUSSIS et al., 2008).

O gene da MnSOD está localizado no cromossomo 6q25, possui 5 éxons e 4 íntrons (existe apenas uma cópia deste gene) e a sua proteína é sintetizada no citosol e modificada pós-transcricionalmente dentro da mitocôndria (WISPE et al., 1989; SHIMODA-MATSUBAYASHI et al., 1996). Por ser produzida no citosol tal enzima precisa ser carregada para o interior da mitocôndria. Este processo é coordenado por uma sequência peptídica sintetizada e presente no início da proteína MnSOD, ainda inativa, conhecida como MTS. Um dos polimorfismos mais estudados do gene da MnSOD ocorre nesta sequência. Este é genericamente denominado Ala16Val, que se origina por uma mutação estrutural no gene. Esta mutação provoca a substituição de uma citosina por uma timina na sequência codificadora, convertendo o códon GCT (alanina) para GTT (valina), (WISPE et al., 1989), conforme Figura 9.

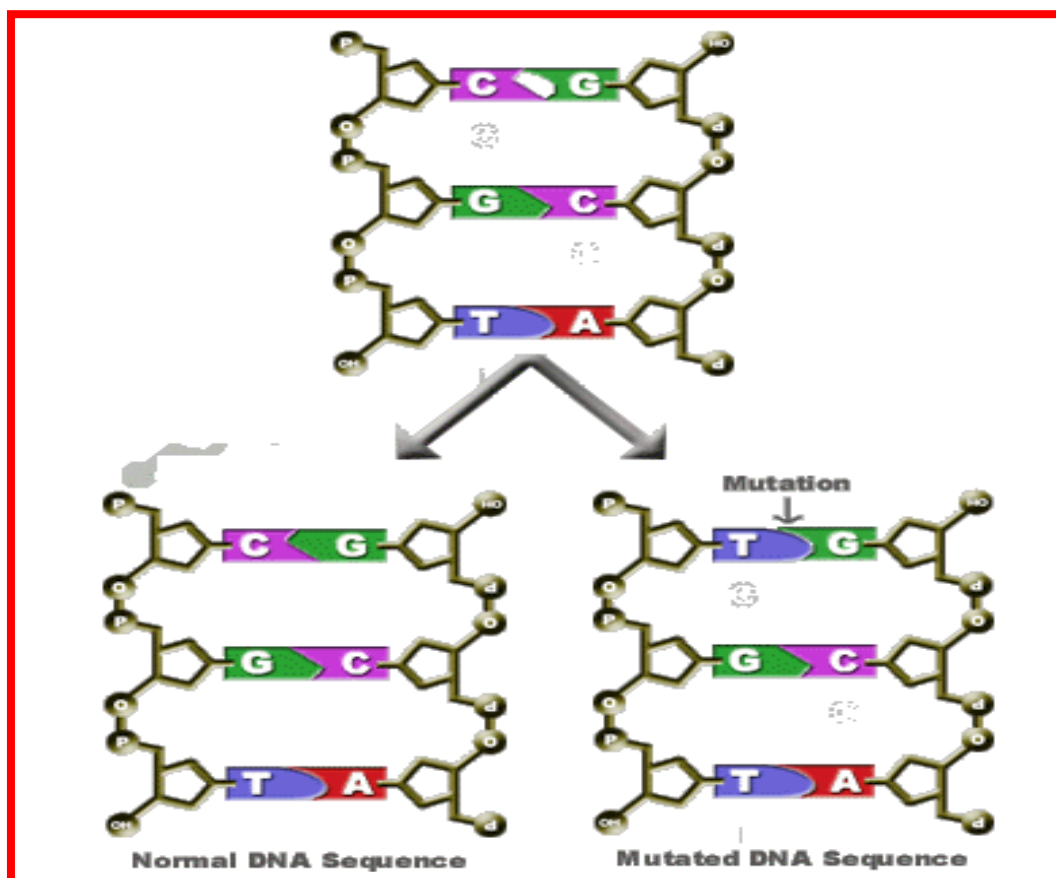


Figura 9 - Polimorfismo Ala16Val da MnSOD.
Adaptado de Rosenblum et al. (1996).

Três genótipos são descritos no polimorfismo da MnSOD: genótipo AA, genótipo AV e genótipo VV (ROSENBLUM et al., 1996).

A substituição da Alanina por Valina (polimorfismo Ala16Val) mostra que o alelo Val (V) afeta a conformação da seqüência da proteína imatura da MnSOD, a qual é sintetizada e está presente no citosol, dificultando o transporte e a entrada da mesma para o interior da mitocôndria, onde a enzima será cortada e se tornará ativa. Essas dificuldades fazem com que indivíduos portadores do alelo V tenham uma menor eficiência enzimática da MnSOD do que os que possuem o alelo Ala (A), (SHIMODA-MATSUBAYASHI et al., 1996).

O alelo Ala apresenta uma estrutura proteica do tipo α -hélice, que permite o seu eficiente transporte do citosol para a mitocôndria. A valina variante (Ala/Val ou Val /Val) parece apresentar uma estrutura β -hélice pregueada, dificultando assim o seu transporte para o espaço mitocondrial e, desta forma, reduzindo a sua atividade antioxidante (BOHNI et al., 1983).

Estudos prévios sugerem que esse polimorfismo da MnSOD está associado à patologias cuja etiologia é induzida por dano oxidativo como a aterosclerose (HIROI et al., 1996). Kakko et al. (2003) investigaram a associação entre o genótipo VV ao espessamento da carótida. A capacidade antioxidante de portadores VV poderia estar diminuída, levando por consequência ao aumento no estresse oxidativo. Este aumento no estresse oxidativo poderia levar a expressão de moléculas de adesão, promovendo assim o início de um processo aterosclerótico.

Corroborando estes achados, Gottlieb e colaboradores (2005) observaram que indivíduos com DM2 apresentavam uma maior frequência do alelo V da MnSOD, bem como maiores níveis de ox-LDL. Fujimoto et al. (2008), encontraram uma associação com o genótipo AA no aumento da atividade mitocondrial da MnSOD, protegendo os macrófagos da apoptose induzida pelo ox-LDL, diminuindo o processo inflamatório e reduzindo os riscos infarto agudo do miocárdio (IAM) e das DC.

Recentemente Dedoussis et al. (2008), em seus estudos, verificaram que homens de meia idade com genótipo VV apresentavam elevados níveis de ox-LDL quando comparados com os outros genótipos (AA e AV). Ainda, Montano et al. (2009) encontraram uma maior frequência do genótipo VV em indivíduos obesos. Os autores estimaram uma razão de chance (RC) 1.5 vezes maior de indivíduos VV serem obesos do que indivíduos AA e AV (RC= 1.551, 95% IC: 1.010-2.380). Estes resultados foram independentes do sexo, idade e padrões nutricionais. Além disso, sugerem que a baixa eficiência do genótipo VV da MnSOD pode levar a um aumento dos níveis do ânion superóxido, o que pode afetar rotas metabólicas e hormonais, iniciando uma retroalimentação positiva: estresse oxidativo – obesidade – estresse oxidativo.

A hipercolesterolemia, por tratar-se, de uma condição associada a distúrbios inflamatórios e de estresse oxidativo repercutindo em um alto impacto nas DC, torna-se relevante a realização de investigações complementares sobre os mecanismos desencadeadores da referida doença e de seus efeitos sistêmicos.

Avaliar as alterações bioquímicas, inflamatórias e genético-moleculares, especialmente das enzimas antioxidantes, poderá servir como subsídio para elaborar novas formas de prevenção e tratamento da aterosclerose e DC estabelecidas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo investigar a interação da hipercolesterolemia na modulação de marcadores bioquímicos, inflamatórios, oxidativos e genéticos em humanos.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a associação entre IMA e hipercolesterolemia e sua possível correlação com os níveis de HDL, ox-LDL e indicadores de processo inflamatório PCR-us, Anti-ox-LDL, em pacientes com colesterol elevado.
- Analisar a associação entre o nível de colesterol elevado e a ocorrência de estresse oxidativo, através da determinação dos níveis de TBARS (indicador de peroxidação lipídica) e conteúdo de grupos carbonil (indicador de oxidação protéica).
- Avaliar a relação entre o nível de colesterol total sanguíneo elevado e de uma possível resposta antioxidante, dosando as enzimas Catalase, Superóxido Dismutase (SOD), e antioxidantes não enzimáticos (GSH, Tióis totais, Vit C e Vit E).
- Analisar a associação entre o polimorfismo Ala16Val MnSOD em indivíduos com hipercolesterolemia comparando com os indivíduos com níveis de colesterol normal.
- Analisar os diferentes genótipos da Ala16Val MnSOD em indivíduos com hipercolesterolemia comparando com os indivíduos com marcadores bioquímicos lipídicos, do estresse oxidativo e inflamatórios.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos científicos, os quais se encontram aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se nos próprios artigos. O artigo 1 está na forma como foi publicado na revista, enquanto os manuscritos 1 e 2 estão na forma como foram submetidos aos respectivos periódicos.

**4.1 ASSOCIAÇÃO ENTRE ALBUMINA MODIFICADA NA ISQUEMIA,
LIPÍDIOS E BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM
PACIENTES COM HIPERCOLESTEROLEMIA**

Artigo 1

**ASSOCIATION BETWEEN ISCHEMIA-MODIFIED ALBUMIN, LIPIDS AND
INFLAMMATION BIOMARKERS IN PATIENTS WITH
HYPERCHOLESTEROLEMIA**

Marta M.M.F. Duarte, João B.T. Rocha, Rafael N. Moresco, Thiago Duarte,
Ivana B.M. Da Cruz, Vânia L. Loro, Maria R.C. Schetinger

Clinical Biochemistry 42 (2009) 666–671



Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia

Marta M.M.F. Duarte^a, João B.T. Rocha^{a,b}, Rafael N. Moresco^c, Thiago Duarte^d,
Ivana B.M. Da Cruz^a, Vânia L. Loro^{a,b}, Maria R.C. Schetinger^{a,b,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^b Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^c Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^d Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

Received 31 October 2008; received in revised form 20 January 2009; accepted 23 January 2009

Available online 4 February 2009

Abstract

Objectives: The aim of this study was to evaluate the association between ischemia-modified albumin (IMA), lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia, and the possible involvement of IMA in atheromatous plaque development and oxidative stress.

Design and methods: Glucose, total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, oxidized LDL (ox-LDL), ox-LDL autoantibodies, high-sensitivity C reactive protein (hs-CRP), and IMA were measured in 37 subjects with hypercholesterolemia and 37 controls.

Results: Total cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, ox-LDL, ox-LDL autoantibodies, hs-CRP, and IMA were higher in the hypercholesterolemia group, and HDL cholesterol levels were lower in this group. We observed significant correlations between IMA and total cholesterol, LDL cholesterol, ox-LDL antibodies, and hs-CRP levels. Significant correlations were also observed between hs-CRP and total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, ox-LDL, ox-LDL autoantibodies, and triglycerides.

Conclusions: Hypercholesterolemia is associated with an increase in inflammatory and oxidative stress biomarkers, and it also reduces the capacity of albumin to bind cobalt owing to ischemia, resulting in an increased IMA. IMA formation appears to be associated with oxidative stress and atheromatous plaque development.

© 2009 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Ischemia-modified albumin; Hypercholesterolemia; Inflammation; Oxidative stress

Introduction

Hypercholesterolemia is associated with several manifestations of endothelial dysfunctions, and it is one of the major risk factors for atherosclerosis [1,2]. Atherosclerosis is a chronic inflammatory condition associated with an overproduction of reactive oxygen species (ROS), endothelial cell activation, and the accumulation of leukocytes in the walls of arteries [3]. There is increasing evidence that oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) plays an important role in the development of

atherosclerosis, and an increase in ox-LDL autoantibodies has been reported in atherosclerotic lesions [4–7]. High-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) enhances the binding of ox-LDL to monocytic/macrophage-like cells through Fc receptors [8–10]. It is now proven that inflammation plays a pivotal role in the development of atherosclerotic changes, and that hypercholesterolemia can initiate and enhance the inflammatory response. Since inflammation has been proven to initiate and maintain the formation of atheromatous plaques in coronary and peripheral arteries, interest in predictive markers has increased immensely [11].

Atherosclerosis is usually accompanied by oxidative stress, which consists in the damage of biological structures by ROS due to their excessive generation and the impaired efficiency of antioxidant defense mechanisms [12]. The generation of ROS can transiently modify the N-terminal region of albumin and

* Corresponding author. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Fax: +55 55 32208978.

E-mail address: maria.schetinger@gmail.com (M.R.C. Schetinger).

Table 1
Baseline characteristics of study participants

	Control	Hypercholesterolemia
<i>n</i>	37	37
Age, mean±SD (years)	49.14±12.10	48.19±2.05
Male (%)	48.6	51.4
Glucose (mmol/L)	4.52±0.06	4.75±0.06*
Total cholesterol (mmol/L)	3.80±0.08	7.79±0.23**
HDL cholesterol (mmol/L)	1.31±0.04	1.16±0.06*
LDL cholesterol (mmol/L)	1.98±0.05	5.39±0.28**
Triglycerides (mmol/L)	1.09±0.08	2.70±0.33**
ox-LDL (mg/L)	1.84±0.46	7.74±0.60**
ox-LDL autoantibodies (mg/L)	3.21±0.37	35.82±1.52**
hs-CRP (mg/L)	1.80±0.11	20.28±3.05**
IMA (ABSU)	0.3349±0.0077	0.3839±0.0181*

Data are expressed as mean±SEM. IMA results are expressed in absorbance units (ABSU). * $P<0.05$ and ** $P<0.001$.

produce an increase in the concentration of ischemia-modified albumin (IMA), a new marker for ischemia [13,14]. IMA has been shown to be a sensitive biochemical marker of rapidly growing interest, especially for the diagnosis of myocardial ischemia [15]. Admission measurement of IMA can be used for

early classification of patients presenting to the emergency department (ED), to assist in patient triage [16], because negative IMA has a high negative predictive value for excluding acute coronary syndromes [17]. However, some authors do not support the use of IMA as an effective risk stratification tool for patients with chest pain in the ED, especially due to its low specificity [18]. Thus, considering the importance of IMA as a sensitive biochemical marker for the diagnosis of cardiovascular diseases and the link between hypercholesterolemia, oxidative stress and the inflammatory aspects of atherosclerosis, the aim of this study was to evaluate the interaction between IMA, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia to determine its possible role in atheroma plaque development.

Materials and methods

Study population

Subjects were enrolled prospectively in this study from LABIMED, located in Santa Maria-RS, Brazil. Subjects were divided into two groups according to serum cholesterol levels

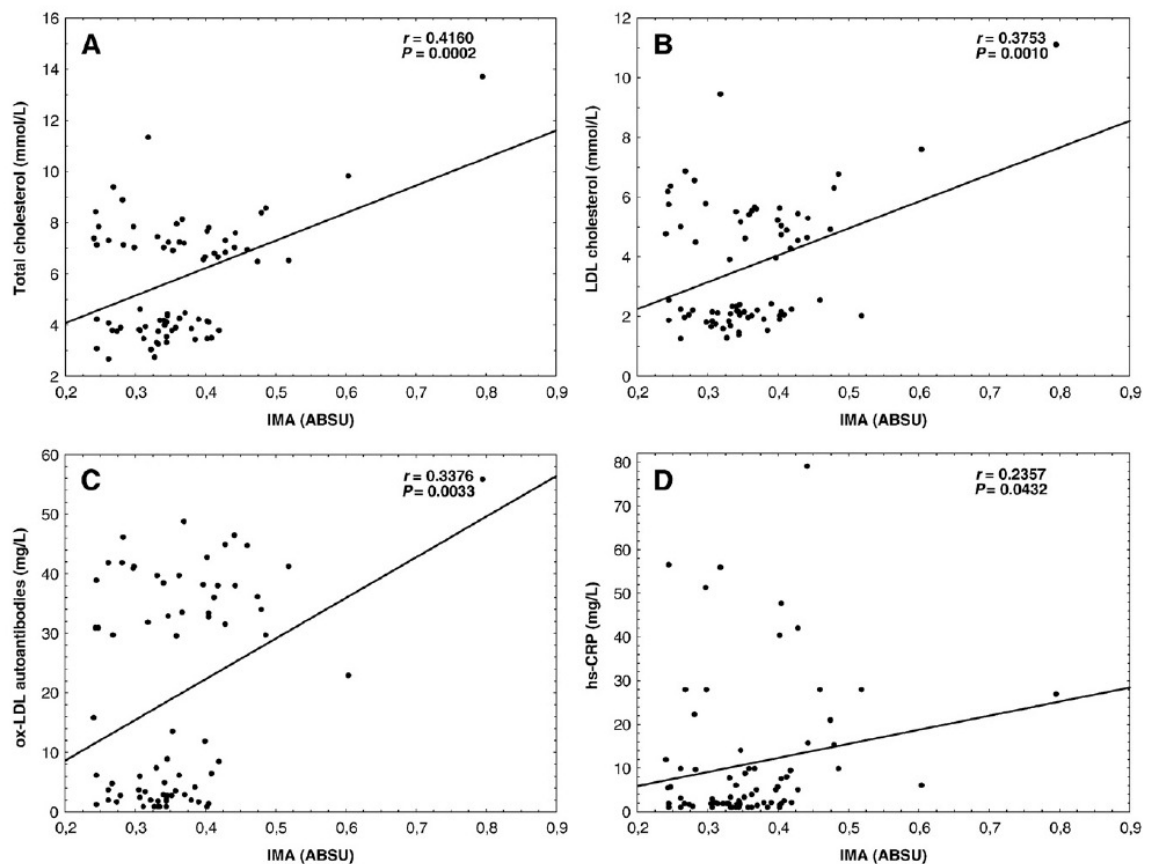


Fig. 1. Significant correlations between (A) IMA and total cholesterol ($r=0.4160$, $P=0.0002$), (B) IMA and LDL cholesterol ($r=0.3753$, $P=0.0010$), (C) IMA and ox-LDL antibodies ($r=0.3376$, $P=0.0033$), and (D) IMA and hs-CRP ($r=0.2357$, $P=0.0432$). Results of IMA were expressed in absorbance units (ABSU). Results of total cholesterol and LDL cholesterol were expressed in mmol/L, and hs-CRP and ox-LDL autoantibodies were expressed in mg/L.

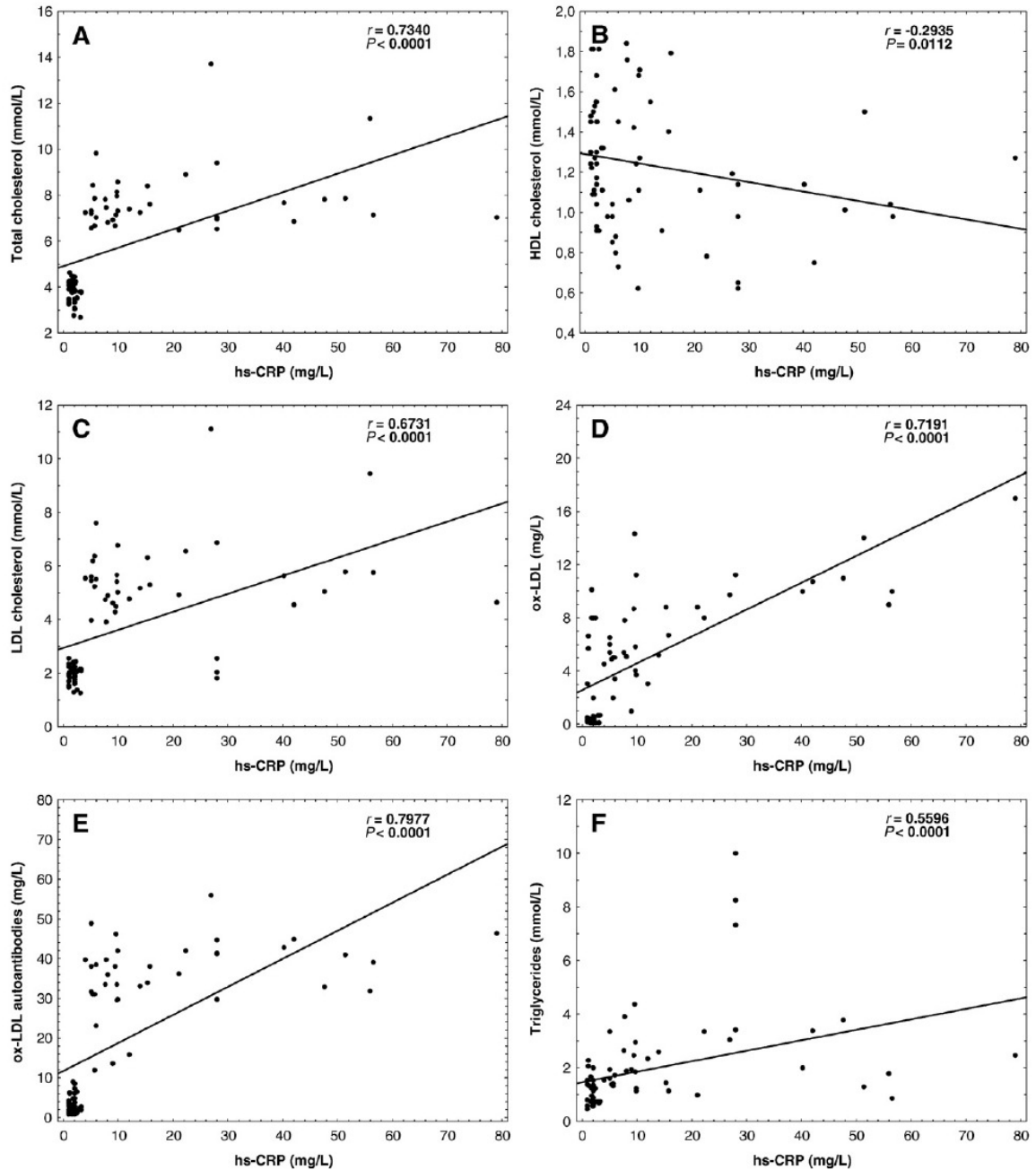


Fig. 2. Significant correlations between (A) hs-CRP and total cholesterol ($r=0.7340$, $P<0.0001$), (B) hs-CRP and HDL cholesterol ($r=-0.2935$, $P=0.0112$), (C) hs-CRP and LDL cholesterol ($r=0.6731$, $P<0.0001$), (D) hs-CRP and ox-LDL ($r=0.7191$, $P<0.0001$), (E) hs-CRP and ox-LDL autoantibodies ($r=0.7977$, $P<0.0001$), and (F) hs-CRP and triglycerides ($r=0.5596$, $P<0.0001$). Results of total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, and triglycerides were expressed in mmol/L. hs-CRP, ox-LDL and ox-LDL autoantibodies were expressed in mg/L.

as follows: control group, 37 healthy subjects with cholesterol levels ranging from 104 to 178 mg/dL (2.69–4.61 mmol/L); and hypercholesterolemia group, 37 subjects with cholesterol levels ranging from 250 to 529 mg/dL (6.47–13.70 mmol/L). Hypercholesterolemia was defined as a LDL cholesterol ≥ 160 mg/dL (4.15 mmol/L) [19].

Smokers, diabetics and subjects undergoing hypolipemic treatment or taking anti-inflammatory medications were excluded from this study. All subjects provided written informed consent, and this protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (number 23081.009087/2008).

Biochemical determinations

Blood samples were collected after a 12-h overnight fasting by venous puncture into gray and red top Vacutainers® (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with sodium fluoride plus potassium oxalate or no anticoagulant, respectively. Specimens were routinely centrifuged within 1 h of collection for 15 min at 2500 g, and aliquots of serum samples were stored at -20°C for a maximum of 4 weeks before IMA measurement. Plasma glucose and serum total cholesterol and triglyceride concentrations were measured using standard enzymatic methods using Ortho-Clinical Diagnostics® reagents on a fully automated analyzer (Vitros 950® dry chemistry system; Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA). High-density lipoprotein cholesterol was measured in the supernatant plasma after precipitation of apolipoprotein B-containing lipoproteins with dextran sulfate and magnesium chloride, as previously described [20]. Low-density lipoprotein cholesterol was estimated with the Friedewald equation [21]. hs-CRP was measured by nephelometry (Dade Behring, Newark, DE, USA). Ox-LDL was determined by a capture ELISA according to the manufacturer's instructions (Merckodia AB, Uppsala, Sweden), as described by Holvoet et al. [22]. Ox-LDL autoantibodies were determined using ELISA as described by Wu and Lefvert [23]. Serum IMA was measured by a colorimetric assay previously described by Bar-Or et al. [24]. This method involved adding 50 μL of 0.1% cobalt chloride (Sigma, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) in H_2O to 200 μL of serum, gently mixing, and waiting 10 min for adequate cobalt-albumin binding. Fifty microliters of dithiothreitol (DTT) (Sigma, 1.5 mg/mL H_2O) was added as a color developing agent and the reaction was quenched 2 min later by adding 1.0 mL of 0.9% NaCl. Using a spectrophotometer at 470 nm (Hitachi U-2800A®, Hitachi High-Technologies Corporation, Japan), color development with DTT was compared to a serum-cobalt blank without DTT and reported in absorbance units (ABSU) [24]. The colorimetric assay format quantitatively measures unbound cobalt remaining after cobalt-albumin binding has occurred. Thus, with reduced cobalt-albumin binding, there is more unbound cobalt, resulting in elevated absorbance levels.

Statistical analysis

Data were analyzed statistically by the Mann–Whitney *U* test to evaluate the differences between groups. Spearman correlation was assessed to evaluate the correlations between the variables. Statistical significance was assumed at $P < 0.05$.

Results

A total of 74 subjects were investigated in this study, consisting of 37 subjects with hypercholesterolemia and 37 controls. Baseline characteristics of the study subjects are shown in Table 1. Glucose, total cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, ox-LDL, ox-LDL autoantibodies, hs-CRP, and IMA levels were significantly higher in subjects with hypercholesterolemia. HDL cholesterol levels were signifi-

cantly lower in subjects with hypercholesterolemia. We observed significant correlations between IMA and total cholesterol ($r = 0.4160$, $P = 0.0002$), IMA and LDL cholesterol ($r = 0.3753$, $P = 0.0010$), IMA and ox-LDL antibodies ($r = 0.3376$, $P = 0.0033$), and IMA and hs-CRP ($r = 0.2357$, $P = 0.0432$), as shown in Fig. 1. The results indicate positive correlations between IMA and some atherogenic species in the serum of asymptomatic hypercholesterolemia subjects, suggesting a role for identifying people with subclinical atherosclerotic lesions. Significant correlations were also observed between hs-CRP and total cholesterol ($r = 0.7340$, $P < 0.0001$), hs-CRP and HDL cholesterol ($r = -0.2935$, $P = 0.0112$), hs-CRP and LDL cholesterol ($r = 0.6731$, $P < 0.0001$), hs-CRP and ox-LDL ($r = 0.7191$, $P < 0.0001$), hs-CRP and ox-LDL autoantibodies ($r = 0.7977$, $P < 0.0001$), and hs-CRP and triglycerides ($r = 0.5596$, $P < 0.0001$), as shown in Fig. 2. The results indicate a stronger relationship with hs-CRP than with IMA.

Discussion

The results of the present study showed that hypercholesterolemia is associated with an increase in ox-LDL, ox-LDL autoantibodies, and inflammatory markers such as hs-CRP. Besides, hypercholesterolemia and the increase in inflammatory response are associated with higher levels of IMA. Subjects with high cholesterol may have a predisposition to atheroma plaque development. We report here a positive correlation between high cholesterol levels and hs-CRP production, which was in accordance with literature data [25–28]. Plaque formation in hypercholesterolemic subjects is associated with an increase in chronic inflammation and elevated hs-CRP, and it could be also related to the ischemic process because of the positive association between serum levels of cholesterol, hs-CRP and IMA. The results of this study also indicate a positive correlation between IMA and ox-LDL autoantibodies. To the best of our knowledge, this is the first report about the association between IMA and ox-LDL autoantibodies. Overproduction of free radicals may produce a chemical modification of human serum albumin, resulting in an increased IMA, and IMA appears to play a role as an oxidative stress biomarker. The measurement of IMA in the serum of asymptomatic hypercholesterolemia subjects could be of diagnostic and prognostic benefit because its results were associated with ox-LDL autoantibodies, suggesting a role for IMA in identifying people with subclinical atherosclerotic lesions.

High cholesterol levels favor oxidative stress leading to the modification of LDL. Under conditions of oxidative stress, the lipoprotein phospholipids become progressively oxidized [29,30]. Free radicals play an important role in the dysfunction of the endothelium. Endothelial dysfunction is characterized by a functional disruption of the protective endothelium, unleashing not only the internalization of cholesterol, but also the recruitment of inflammatory cells into the vessel wall, initiating the atherosclerotic process [31]. Oxidative stress may be a determinant of increased CRP levels and promote pro-atherosclerotic inflammatory processes at the earliest stages of coronary heart disease [32,33]. In this study, both IMA and CRP

values were significantly higher in subjects with hypercholesterolemia. IMA is associated with excessive protein oxidative stress, and protein oxidation may occur early in the pathogenesis of atherosclerosis and may indicate underlying subclinical disease [34]. IMA seems to have a short half-life, returning to baseline values in 6–12 h, as shown recently in patients with stable angina pectoris after transient ischemia induced during elective percutaneous transluminal angioplasty [35]. The injury to endothelial cells causing stunning after inflammatory response has been associated with elevated levels of IMA [36].

Several reports demonstrate that ischemia followed by reperfusion elicit a cascade of proinflammatory reactions that are known to lead to the production of ROS [3,12]. The increase in oxidative stress associated with hypercholesterolemia induces higher levels of ox-LDL, which is linked to inflammatory response in venules [37]. Oxidative modification of LDL induces the formation of immunogenic epitopes in the LDL molecule, which leads to the formation of antibodies against oxidized LDL which can be detected in serum. Anti-oxidized LDL antibodies in atherosclerotic lesions have been shown to block the uptake of oxidized LDL by macrophages, suggesting a possible role in preventing the formation of foam cells [38–40].

The negative correlation between HDL and hs-CRP reported in this study is in agreement with data obtained by Wadham et al. [41]. Previous studies reported that HDL inhibits the cytokine-induced expression of inflammatory adhesion molecules in endothelial cells. These findings demonstrate a potent anti-inflammatory capacity of HDL, which could account for the protective effect of HDL against atherogenesis [42]. HDL may provide protection by inhibiting the oxidative modification of LDL, which plays a central role in the initiation and propagation of atherosclerosis. Several lines of evidence suggest that HDL can act as an antioxidant through the activity of HDL-associated proteins, including paraoxonase 1 [43–45].

In summary, the present study demonstrated an association between IMA, lipids and inflammation biomarkers. Hypercholesterolemia is associated with an increase in inflammatory and oxidative stress biomarkers, and it also induces free radical formation and reduces the capacity of albumin to bind cobalt owing to ischemia, resulting in an increased IMA. Moreover, there was a significant association between IMA and hs-CRP, and this finding suggests a possible role of IMA as a marker of atheroma plaque development. However, further larger clinical studies are required to better understand this association as well as the role of IMA as a marker of atheromatous plaque development and as a marker of ischemia for the diagnosis of acute coronary syndromes in patients with hypercholesterolemia.

References

- [1] Kannel WB, Castelli WP, Gordon T. Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. *Ann Intern Med* 1979;90:85–91.
- [2] Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868–74.
- [3] Kotur-Stevuljevic J, Memon L, Stefanovic A, et al. Correlation of oxidative stress parameters and inflammatory markers in coronary artery disease patients. *Clin Biochem* 2007;40:181–7.
- [4] Matsuura E, Kobayashi K, Tabuchi M, Lopez LR. Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis. *Prog Lipid Res* 2006;45:466–86.
- [5] Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med* 2001;11:93–102.
- [6] Yla-Herttuala S, Palinski W, Butler S, Picard S, Steinberg D, Witztum J. Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb* 1994;14:32–40.
- [7] Duarte MMMF, Loro VL, Rocha JBT, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. *FEBS J* 2007;274:2707–14.
- [8] Ridker PM, Wilson PWF, Grundy SM. Should C-reactive protein be added to metabolic syndrome and to assessment of global cardiovascular risk? *Circulation* 2004;109:2818–25.
- [9] Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes: part II: acute-phase reactants and biomarkers of endothelial cell activation. *Circulation* 2006;113:152–5.
- [10] Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2004;350:1387–9.
- [11] Francisco G, Hernández C, Simó R. Serum markers of vascular inflammation in dyslipemia. *Clin Chim Acta* 2006;369:1–16.
- [12] Vassalle C, Pratali L, Boni C, Mercuri A, Ndreu R. An oxidative stress score as a combined measure of the pro-oxidant and anti-oxidant counterparts in patients with coronary artery disease. *Clin Biochem* 2008;41:1162–7.
- [13] Cichota LC, Moresco RN, Duarte MMMF, Paz da Silva JE. Evaluation of ischemia-modified albumin in anemia associated to chronic kidney disease. *J Clin Lab Anal* 2008;22:1–5.
- [14] Roy D, Quiles J, Gaze DC, Collinson P, Kaski JC, Baxter GF. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischemia modified albumin. *Heart* 2006;92:113–4.
- [15] Sinha MK, Roy D, Gaze DC, Collinson PO, Kaski JC. Role of “ischemia modified albumin”, a new biochemical marker of myocardial ischaemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Emerg Med J* 2004;21:29–34.
- [16] Collinson OP, Gaze DC, Bainbridge K, et al. Utility of admission cardiac troponin and “ischemia modified albumin” measurements for rapid evaluation and rule out of suspected acute myocardial infarction in the emergency department. *Emerg Med J* 2006;23:256–61.
- [17] Peacock F, Morris DL, Anwaruddin S, et al. Meta-analysis of ischemia-modified albumin to rule out acute coronary syndromes in the emergency department. *Am Heart J* 2006;152:253–62.
- [18] Keating L, Bengler JR, Beetham R, et al. The PRIMA Study: presentation ischaemia-modified albumin in the emergency department. *Emerg Med J* 2006;23:764–8.
- [19] Skilton MR, Moulin P, Sérusclat A, Nony P, Bonnet F. A comparison of the NCEP-ATPIII, IDF and AHA/NHLBI metabolic syndrome definitions with relation to early carotid atherosclerosis in subjects with hypercholesterolemia or at risk of CVD: evidence for sex-specific differences. *Atherosclerosis* 2007;190:416–22.
- [20] Bachorik PS, Albers JJ. Precipitation methods for quantification of lipoproteins. *Methods Enzymol* 1986;129:78–100.
- [21] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–502.
- [22] Holvoet P, Stassen JM, Van Cleemput J, Collen D, Vanhaecke J. Oxidized low density lipoproteins in patients with transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:100–7.
- [23] Wu R, Lefvert AK. Autoantibodies against oxidized low density lipoprotein (OxLDL): characterization of antibody isotype, subclass, affinity and effect on the macrophage uptake of oxLDL. *Clin Exp Immunol* 1995;102:174–80.
- [24] Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia: a preliminary report. *J Emerg Med* 2000;19:311–5.
- [25] Packard RRS, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 2008;54:24–38.

- [26] Reifenberg K, Lehr HA, Baskal D, et al. Role of C-reactive protein in atherogenesis: can the apolipoprotein E knockout mouse provide the answer? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1641–6.
- [27] Postadzhiyan AS, Tzontcheva AV, Kehayov I, Finkov B. Circulating soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and their association with clinical outcome, troponin T and C-reactive protein in patients with acute coronary syndromes. *Clin Biochem* 2008;41:126–33.
- [28] Stokes KY, Gurwara S, Granger DN. T-cell-derived interferon-gamma contributes to arteriolar dysfunction during acute hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1998–2004.
- [29] Rodriguez-Porcel M, Lerman A, Best PJM, Krier JD, Napoli C, Lerman LO. Hypercholesterolemia impairs myocardial perfusion and permeability: role of oxidative stress and endogenous scavenging activity. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:608–15.
- [30] Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:29–38.
- [31] Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes: part I: introduction and cytokines. *Circulation* 2006;113:72–5.
- [32] Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, et al. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000;342:836–43.
- [33] Kasap S, Gönenç A, Şener DE, Hisar I. Serum cardiac markers in patients with acute myocardial infarction: oxidative stress, C-reactive protein and N-terminal probrain natriuretic peptide. *J Clin Biochem Nutr* 2007;41:50–7.
- [34] Abramson JL, Hooper WC, Jones DP, et al. Association between novel oxidative stress markers and C-reactive protein among adults without clinical coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2005;178:115–21.
- [35] Dusek J, Stasek J, Tichy M, et al. Prognostic significance of ischemia modified albumin after percutaneous coronary intervention. *Clin Chim Acta* 2006;367:77–80.
- [36] Bogavac-Stanojević N, Jelić-Ivanović Z, Spasojević-Kalimanovska V, et al. Lipid and inflammatory markers for the prediction of coronary artery disease: a multi-marker approach. *Clin Biochem* 2007;40:1000–6.
- [37] Stokes KY, Clanton EC, Bowles KS, et al. The role of T-lymphocytes in hypercholesterolemia-induced leukocyte-endothelial interactions. *Microcirculation* 2002;9:407–17.
- [38] Shaw PX, Horkko S, Tsimikas S, et al. Human derived anti oxidized LDL autoantibody blocks uptake of oxidized LDL by macrophages and localizes to atherosclerotic lesions in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1333–9.
- [39] Tinahones FJ, Gómez-Zumaquero JM, Garrido-Sánchez L, et al. Influence of age and sex on levels of anti-oxidized LDL antibodies and anti-LDL immune complexes in the general population. *J Lipid Res* 2005;3:452–7.
- [40] Pengo V, Bison E, Ruffatti A, Iliceto S. Antibodies to oxidized LDL/ β 2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome patients with venous and arterial thromboembolism. *Thromb Res* 2008;122:556–9.
- [41] Wadham C, Albanese N, Roberts J, et al. High-density lipoproteins neutralize C-reactive protein proinflammatory activity. *Circulation* 2004;109:2116–22.
- [42] Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul P. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res* 2006;98:1352–64.
- [43] Assmann G, Gotto AM. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:III8–III14.
- [44] Deakin S, Moren X, James RW. HDL oxidation compromises its influence on paraoxonase-1 secretion and its capacity to modulate enzyme activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1146–52.
- [45] Jurek A, Turyna B, Kubit P, Klein A. The ability of HDL to inhibit VCAM-1 expression and oxidized LDL uptake is impaired in renal patients. *Clin Biochem* 2008;41:1015–8.

**4.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE HIPERCOLESTEROLEMIA E POLIMORFISMO DA
ALA16VAL SUPERÓXIDO DISMUTASE**

Manuscrito 1

**ASSOCIATION BETWEEN HYPERCHOLESTEROLEMIA AND ALA16VAL
SUPEROXIDE DISMUTASE GENE POLYMORPHISM**

Marta M. M. F. Duarte, Maria Gabriela do Vale Gottlieb, Rafael Noal Moresco,
Thiago Duarte, Vânia L. Loro, Maria Rosa C. Schetinger,
João Batista Teixeira Rocha, Ivana B. M. Da Cruz

Manuscrito Submetido para Clinica Chimica Acta

Submissão:

Ms. Ref. No.: CCA-D-09-01025

Title: ASSOCIATION BETWEEN HYPERCHOLESTEROLEMIA AND ALA16VAL
SUPEROXIDE DISMUTASE GENE POLYMORPHISM

Clinica Chimica Acta

Dear Dr Marta Duarte,

Your submission entitled "ASSOCIATION BETWEEN HYPERCHOLESTEROLEMIA AND ALA16VAL SUPEROXIDE DISMUTASE GENE POLYMORPHISM" has been assigned the following manuscript number: CCA-D-09-01025.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/cca/>.

Your username is: duartmm

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/cca/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

For further assistance, please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Kind regards,

Alan H. Wu

Editor

Clinica Chimica Acta

ASSOCIATION BETWEEN HYPERCHOLESTEROLEMIA AND ALA16VAL SUPEROXIDE DISMUTASE GENE POLYMORPHISM

Marta M. M. F. Duarte^a, Maria Gabriela do Vale Gottlieb^b, Rafael Noal Moresco^d,
Thiago Duarte^f, Vânia L. Loro^{a,c}, Maria Rosa C. Schetinger^{a,c}, João Batista Teixeira
Rocha^{a,b}, Ivana B. M. Da Cruz^{a,c,e}

^aPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

^cDepartamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^dDepartamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^eDepartamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^fCurso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

*Corresponding author: **Marta M. M. F. Duarte**

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Tel: +55 55 32208736, Fax: +55 55 32208736

E-mail: duartmm@hotmail.com

ABSTRACT

Hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction due to excessive production of reactive oxygen species is a major trigger of atherogenesis. Since the dismutation of superoxide is catalyzed by superoxide dismutase enzymes, we tested the possible association between hypercholesterolemia and Ala16Val manganese-dependent superoxide dismutase gene (MnSOD) polymorphism, as well as the interaction with levels of lipid and inflammatory biomarkers. A case-control was performed including 915 subjects. We found a positive association between Ala16Val MnSOD genotypes and hypercholesterolemia since lower A allele frequency was observed in the hypercholesterolemic group ($p=0.001$). The total cholesterol, LDL-cholesterol, hs-CRP, oxLDL and oxLDL autoantibodies levels were not influenced by MnSOD polymorphism, just by hypercholesterolemia. However, hypercholesterolemic AV/VV genotype carriers showed significantly lower HDL cholesterol values compared to other groups. A possible biological explanation for VV and hypercholesterolemia association could be a chronic state of superoxide imbalance present in VV carriers, which could affect differential metabolic pathways triggering a lipid imbalance.

KEY-WORDS: Hypercholesterolemia; ALA16VALsuperoxide dismutase gene polymorphism; coronary artery disease; inflammatory biomarkers; lipid profile

1. INTRODUCTION

Hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction due to excessive production of reactive oxygen species is a major trigger of atherogenesis. Several factors are associated with hypercholesterolemia, including increased superoxide generation [1].

Superoxide anion and its derivatives activate redox-sensitive signaling pathways, stimulate vascular smooth muscle cell mitogenesis, and regulate the signaling of hypoxia and apoptosis. In addition, nitric oxide scavenging by superoxide reduces the bioactivity of nitric oxide and produces peroxynitrite, a strong oxidant that nitrosylates cellular proteins and lipids [2]. Increased superoxide production is a feature of vascular disease states, including atherosclerosis, hypertension and diabetes [3].

Superoxide (O_2^-), a powerful free radical, contributes to the development of atherosclerosis by its inhibitory effect on nitric oxide (NO). Superoxide-producing enzymes involved in the increased production of reactive oxygen species include NADPH oxidase, nitric oxide synthase in the uncoupled state, mitochondrial superoxide sources, cyclooxygenase and xanthine oxidase. Superoxide ions are destroyed by superoxide dismutases (SOD) which are considered the first enzymes in the defense against oxidative stress produced by normal metabolism [1]. All SODs efficiently convert O_2^- to H_2O_2 which is then degraded to water by catalase or glutathione peroxidase [4].

Genetic studies have described a single amino acid polymorphism in MnSOD. The change of alanine (Ala) to valine (Val) at the 16th amino acid (16th amino acid from the beginning of the signal sequence or -9th amino acid from the first amino acid of the mature protein) of the signal sequence of MnSOD (Ala16Val) is believed to change the secondary structure of the premature protein and therefore the mitochondrial targeting of the enzyme [5]. In vitro investigations performed using the import of chimeric proteins in mice showed that the Ala-MnSOD precursor generated 30-40% more of the active processed matrical MnSOD homotetramer, than the Val-MnSOD precursor. In this case, Ala-MnSOD/MTS allows efficient MnSOD import into the mitochondrial matrix, while the Val-variant causes partial arrest of the precursor within the inner membrane and decreased formation of the active MnSOD homotetramer in the mitochondrial matrix [6].

The Ala allele (AA), thought to alter enzyme transportation into the mitochondria, has been associated with increased risk for breast, prostate and colon cancer, hepatocellular carcinoma in HCV infection and malignant pleural mesothelioma [7,8,9,10,11]. Surprisingly, additional epidemiological investigations have suggested that the V allele is not a “good genetic variant” since it has been associated with carotid atherosclerosis quantified as intima-media thickness (IMT) by ultrasound [12,13], with non-familial dilated cardiomyopathy in Japanese subjects [14], and higher oxidized LDL (oxLDL) levels in Brazilian subjects with a synergistic effect in diabetes type 2 patients [15]. On the other hand, studies have shown that the A allele variant of signal peptide which increases mitochondrial MnSOD activity, protects macrophages against oxLDL-induced apoptosis, and reduces the risk of coronary artery disease and acute myocardial infarction (AMI) [16] Recently, we observed a positive association between the ValVal genotype of MnSOD gene polymorphism and obesity [17].

However, it is not clear if this polymorphism could have some influence in lipid and inflammatory metabolism since subjects with metabolic disorders such as hypercholesterolemia enrolled in population genetics studies are generally controlled by diet or medication. Therefore, we performed here a two-phase study. In the first phase, we analyzed the association between hypercholesterolemia and Ala16Val MnSOD polymorphism with other metabolic disorders corrected between the two groups (controls and hypercholesterolemic) to avoid interference in the analysis. In the second phase, we analyzed the interaction between the polymorphism studied here and hypercholesterolemia in levels of lipid and inflammatory biomarkers using hypercholesterolemic subjects who were recently diagnosed and not yet treated.

2. METHODS

2.1 Design

A case-control study was performed in two phases. In the first phase, we analyzed the association between hypercholesterolemia and Ala16Val SOD2 gene polymorphism. A second phase included just 100 subjects who had recently been diagnosed with hypercholesterolemia and who were not receiving any treatment (drugs and diet). The Ala16Val MnSOD gene polymorphism and serum lipid and inflammatory biomarkers were determined and compared.

2.2 Subjects

A total of 915 subjects, 407 hypercholesterolemic (cholesterol levels ranging from 250 to 529 mg/dL) and 508 control subjects without familial hypercholesterolemia were included in this study through an investigation in Gravatai City located in South Brazilian (Rio Grande do Sul) and from a Labimed, located in Santa Maria-RS, Brazil. Hypercholesterolemia was defined as a LDL cholesterol \geq 160 mg/dl [20]. In one hundred of study subjects (50 hypercholesterolemics and 50 healthy control subjects), we measured the serum levels of oxidized LDL (oxLDL), oxLDL autoantibodies, and C-reactive protein (hs-CRP).

As the study included genetic variables, the samples were recruited by random selection of Brazilians of European ancestry from Rio Grande do Sul State (RS). Compared with Brazil as a whole, the population of this state is composed mainly of people of European ancestry (82%). A previous study performed by Cruz et al. [21] in different ethnic populations showed different allele and genotype distributions as well as different associations with diseases or biological characteristics. Therefore, we analyzed only Caucasian subjects who represent the main ethnic group [22, 23].

Additionally, we selected all control and hypercholesterolemic subjects without previous diseases such as coronary, stroke, neoplasias, and other diseases or dysfunctions that could influence genotype distribution. These exclusions are justified because these variables could interfere in the analyses [18].

The research was approved by the Human Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (number 23081.009087/2008), and the protocol was carried

out within an ethical framework, with informed consent of all participants documented.

2.3 Laboratory analyses

Blood samples were collected after 12 h overnight fasting by venipuncture, using gray and red top Vacutainers[®] (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with sodium fluoride plus potassium oxalate or no anticoagulant, respectively. Specimens were routinely centrifuged within 1 h of collection for 15 min at 2500 *g*, and aliquots of serum samples were stored at -20°C for a maximum of 4 weeks. Serum total cholesterol and triglyceride levels were measured by standard enzymatic methods using Ortho-Clinical Diagnostics[®] reagents in a fully automated analyzer (Vitros 950[®] dry chemistry system; Johnson e Johnson, Rochester, NY, USA). High-density lipoprotein cholesterol was measured in the plasma supernatant after precipitation of apolipoprotein B-containing lipoproteins with dextran sulfate and magnesium chloride as previously described [24]. Low-density lipoprotein cholesterol was estimated using the Friedewald equation [25]. In the second phase, additional biomarkers were measured. OxLDL was determined by a capture ELISA according to the manufacturer's instructions (Mercodia AB, Uppsala, Sweden), as described by Holvoet et al. [26]. OxLDL autoantibodies were determined using ELISA as described by Wu and Lefvert [27].

2.4 DNA analysis

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes and from tissue samples using a DNA Mini Kit Purification (Mo Bio). SOD polymorphism was determined by PCR-RFLP analysis. The method used here to detect Ala-16Val polymorphism is described in detail by Taufer et al. [18]. PCR amplifications were performed in a total volume of 50 µl containing 5 µl of 10x buffer, 1 µl of 25 mM MgCl₂, 1.25 µl of 10 mM dNTP, 0.5 µl of Taq Polymerase (Gibco Inc, Co.), 1 µl of each primer (40 pmol), 3 µl of genomic DNA (0.25 µg), and 34.5 µl of ddH₂O. The amplification primers (Gibco Inc, Co.) for a 110-bp fragment of the human MnSOD gene were 5'-ACCAGCAGGCAGCTGGCGCCGG-3', (sense strand) and 5'-GCGTTGATGTGAGGTTCCAG-3' (antisense strand) with thermocycler parameters

comprising an initial cycle of 95° for five minutes followed by 35 cycles at 95° for one minute and 61° for one minute. The final cycle was followed by an extension period of two minutes at 72°. The PCR product (10 µl) was digested with Hae III (15 U; 37°, 6 h, Gibco. Inc, Co.). Digested products (23 and 85 bp) were visualized on a 4% agarose gel (Amersham Biosciences Inc, Co.) stained with ethidium bromide. A mutation was introduced by a primer mismatch to create a restriction cut site for Hae III in the -9 codon, and the following genotypes were observed: -9Ala/Ala (23 and 85 bp); -9Ala/Val (23, 85 and 110 bp); and -9Val/Val (110 bp).

2.5 Statistical analysis

Allele frequencies were estimated by the gene-counting method. Chi-square (χ^2) analysis was used to estimate the Hardy-Weinberg equilibrium. The allele and genotype frequencies were compared between the two groups (hypercholesterolemia and control) using the chi-square statistical test or Fisher's exact test. All levels of significance were two-tailed. Odds ratio and 95% confidence intervals (CI) were determined for genotype/allele comparisons. Continuous variables were compared between case and control groups using Student's t-test. The biological and laboratory data are expressed as means \pm SD. Categorical variables were compared using the chi-square (χ^2) test and are expressed as percentages. To test for intervening variables in the association of hypercholesterolemia (dependent variable) and Ala16Val SOD2 polymorphism, we performed a multivariate analysis using the Backward Wald logistic regression. Equation regression included sex, age, diabetes type 2, hypertension, obesity and smoking addiction as independent variables. In the second phase, the lipid and inflammatory biomarkers were compared between hypercholesterolemic and control subjects with different Ala16Val MnSOD gene polymorphisms using analysis of variance (one-way) followed by Bonferroni's post hoc test. The alpha value considered was $p=0.05$. A computer statistics package (SPSS 11.0, Chicago, USA) was used for statistical analyses in this study.

3. RESULTS

The baseline characteristics of the hypercholesterolemic and non-hypercholesterolemic (control) subjects are shown in Table 1. The prevalence of

diabetes type 2, smoking habit, hypertension and obesity were similar between hypercholesterolemic and control subjects.

Table 1 here

Genotype frequency of the control group was in agreement with that expected under Hardy-Weinberg equilibrium ($p=0.2592$). We found a positive association between Ala16Val MnSOD genotypes and hypercholesterolemia since lower AA frequency was observed in the hypercholesterolemic group ($\chi^2= 13.466$, $p=0.001$).

Table 2 here

A calculated dose-allele effect confirms this association (AA versus VV+AV genotypes; $\chi^2=13.202$, $p=0.0001$). The odds ratio determined was 1.931 (95% CI: 1.349-2.734), indicating a greater chance of AA demonstrating no hypercholesterolemic pattern compared to the other genotypes. Multivariate logistic regression showed that the association between V allele and hypercholesterolemia was independent of sex, age, diabetes, obesity and hypertension.

In the second analysis we compared oxidative and inflammatory biomarkers between the hypercholesterolemia and control groups with different MnSOD polymorphism carriers. The results are presented in Table 3.

Table 3 here

When we compared the lipid and inflammatory biomarkers between hypercholesterolemic and control subjects who had different Ala16Val MnSOD genotypes, we observed that total cholesterol, LDL-cholesterol, hs-CRP, oxLDL and oxLDL autoantibodies levels were not influenced by MnSOD polymorphism, just by hypercholesterolemia. In this case, the hypercholesterolemic groups showed higher levels of these variables than did control subjects. Triglyceride levels were similar in all groups with a higher standard deviation in all groups which explains why the hypercholesterolemic subjects appeared to have higher triglycerides values than did the control subjects.

The HDL cholesterol was the only lipid variable that was influenced by the gene polymorphism studied here. Hypercholesterolemic subjects AV and VV genotype carriers showed significantly lower HDL cholesterol values compared to other groups.

DISCUSSION

We describe here, for the first time, a positive association between hypercholesterolemia and Ala16Val MnSOD gene polymorphism, where a decrease in the frequency of the AA genotype was found in the hypercholesterolemic group when compared to other genotypes. In previous studies performed, we found in a general population that the AA genotype frequency was 14.5% ranging from 18.5% in newborns to 13-16% in adults and elderly, whereas VV genotype frequencies ranged from 20% in newborns to 25-29% in adults and elderly [18]. In a recent investigation, we also found an association between Ala16Val MnSOD gene polymorphism and obesity. In this case, the AA genotype frequency decreased to 10% in obese subjects when compared to control subjects (18.5%) [17].

Previous studies published in the literature suggest that the Ala16Val polymorphism could be associated with the development of type 2 diabetes among Japanese-Americans. The authors believe that this association could be due to insufficient reactive oxygen species (ROS) scavenging with V allele which could lead to susceptibility to glucose intolerance [28]. Also, a recent investigation reported that the AA+AG genotype of Ala16Val MnSOD gene polymorphism is an independent protective factor against the development of diabetic nephropathy (DN) in Chinese patients [29].

Taking into account the results previously published and presented here we suggest that this polymorphism has some influence on oxidative metabolism related to endocrine disorders such as obesity and hypercholesterolemia. The biological plausibility of this notion is based on observations that pathological conditions that predispose to cardiovascular events, such as hypertension, hypercholesterolemia, and diabetes, are associated with oxidative stress. These observations and other data derived from additional investigations provide mounting evidence that oxidative stress is decisively involved in the pathogenesis of endothelial dysfunction and atherosclerosis [30].

The second analysis performed here investigated the possible effect of the Ala16Val polymorphism on serum levels of oxLDL, oxLDL autoantibodies, and hs-CRP. The results did not show a positive association, and the higher levels of these biomarkers could just be related to the hypercholesterolemia disorder [19] and are not influenced by MnSOD polymorphism. However, these results could be different in

a physiological stress condition as suggested by an investigation that examined the possible effect of Ala16Val MnSOD gene polymorphism on interleukin 6 (IL-6) and MnSOD enzyme levels in 42 patients undergoing coronary artery bypass grafting (CABG) with cardiopulmonary bypass (CPB). The authors found similar IL-6 levels in a preoperative evaluation. However, postoperatively, IL-6 levels were significantly higher in all patients but more significantly in V(VV+AV) carriers. From these data, the authors suggested that Ala16Val MnSOD gene polymorphism plays a role in cytokine release [31].

Another interesting investigation analyzed the association between MnSOD polymorphism in blood cells from 498 coronary artery disease (CAD) patients and 627 healthy subjects. The results indicated that the alanine variant of MnSOD signal peptide increases mitochondrial MnSOD activity, protects macrophages against oxLDL-induced apoptosis, and reduces the risk of CAD and AMI [32]. In this way it is important to carry out complementary investigations to analyze the response of other inflammatory biomarkers including hs-CRP on subjects with different MnSOD polymorphism genotypes.

The only interaction observed here occurred in HDL cholesterol levels which were lower in V (VV+AV) hypercholesterolemic subjects when compared to AA hypercholesterolemic and AA, AV and VV healthy subjects. HDL cholesterol levels correlated inversely with cardiovascular events and seem to have important vascular protective effects [33]. Subjects with elevated HDL plasma levels are less susceptible to the development of endothelial dysfunction and atherosclerosis [34]. On the other hand, low HDL levels predict an increased incidence of cardiovascular diseases such as myocardial infarction [35]. Among the mechanisms in which HDL exerts a cardiovascular protective effect, we can cite the following: HDL facilitates the reverse cholesterol transport and delivers cholesterol from the vasculature to the liver for excretion from the body; and HDL mediates an important vasculoprotective action via the improvement of the function of circulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPC) [36]. HDL leads to the reduction of oxidative stress in the vasculature, which may contribute to the atheroprotective effects of HDL. The results described here corroborate that oxidative stress have some influence in lipid profile especially in HDL levels. In this case, our results provide some evidence that genetic differences could have an influence on HDL levels mainly in hypercholesterolemic patients. However, complementary studies verifying possible intervening variables

(including diet and physical activity) need to be performed to clarify the relationship between HDL levels and Ala16Val MnSOD gene polymorphism.

Finally, it is important to ponder some considerations associated with our methodological design. Since hypercholesterolemia is strongly related to other morbidity studies, investigators looking for an association between gene and non-morbid dyslipidemia need to consider these morbidities as intervening variables. In fact, many investigations prefer to include all subjects in the study and perform further exclusions when the statistical analyses are conducted. Of course, that approach increases the sample number and permits more consistent statistical power. However, with the great number of variables included in the study and the large number of positive statistical associations sometimes found in these studies, it becomes very difficult to discuss the results in biological terms.

Another situation that makes it difficult to interpret data from a large sample that shows higher variability in terms of morbidities, risk factors, lifestyle, etc. is the systemic effect of these variables, including possible synergistic and additional interactions that we can separate by statistical analysis. For example, in a previous study, we found that a positive association between oxLDL levels and the VV genotype of MnSOD was strongly influenced by diabetes type 2. However, we could not determine if this influence was due to an interaction between diabetes and obesity or hypertension and dyslipidemia, which are highly prevalent in diabetic patients. Despite the limitations of the study, the results described could be considered important in clinical terms, if we consider that V carriers have more risk of presenting hypercholesterolemia and presenting lower HDL values when compared to AA subjects.

In conclusion, the results suggest an association between VV and hypercholesterolemia. A possible biological explanation for this association could be a chronic state of superoxide imbalance present in VV carriers, which could affect differential metabolic pathways triggering a lipid imbalance.

Acknowledgments

The authors thank the team of Project Genesis and Prefeitura Municipal de Gravataí for helping with data collection and CNPq (No. 471233/2007-2, No. 311231/2006-3, No. UFSM 23081.009087/2008-99), CAPES (166/08) and

FAPERGS for grants and fellowships. Dr. A. Leyva provided English editing of the manuscript.

REFERENCES

[1] Minor RLJr., Myers PR, Guerra RJr., Bates JN, Hamson DG. Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J Clin Invest* 1990; 86:109-116.

[2] Huang J, Lin SC, Nadershahi A, Watts SW, Sarkar R. Role of redox signaling and poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase activation in vascular smooth muscle cell growth inhibition by nitric oxide and peroxynitrite. *J Vasc Surg* 2008; 47:599-607.

[3] Thomas SR, Witting PK, Drummond GR. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10:1713-1765.

[4] Muller G, Morawietz H. Nitric Oxide, NAD(P)H Oxidase and Atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11:1711-1731.

[5] Johnson P. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2002; 133:493-505.

[6] Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226:561-565.

[7] Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Capanec C, Pessayre D, Degoul F. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics* 2003; 13:145-157.

- [8] Slanger TE, Chang-Claude J, Wang-Gohrke S. Manganese superoxide dismutase Ala-9Val polymorphism, environmental modifiers, and risk of breast cancer in a German population. *Cancer Causes Control* 2006; 17:1025-1031.
- [9] Ezzikouri S, El Feydi AE, Chafik A, Afifi R, El Kihal L, Benazzouz M, et al. Genetic polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene is associated with an increased risk for hepatocellular carcinoma in HCV-infected Moroccan patients. *Mutat Res* 2008; 649:1-6.
- [10] Kang D, Lee KM, Park SK, Berndt SI, Peters U, Reding D, et al. Functional variant of manganese superoxide dismutase (SOD2 V16A) polymorphism is associated with prostate cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16:81-86.
- [11] Ergen HA, Narter F, Timirci O, Isbir T. Effects of manganese superoxide dismutase Ala-9Val polymorphism on prostate cancer: a case-control study. *Anticancer Res* 2007; 27:1227-1230.
- [12] Landi S, Gemignani F, Neri M, Barale R, Bonassi S, Bottari Fet, et al. Polymorphisms of glutathione-S-transferase M1 and manganese superoxide dismutase are associated with the risk of malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer* 2007; 120:2739-2743.
- [13] Kakko S, Paivansalo M, Koistinen P, Kesaniemi YA, Kinnula VL, Savolainen MJ. The signal sequence polymorphism of the SOD2 gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003; 168:147-152.
- [14] Hiroi S, Harada H, Nishi H, Satoh M, Nagai R, Kimura A. Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1999; 261:332-329.

[15] Gottlieb MG, Schwanke CH, Santos AF, Jobim PF, Müssel DP, Cruz IBM. Association among oxidized LDL levels, SOD2, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. *Genet Mol Res* 2005; 4:691-703.

[16] Fujimoto H, Taguchi JI, Imai Y, et al. Manganese superoxide dismutase polymorphism affects the oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis of macrophages and coronary artery disease. *Eur Heart J* 2008; 29:1267-74.

[17] Montano MAE, Gottlieb MG, Barrios-Lera JP, Santos GFF, Manica-Cattani MF, Schwanke CHA, et al. Association between manganese superoxide dismutase (Mnsod) gene polymorphism and elderly obesity. *Mol Cell Biochem* 2009; 328:33-40.

[18] Taufer M, Peres A, de Andrade VM, de Oliveira G, Sá G, do Canto ME, et al. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005; 60:432-438.

[19] Duarte MMMF, Rocha JBT, Moresco RN, Duarte, T, Cruz IBM, Loro VL et al. Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. *Clin Biochem* 2009; 42:666-671.

[20] Skilton MR, Moulin P, Sérusclat A, Nony P, Bonnet F. A comparison of the NCEP-ATPIII, IDF and AHA/NHLBI metabolic syndrome definitions with relation to early carotid atherosclerosis in subjects with hypercholesterolemia or at risk of CVD: evidence for sex-specific differences. *Atherosclerosis* 2007; 190:416-422.

[21] Cruz IBM, Oliveira G, Taufer M, Leal NF, Schwanke CH, Glock L, et al. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism in two ethnic groups living in Brazil's southern region: association with age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2003; 58: M851-856.

[22] Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 177-182.

[23] Mattevi VS, Zembrzuski VM, Hutz MH. Association analysis of genes involved in the leptin-signaling pathway with obesity in Brazil. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26:1179-1185.

[24] Bachorik PS, Albers JJ. Precipitation methods for quantification of lipoproteins. *Methods Enzymol* 1986; 129:78-100.

[25] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-502.

[26] Holvoet P, Stassen JM, Van Cleemput J, Collen D, Vanhaecke J. Oxidized low density lipoproteins in patients with transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:100-107.

[27] Wu R, Lefvert AK. Autoantibodies against oxidized low density lipoprotein (OxLDL): characterization of antibody isotype, subclass, affinity and effect on the macrophage uptake of oxLDL. *Clin Exp Immunol* 1995; 102:174-180.

[28] Nakanishi S, Yamane K, Ohishi W, Nakashima R, Yoneda M, Nojima H, et al. Manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism is associated with the development of type 2 diabetes in Japanese-Americans. *Diabetes Res Clin Pract* 2008 ; 81 :381-385.

[29] Liu L, Zheng T, Wang N, Wang F, Li M, Jiang J, et al. The manganese superoxide dismutase Val16Ala polymorphism is associated with decreased risk of diabetic nephropathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem* 2009; 322:87-91.

[30] Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 2004; 40:381-386.

[31] Isbir S, Ergen A, Yilmaz H, Tekeli A, Arsan S. Effect of Ala16Val genetic polymorphism of MnSOD on antioxidant capacity and inflammatory response in open heart surgery. *In Vivo* 2008; 22:147-151.

[32] Fujimoto H, Taguchi J, Imai Y, Ayabe S, Hashimoto H, Kobayashi H, et al. Manganese superoxide dismutase polymorphism affects the oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis of macrophages and coronary artery disease. *Eur Heart J* 2008; 29:1267-1274.

[33] Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, Maroni J, Szarek M, Grundy SM, et al. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2007; 357:1301-1310.

[34] Spieker LE, Sudano I, Hürlimann D, Lerch PG, Lang MG, Binggeli C, et al. High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation* 2002; 105:1399-1402.

[35] Buring JE, O'Connor GT, Goldhaber SZ, Rosner B, Herbert PN, Blum CB, et al. Decreased HDL2 and HDL3 cholesterol, Apo A-I and Apo A-II, and increased risk of myocardial infarction. *Circulation* (85) (2002), pp.22-29.

[36] Petoumenos V, Nickenig G, Werner N. High density lipoprotein exerts vasculoprotection via endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med* 2008 (in press).doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00472.x

Table 1. Clinical and laboratory characteristics.

	Controls	Hypercholesterolemia	P values
Mean age (years)	67.3 ± 7.2	67.7 ± 6.8	0.121
BMI (kg/m ²)	28.87 ± 4.8	28.97 ± 4.4	0.747
Systolic BP (mmHg)	140.7 ± 30.7	140.1 ± 25.6	0.798
Diastolic BP (mmHg)	79.8 ± 13.9	79.5 ± 12.3	0.763
Total cholesterol (mg/dL)	158.7 ± 55.5	273.9 ± 15.9	0.0001
HDL-cholesterol (mg/dL)	64.4 ± 5.5	46.2 ± 6.8	0.014
LDL-cholesterol (mg/dL)	107.0 ± 14.2	179.3 ± 13.5	0.001
Triglycerides (mg/dL)	144.4 ± 64.8	177.0 ± 73.0	0.0001
Glucose (mg/dL)	107.0 ± 34.2	106.2 ± 23.5	0.339
Diabetes type 2 (n, %)	62 (12.2)	43 (10.6)	0.429
Hypertension (n, %)	234 (46.1)	184 (45.2)	0.665
Obesity (n, %)	169 (33.3)	132 (32.4)	0.789
Smoking addiction (n, %)	158 (31.9)	134 (32.2)	0.360

Data are expressed as means ± standard deviations.

BMI, body mass index; BP, blood pressure; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein.

Table 2. MnSOD polymorphism genotype frequencies in hypercholesterolemia and control groups

MnSOD Genotypes	Groups		
	Hypercholesterolemia	Control	Total
AA	52 (12.8%)*	112 (22.0%)	164 (17.9%)
VV	98 (24.1%)	116 (22.8%)	214 (23.4%)
AV	257 (63.1%)	280 (55.2%)	537 (58.7%)
Alleles			
A	0.443	0.496	0.456
V	0.556	0.504	0.544

* $\chi^2 = 13.466$, $p = 0.001$

Table 3. Interaction between Ala16Val MnSOD gene polymorphism and hypercholesterolemia with respect to lipid and inflammatory biomarkers

Variable	Group	Mean \pm SD	
Total cholesterol (mg/dL)	C-AA	145 \pm 16	A
	C-VV	149 \pm 18	A
	C-AV	148 \pm 19	A
	H-AA	302 \pm 44	B
	H-VV	321 \pm 63	B
	H-AV	303 \pm 73	B
HDL-cholesterol (mg/dL)	C-AA	68 \pm 14	A
	C-VV	50 \pm 08	A
	C-AV	61 \pm 02	A
	H-AA	65 \pm 10	A
	H-VV	38 \pm 06	B
	H-AV	45 \pm 13	B
LDL-cholesterol (mg/dL)	C-AA	73 \pm 14	A
	C-VV	77 \pm 11	A
	C-AV	77 \pm 10	A
	H-AA	218 \pm 46	B
	H-VV	229 \pm 67	B
	H-AV	212 \pm 83	B
Triglycerides (mg/dL)	C-AA	81 \pm 35	A
	C-VV	94 \pm 42	A
	C-AV	94 \pm 41	A
	H-AA	180 \pm 33	A
	H-VV	252 \pm 10	A
	H-AV	247 \pm 21	A
hs-CRP (mg/dL)	C-AA	0.15 \pm 0.05	A
	C-VV	0.19 \pm 0.07	A
	C-AV	0.15 \pm 0.05	A

	H-AA	1.87 ± 1.08	B
	H-VV	2.75 ± 1.15	B
	H-AV	1.88 ± 1.06	B
oxLDL (mg/dL)	C-AA	0.22 ± 0.03	A
	C-VV	0.33 ± 0.02	A
	C-AV	0.24 ± 0.30	A
	H-AA	0.90 ± 0.61	B
	H-VV	0.91 ± 0.36	B
	H-AV	0.88 ± 0.32	B
oxLDL autoantibodies (mg/L)	C-AA	3 ± 2	A
	C-VV	3 ± 0.5	A
	C-AV	3 ± 2	A
	H-AA	35 ± 9	B
	H-VV	38 ± 8	B
	H-AV	36 ± 8	B

C- Control subjects; H- hypercholesterolemic subjects; SD= standard deviation.

Different letters indicate statistical differences at $p < 0.05$ using analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Bonferroni's post hoc test.

**4.3 ESTRESSE OXIDATIVO NA HIPERCOLESTEROLEMIA E SUA ASSOCIAÇÃO
COM O POLIMORFISMO DA ALA16VAL SUPERÓXIDO DISMUTASE**

Manuscrito 2

**Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val
superoxide dismutase gene polymorphism**

**Marta M. M. F. Duarte, Rafael N. Moresco, Thiago Duarte, Adriana Santi ,
Margarete D. Bagatini, Ivana B. M. Da Cruz,
Maria R. C. Schetinger, Vânia L. Loro**

Manuscrito Submetido para Clinical Biochemistry

Submissão:

Ms. No.: CLB-D-09-00645

Title: Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism

Corresponding Author: Dr Marta MMF Duarte

Authors: Marta MMF Duarte, Ph.D.; Rafael N Moresco; Thiago Duarte; Adriana Santi; Margarete D Bagatini; Ivana B Da Cruz; Maria Rosa C Schetinger; Vânia L Loro

Dear Dr Duarte,

Your submission, referenced above, has been assigned the following manuscript number: CLB-D-09-00645

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

<http://ees.elsevier.com/clb/>

Your username is:

Your password is:

Thank you for submitting your work to Clinical Biochemistry.

Kind regards,

Jon Stein

Journal Manager

Clinical Biochemistry

Phone: (619) 699-6218

E-mail: clbi@elsevier.com

**Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val
superoxide dismutase gene polymorphism**

**Marta M. M. F. Duarte^a, Rafael N. Moresco^b, Thiago Duarte^c, Adriana Santi^d,
Margarete D. Bagatini^b, Ivana B. M. Da Cruz^{ad}, Maria R. C. Schetinger^{a,e},
Vânia L. Loro^{a,e}**

Category: Clinical Investigation (Full Paper)

^aPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^bDepartamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^cCurso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^dDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

^eDepartamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

*Corresponding author: **Marta M. M. F. Duarte**

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Tel: +55 55 32208736, Fax: +55 55 32208736

E-mail: duartmm@hotmail.com

ABSTRACT

Objectives: To investigate the oxidative stress, antioxidant system, and influence of genotype manganese superoxide dismutase (Ala16Val) polymorphism in hypercholesterolemia.

Design and Methods: Glucose, lipid profile, high-sensitivity C reactive protein (hs-CRP), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), carbonyl protein, thiols, reduced glutathione (GSH), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), vitamin C, vitamin E, and genotype manganese superoxide dismutase (Ala16Val) polymorphism were measured in 40 subjects with hypercholesterolemia and 40 controls.

Results: Lipid profile, hs-CRP, glucose, TBARS, carbonyl protein, CAT, and vitamin E were significantly higher in subjects with hypercholesterolemia. In contrast, GSH and SOD activity were lower. TBARS, carbonyl protein, thiols, CAT activity, and vitamin E were significantly higher in hypercholesterolemic subjects with genotype VV for MnSOD polymorphism, while GSH, SOD, and vitamin C were lower in these subjects.

Conclusions: We suggest an association between the genotype VV of MnSOD polymorphism, hypercholesterolemia, and oxidative stress biomarkers.

Keywords: Hypercholesterolemia, Inflammation, Oxidative stress, Antioxidant, ALA16VAL superoxide dismutase.

1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals are produced during the metabolism of estradiol, polyunsaturated fats, ethanol, and electron transport chain as well as during the normal cellular function [1]. Their high chemical reactivity leads to the oxidation of lipids, proteins or DNA. The balance between ROS generation and antioxidant activity is critical to the pathogenesis of oxidative stress-related disorders [2].

Hypercholesterolemia has been associated with oxidative stress that results from the increased production of reactive oxygen radicals or impairment of the antioxidant system [3-4]. Hypercholesterolemia promotes atherosclerosis and it is a major risk factor of acute coronary syndromes and cardiovascular death. One of the most consistent hypothesis to explain atherogenesis postulates that it is triggered by in vivo LDL oxidation caused by ROS [5-6]. Significant increases in lipoperoxidation products or decreases of some antioxidants in plasma have been reported in hypercholesterolemia. One of the well-known lipoperoxidation products is malondialdehyde (MDA) [7-8]. Proteins are considered to be the most susceptible target for oxidative modification because of the role of molecules such as enzymatic catalysts, which as consequence present impaired activity. Protein carbonyl content is currently one of the most general indicators and commonly used markers of protein oxidation [9].

A sensitive balance between the generation and neutralization of oxidants by different intra and extracellular defense mechanisms helps to protect vital cell components. Circulating scavenging antioxidants with a high redox potential, such as reduced glutathione (GSH) as well as intracellular antioxidant enzymes, such as glutathione peroxidase (GSHPx), manganese superoxide dismutase (MnSOD) and catalase (CAT), maintains this equilibrium [10]. MnSOD is the primary antioxidant in the mitochondria. This enzyme converts reactive oxygen species into oxygen and hydrogen peroxide, being that the latter is catalyzed into water by catalase and glutathione peroxidase [11-12]. The major defense against the toxicity of $O_2^{\cdot -}$ is conferred by SOD, which catalyses the dismutation of $O_2^{\cdot -}$ into H_2O_2 . CAT, the main enzyme scavenging H_2O_2 , decomposes H_2O_2 into water and therefore acts in concert with SOD. H_2O_2 is also deactivated into water by GPx, which uses reduced glutathione (GSH) as a hydrogen donor, whereby GSH is oxidized [13].

MnSOD is encoded by a single gene containing five exons and located on chromosome 6q25 [14]. One of the polymorphisms of MnSOD results in the replacement of alanine 16 (GCT) with a valine (GTT; the Ala16Val polymorphism), and affects the import of MnSOD into mitochondria by altering the conformation of its leader signal [15]. This mutation may reflect functional polymorphism of mitochondrial transport of human MnSOD. Ala16Val is implicated in a decreased efficiency of MnSOD transport into target mitochondria in V allele carriers [16]. A study performed by Sutton *et al.* [17] suggested that the Ala-MnSOD precursor generated 30%-40% more of the active matrixial processed MnSOD homotetramer than the Val-MnSOD precursor. These results showed that the Ala-MnSOD/mitochondrial targeting sequence (MTS) allows efficient MnSOD import into the mitochondrial matrix, while the Val-variant causes partial arrest of the precursor within the inner membrane and decreased formation of the active MnSOD tetramer in the mitochondrial matrix [17]. An important framework on the modulation of the redox status influenced by genetic polymorphisms could affect the cardiovascular homeostasis [18], and recently a positive association between the ValVal genotype of MnSOD gene polymorphism and obesity was observed [19].

In addition, non enzymatic antioxidant mechanisms also protect against oxidative stress. These mechanisms include natural lipophilic antioxidants such as vitamin E and hydrophilic substances like vitamin C and glutathione (GSH), which could act synergistically. Nonprotein thiols have a variety of functions in bioreduction and detoxification processes [20-23]. Vitamin E acts as a peroxy radical scavenger and could be further regenerated by vitamin C and GSH. In addition to this chain propagation breaking effect, cell mediated vitamin E effects have been described and could be in part independent of the antioxidant potency. Indeed, vitamin E could regulate smooth muscle cell proliferation and ROS monocyte production. The main antioxidant function of vitamin E is the protection against lipid peroxidation. Non-enzymatic antioxidant defenses can probably act as antiatherogens by preventing or suppressing the prooxidant states [24-25].

Clinical studies have demonstrated that patients with hypercholesterolemia have markers suggestive of decreased antioxidant activity when compared with normal subjects; however, the relationship between the MnSOD polymorphism and level of oxidant and antioxidant markers is not well known. Therefore, the aim of this study was to investigate the lipid peroxidation, protein oxidation, and the antioxidant

system in hypercholesterolemic patients and health subjects. We also evaluated the influence of genotype manganese superoxide dismutase (Ala16Val) polymorphism on oxidative stress biomarkers.

2. Methods

2.1 Study population

Subjects were enrolled prospectively in this study from LABIMED, located in Santa Maria-RS, Brazil. Subjects were divided into two groups according to serum cholesterol levels as follows: control group, 40 healthy subjects with cholesterol levels ranging from 104 to 178 mg/dL (2.69 – 4.61 mmol/L); and hypercholesterolemia group, 40 subjects with cholesterol levels ranging from 250 to 529 mg/dL (6.47 – 13.70 mmol/l). Hypercholesterolemia was defined as LDL cholesterol \geq 160 mg/dL (4.15 mmol/L) [26]. Smokers, diabetics, and subjects undergoing hypolipemic treatment or taking anti-inflammatory medications were excluded from this study. All subjects provided written informed consent and this protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (number 23081.009087/2008).

2.2 Laboratory analyses

Blood samples were collected after 12 hours overnight fasting by venous puncture into gray and red top Vacutainers[®] (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes. Specimens were routinely centrifuged within 1 h of collection for 15 min at 2,500 *g*. The precipitate was discarded and the serum was used to determine total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, hs-PCR, TBARS, protein carbonyl, vitamin C, and vitamin E contents. CAT and SOD activities were determined using whole blood collected in citrated and diluted in a 1:10 in saline solution. The reduced glutathione determination was conducted in erythrocytes obtained by centrifugation (5000 rpm for 10 min) of blood collected using EDTA as anticoagulant and for plasmatic non-protein thiols. Glucose was determined using whole blood collected in sodium fluoride.

Plasma glucose, serum total cholesterol and triglyceride concentrations were measured using standard enzymatic methods by use of Ortho-Clinical Diagnostics[®] reagents on the fully automated analyzer (Vitros 950[®] dry chemistry system; Johnson

& Johnson, Rochester, NY, USA). High-density lipoprotein cholesterol was measured in the supernatant plasma after precipitation of apolipoprotein B-containing lipoproteins with dextran sulfate and magnesium chloride as previously described [27]. Low-density lipoprotein cholesterol was estimated with the Friedewald equation [28], hs-CRP was measured by nephelometry (Dade Behring, Newark, DE, EUA).

Serum thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were measured according to the modified method of Jentzsch et al. [29]. The carbonylation of serum proteins was determined by modifications of the Levine method [30]. Whole blood catalase activity was determined by the method of Aebi [31] by measuring the rate of decomposition of H₂O₂ at 240 nm. Whole blood superoxide dismutase activity was measured as described by McCord & Fridovich [32]. Reduced glutathione and thiols were assayed in plasma by the method of Ellman [33]. Serum vitamin E was estimated by a modified method of Hansen & Warwick [34]. Vitamin C analysis was made by the method described by Roe [35]. Protein was measured by the method of Bradford using bovine serum albumin as standard [36].

2.3 DNA analysis

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes and from tissue samples using a DNA Mini Kit Purification (Mo Bio). SOD polymorphism was determined by PCR-RFLP analysis. The method used here to detect Ala-16Val polymorphism is described in detail by Taufer et al. [37]. PCR amplifications were performed in a total volume of 50 µl containing 5 µl of 10x buffer, 1 µl of 25mM MgCl₂, 1.25 µl of 10 mM dNTP, 0.5 µl of Taq Polymerase (Gibco Inc, Co.), 1 µl of each primer (40 pmol), 3 µl of genomic DNA (0.25 µg), and 34.5 µl of ddH₂O. The amplification primers (Gibco Inc, Co.) for a 110-bp fragment of the human MnSOD gene were 5'-ACCAGCAGGCAGCTGGCGCCGG-3' (sense strand) and 5'-GCGTTGATGTGAGGTTCCAG-3' (antisense strand) with thermocycler parameters comprising an initial cycle of 95° for five minutes followed by 35 cycles at 95° for one minute and 61° for one minute. The final cycle was followed by an extension period of two minutes at 72°. The PCR product (10 µl) was digested with Hae III (15 U; 37°, 6 h, Gibco. Inc, Co.). Digested products (23 and 85 bp) were visualized on a 4% agarose gel (Amersham Biosciences Inc, Co.) stained with ethidium bromide. A mutation was introduced by a primer mismatch to create a restriction cut site for Hae

III in the -9 codon, and the following genotypes were observed: -9Ala/Ala (23 and 85 bp); -9Ala/Val (23, 85 and 110 bp); and -9Val/Val (110 bp).

2.4 Statistical analysis

Data are presented as mean and standard error of the mean (SEM). Statistical differences between groups were evaluated by Student *t* test. Pearson correlation was assessed to evaluate the correlations among variables. Differences between groups according to MnSOD polymorphism genotypes of the subjects were evaluated by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey's post hoc test. Statistical significance was assumed at $P < 0.05$.

3. Results

A total of 80 subjects were investigated in this study, consisting of 40 subjects with hypercholesterolemia and 40 controls. Baseline characteristics of the study subjects are shown in Table 1. Total cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, hs-CRP, and glucose were significantly higher in subjects with hypercholesterolemia, while HDL cholesterol was lower in these subjects. The values of TBARS (10.67 ± 0.32 vs 7.07 ± 0.26 nmol MDA/mL serum, $P < 0.001$), carbonyl protein (1.07 ± 0.03 vs 0.94 ± 0.04 nmol/mg protein, $P < 0.05$), thiols (1.27 ± 0.02 vs 0.91 ± 0.03 μ mol/mL plasma, $P < 0.001$), catalase (201.50 ± 7.08 vs 109.30 ± 2.44 U/g hemoglobin, $P < 0.001$), and vitamin E (12.73 ± 0.40 vs 7.92 ± 0.22 μ mol/L serum, $P < 0.001$) were significantly higher in subjects with hypercholesterolemia in comparison to controls. In contrast, GSH (0.55 ± 0.03 vs 1.22 ± 0.04 μ mol/mL plasma, $P < 0.001$) and SOD (0.52 ± 0.02 vs 0.71 ± 0.02 U/mg hemoglobin, $P < 0.001$) were lower in the hypercholesterolemia group, as shown in Figure 1. No statistical differences were observed for vitamin C levels between the study groups. Moreover, we observed significant correlations between total cholesterol, hs-CRP, and oxidative stress biomarkers, as shown in Table 2.

Potential interactions between MnSOD polymorphism genotypes and lipids, inflammatory and oxidative stress biomarkers were also evaluated. We assessed the association for MnSOD genotypes alanine/alanine (AA), alanine/valine (AV) and valine/valine (VV), as reported in Table 3. Distribution of MnSOD polymorphism genotypes in the control group was: AA (65.0%, $n = 26$), AV (27.5%, $n = 11$), and VV (7.5%, $n = 3$). In contrast, the frequency of the alleles Ala/Val and Val/Val in the

hypercholesterolemic group was significantly higher as follows: AA (10.0%, n = 4), AV (55.0%, n = 22), and VV (35.0%, n = 14). These data indicate an increase of oxidative stress in the hypercholesterolemia group, especially in subjects presenting genotype VV for MnSOD polymorphism. TBARS, carbonyl protein, thiols, catalase, and vitamin E were significantly higher in hypercholesterolemic subjects with genotype VV for MnSOD polymorphism, while GSH, SOD, and vitamin C were lower in these subjects.

4. Discussion

This study reports an increase of oxidative stress in subjects with hypercholesterolemia, especially those subjects with genotype VV for MnSOD polymorphism. This is the first report valuing the oxidative stress in hypercholesterolemia as well as its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism.

Hypercholesterolemia is regarded as an important factor in the development of atherosclerosis and subsequent cardiovascular disease [26]. There is now a consensus that atherosclerosis represents a state of heightened oxidative stress characterized by lipid and protein oxidation in the vascular wall. Lipid damage induces the phenomenon known as lipoperoxidation, which culminates in MDA formation. Lipoperoxidation can disrupt the organization of the membrane, causing changes in fluidity and permeability. As a consequence, it impairs the activity of the membrane-bound enzymes, the transport and the function of second messenger systems [12]. In addition, it has been demonstrated that lipoperoxidation plays an important role in chronic inflammatory responses to atherosclerosis [38-39].

In the present study, some indicators of oxidative stress were higher in the subjects with hypercholesterolemia, including TBARS levels. This finding is associated with the damage to lipid structures by free radicals. Furthermore, we report here a positive correlation between total cholesterol and TBARS. These findings are in agreement with results of other recent investigations, which showed lipid peroxidation associated with high serum lipids [7,40]. TBARS has been appointed as a predictor of cardiovascular events in patients with established heart disease, independent of traditional risk factors and inflammatory markers [41].

Proteins constitute major components of living cells and a relatively minor structural modification often leads to a marked change of their functions. Under

oxidative stress, proteins as well as lipids are the major targets of ROS. The formation of protein carbonyl seems to be a common phenomenon during oxidation, and its quantification may be used to measure the extent of oxidative damage [9]. The results of the present study indicate an increase of oxidation in plasma proteins of subjects with hypercholesterolemia, as previously reported [42]. Fu et al. [42] have investigated the roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque and they concluded that reactive products of protein oxidation have to be considered as possible contributors to atherogenesis.

The effect of reactive species is balanced by the antioxidant action of non-enzymatic antioxidants, as well as by antioxidant enzymes. Antioxidant defenses are extremely important as they represent the direct removal of free radicals (pro-oxidants), providing maximal protection for biological sites [12]. In this study it was demonstrated that SOD activities were decreased in hypercholesterolemic subjects. SOD is the first line of cellular defense against oxidative injury which is involved in the disposal of superoxide anions and hydrogen peroxide. Thus, insufficient detoxification of these reactive oxygen species by antioxidant enzymes may lead to an occurrence of imbalance between antioxidant and oxidant systems. Low SOD activity could also attribute to enzyme inactivation by ROS bringing about damage to proteins [43]. However, catalase activities were higher in hypercholesterolemic subjects. Here it is assumed that oxidative stress acts primarily by increasing the production of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 . Any increased production of catalase is presumed to be secondary in these cases, reflecting an attempt to partially compensate for the increased oxidative stress. Interestingly, there is evidence that even this second method of inducing antioxidant enzymes in response to an oxidative insult can be protective as a way of developing “tolerance” to a subsequent larger insult [11, 44].

Our study also revealed decreased GSH levels in hypercholesterolemic subjects. GSH has also been demonstrated to play a role in detoxifying oxygen radicals and therefore may prevent cellular damage from oxidative stress [13]. The data reported in the literature have shown that patients under chronic disease states such as heart disease, arthritis, diabetes, and malignancies have lower plasma levels of GSH than control subjects, suggesting that GSH has a protective role against such diseases [45]. Regarding plasma levels of thiols, we observed increased plasma levels thiols in hypercholesterolemic subjects. According to Wronska-Nofer and

colleagues [46], thiols concentrations were significantly elevated in chronic exposure to carbon disulfide (CS₂) and coronary heart disease.

In this study, we have shown increased levels of plasma vitamin E. Although an increase of plasma vitamin E seems to be inconsistent due to higher profile of oxidative stress, vitamin E, being a lipid soluble vitamin correlates directly with lipid and beta-lipoprotein level [47]. The increased vitamin E is presumed to be secondary to partially compensate for the increased oxidative stress because it can act as a peroxy radical scavenger being an important antioxidant. Vitamin E could regulate smooth muscle cell proliferation and ROS monocyte production by mechanisms involving protein kinase C (PKC) inhibition, largely dependent on vitamin E isoforms and stereoisomers [38].

Here we observed significant correlations between total cholesterol, hs-CRP, and oxidative stress biomarkers. A growing body of evidence supports the concept that hypercholesterolemia elicits a cascade of proinflammatory reactions that are known to lead to the production of ROS. The oxidation of lipids and proteins leads to a progressive increase of hs-CRP levels. Several reports suggest that CRP may play a direct pathophysiological role in the development and progression of atherosclerosis [48].

This study also reports an association between hypercholesterolemia and the genotype VV for MnSOD polymorphism, as well as the enhancement of oxidative stress represented especially by the increase of TBARS and carbonyl protein levels. The alanine variant of MnSOD is thought to have an α -helical mitochondrial-targeting domain, whereas the valine variant of MnSOD appears to have a β -pleated sheet conformation [49]. This conformational difference is thought to result in a more efficient transport of the alanine variant of MnSOD into mitochondria than the valine variant [50]. The Val variant of the MnSOD may be present in a lower concentration in mitochondria. If this is the case, then patients with Val/Val homozygosity should have lower resistance to oxidative stress. The increased production of catalase, thiols and vitamin E is presumed to be secondary to partially compensate for the increased oxidative stress. In agreement with our results, several studies have suggested that MnSOD polymorphism is associated with certain kinds of diseases induced by oxidative damage including atherosclerosis. Dedoussis *et al.* [51] showed higher ox-LDL-cholesterol levels for the middle aged men with the Val/Val genotype, compared to the other allele (Ala/Ala and Ala/Val) carriers. Recently, Fujimoto *et al.*

[52] found an association that alanine variant of signal peptide increases the mitochondrial MnSOD activity, protects macrophages against the oxLDL-induced apoptosis, and reduces the risk of acute coronary syndromes and cardiovascular diseases.

In conclusion, the current study demonstrated an increase of lipid peroxidation and protein oxidation in hypercholesterolemia, as well as a decrease of some antioxidant mechanisms. Moreover, we suggest an association between the genotype VV of MnSOD polymorphism, hypercholesterolemia and oxidative stress biomarkers. A possible biological explanation for this association could be a chronic state of superoxide imbalance present in VV carriers, which could affect differential metabolic pathways triggering a lipid imbalance and an enhancement of oxidative stress.

References

- [1] Kowaltowski AJ, Souza-Pinto NC, Castilho RF, Verces A. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2009;47:333-343.
- [2] Devasagayam TP, Tilak JC, Bloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Phys India* 2004;52:794-804.
- [3] Duarte MMMF, Rocha JBT, Moresco RN, *et al.* Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. *Clin Biochem* 2009;42:666-671
- [4] Prasad K, Kalra J. Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis. *Am Heart J* 1993;125:958-971.
- [5] Osipov RM, Bianchi C, Feng J, *et al.* Effect of Hypercholesterolemia on Myocardial Necrosis and Apoptosis in the Setting of Ischemia-Reperfusion *Circulation* 2009;120:S22-S30.

- [6] Sam F, Kerstetter D, Pimental D, *et al.* Increased Reactive Oxygen Species Production and Functional Alterations in Antioxidant Enzymes in Human Failing Myocardium. *J Card Fail* 2005; 11:473-480.
- [7] Duarte MMMF, Loro VL, Rocha JBT, *et al.* Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory process. *FEBS J* 2007;274:2707-2714.
- [8] Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med* 2005;39:841-852.
- [9] Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003;329:23-38.
- [10] Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994;17:235-248.
- [11] Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez CI. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999;32:595–603.
- [12] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44-84.
- [13] Xu Y, Liu B, Zweier JL, He G. Formation of hydrogen peroxide and reduction of peroxynitrite via dismutation of superoxide at reperfusion enhances myocardial blood flow and oxygen consumption in postischemic mouse heart. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;327:402-410.
- [14] Church SL, Grant JW, Meese EU, Trent JM. Sublocalization of the gene encoding manganese superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) to 6q25 by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybrid mapping. *Genomics* 1992;14:823-825.

- [15] Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002;33:337-349.
- [16] Suh YA, Arnold RS, Lassegue B *et al.* Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999;401:79-82.
- [17] Sutton A, Imbert A, Igoudjil A, *et al.* The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and Mrna stability. *Pharmacogenetics* 2005;15:311– 319.
- [18] Gottlieb MG, Schwanke CH, Santos AF, Jobim PF, Müssel DP, Cruz IBM. Association among oxidized LDL levels, SOD2, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. *Genet Mol Res* 2005;4:691-703.
- [19] Montano MAE, Gottlieb MG, Barrios-Lera JP, *et al.* Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. *Mol Cell Biochem* 2009;328:33-40.
- [20] Arrigo AP. Gene expression and thiol redox state. *Free Radic Biol Med* 1999;27:936-944.
- [21] Halliwell B, Gutteridge JMC. **Free radicals in biology and medicine**. 4th ed. Oxford/UK: Clarendon Press/Oxford Science Publications; 2007.
- [22] Sesso HD, Buring JE, Christen WG, *et al.* Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. *JAMA* 2008;18:2123-2133
- [23] Qiao M, Zhao Q, Lee CF, *et al.* Thiol oxidative stress induced by metabolic disorders amplifies macrophage chemotactic responses and accelerates atherogenesis and kidney injury in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1779-1786.

- [24] Hasty AH, Gruen ML, Terry ES, *et al.* Effects of vitamin E on oxidative stress and atherosclerosis in an obese hyperlipidemic mouse model. *J Nutr Biochem* 2007;18:127-133.
- [25] Pryor WA. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Rad Bio Med* 2000;28:141-164.
- [26] Skilton MR, Moulin P, Sérusclat A, Nony P, Bonnet F. A comparison of the NCEP-ATPIII, IDF and AHA/NHLBI metabolic syndrome definitions with relation to early carotid atherosclerosis in subjects with hypercholesterolemia or at risk of CVD: evidence for sex-specific differences. *Atherosclerosis* 2007;190:416-422.
- [27] Bachorik PS, Albers JJ. Precipitation methods for quantification of lipoproteins. *Methods Enzymol* 1986;129:78-100.
- [28] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
- [29] Jentzsch AM, Bachmann H, Furst P, *et al.* Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:251-256.
- [30] Levini RL, Garland D, Oliver CN, Amiei A, Climent I, Lenz A. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464-468.
- [31] Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-126.
- [32] Mc Cord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049-6055.
- [33] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-77.

- [34] Hansen LG, Warwick WJ. A fluorometric micromethod for serum vitamins A and E. *Am J Clin Pathol* 1969;51:538-541.
- [35] Roe, J.H. In: D. Glick (Ed.), *Methods of Biochemical Analysis*. Interscience: New York, 1954, p.115–139.
- [36] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- [37] Taufer M, Peres A, de Andrade VM, *et al.* Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005;60:432-438.
- [38] Serdar Z, Aslan K, Dirican M, Sarandol E, Yesilbursa D, Serdar A. Lipid and protein oxidation and antioxidant status in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Clin Biochem*. 2006;39:794-803.
- [39] Vassalle C, Pratali L, Boni C, Mercuri A, Ndreu R. An oxidative stress score as a combined measure of the pro-oxidant and anti-oxidant counterparts in patients with coronary artery disease. *Clin Biochem* 2008;41:1162-1167.
- [40] Yang RL, Shi YH, Hao G, Li W, Le GW. Increasing in oxidative stress with progressive hyperlipidemia in human: relation between malondialdehyde and atherogenic index. *J Clin Biochem Nutr* 2008;43:154–158.
- [41] Walter MF, Jacob RF, Jeffers B, Ghadanfar MM, Preston GM, Buch J, *et al.* Serum levels of thiobarbituric acid reactive substances predict cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease: A longitudinal analysis of the Prevent study. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1996-2002.
- [42] Fu S, Davies MJ, Stocker R, Dean RT. Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. *Biochem J* 1998;333:519-525.

- [43] Nelson S, Bose SK, Grunwald GK, Myhill P, McCord JM. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: a fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free Radic Biol Med* 2006;40:341-347.
- [44] Repine JE. Oxidant-antioxidant balance: some observations from studies of ischemia-reperfusion in isolated perfused rat hearts. *Am J Med* 1991;91:45–53.
- [45] Shimizu H, Kiyohara Y, Kato I, *et al.* Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study. *Stroke* 2004;35:2072–2077.
- [46] Wronska-Nofer T, Nofer J, Stetkiewicz J, *et al.*, Evidence for oxidative stress at elevated plasma thiol levels in chronic exposure to carbon disulfide (CS₂) and coronary heart disease. *Nutr Metabol Cardiovasc Dis* 2007; 17: 546-553.
- [47] Tietz, NM. *Clinical guide to laboratory tests*. 2nd ed. Philadelphia/US: W.B. Saunders; 1990.
- [48] Dohi Y, Takase H, Sato K, Ueda R. Association among C-reactive protein, oxidative stress, and traditional risk factors in healthy Japanese subjects. *Int J Cardiol* 2007;115:63-66.
- [49] Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226:561-565.
- [50] Rosenblum JS, Gilula NB, Lerner RA. On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4471-4473

[51] Dedoussis GV, Kanoni S, Panagiotakos DB, *et al.* Age-dependent dichotomous effect of superoxide dismutase Ala16Val polymorphism on oxidized LDL levels. *Exp Mol Med* 2008;40: 27-34.

[52] Fujimoto H, Taguchi JI, Imai Y, *et al.* Manganese superoxide dismutase polymorphism affects the oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis of macrophages and coronary artery disease. *Eur Heart J* 2008;29:1267-1274.

LEGEND TO FIGURE

Figure 1. The values of TBARS (A), carbonyl protein (B), GSH (C), thiols (D), SOD (E), catalase (F), vitamin C (G), and vitamin E (H) in control and hypercholesterolemia groups. *P<0.05, **P<0.001.

Figure 1

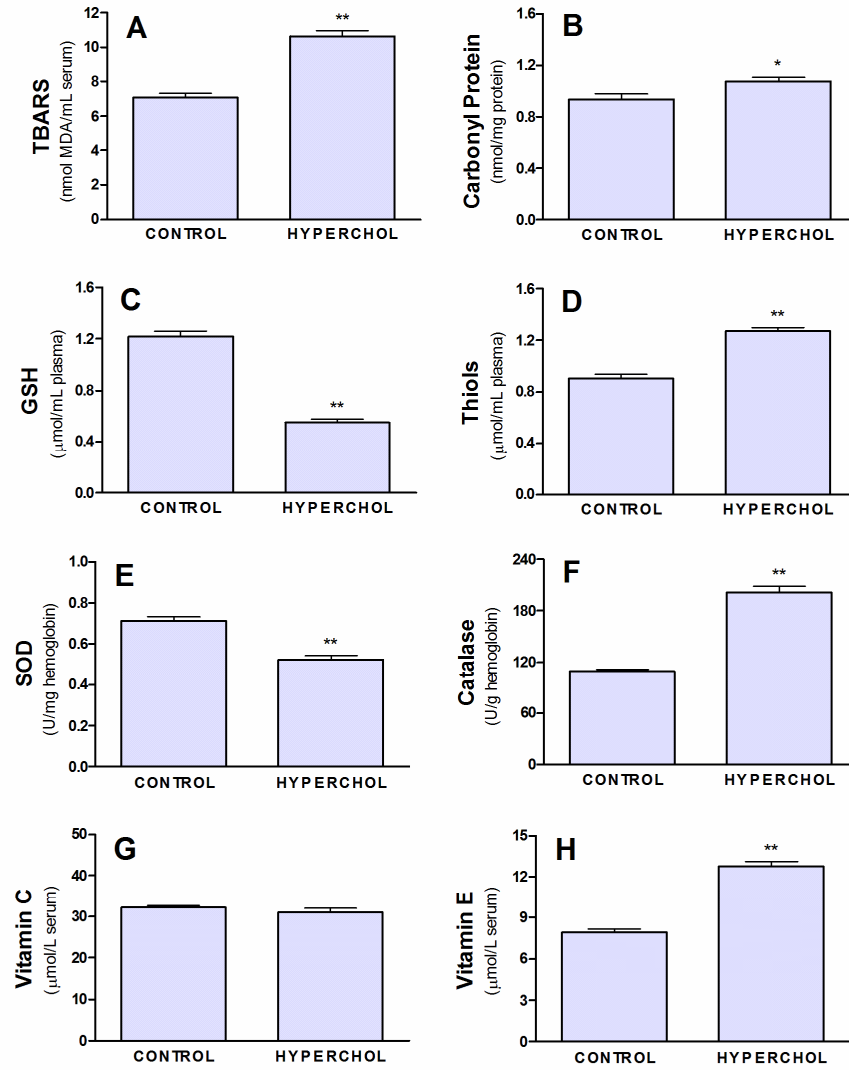


Table 1. Baseline characteristics of study subjects.

	Control	Hypercholesterolemia
n	40	40
Age (years)	48.48 ± 1.97	49.50 ± 1.97
Sex (male/female)	20/20	19/21
Glucose (mmol/L)	4.56 ± 0.060	4.73 ± 0.056*
Total cholesterol (mmol/L)	3.80 ± 0.073	8.23 ± 0.29**
LDL cholesterol (mmol/L)	1.98 ± 0.047	5.89 ± 0.31**
HDL cholesterol (mmol/L)	1.31 ± 0.042	1.17 ± 0.058*
Triglycerides (mmol/L)	1.09 ± 0.076	2.55 ± 0.25**
hs-PCR (mg/L)	0.18 ± 0.01	1.96 ± 0.24**

Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM).

*P < 0.05

**P < 0.001

Table 2. Correlations between total cholesterol, hs-CRP and oxidative stress biomarkers.

	TOTAL CHOLESTEROL		hs-CRP	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
TBARS	0.6873	< 0.0001	0.4879	< 0.0001
Carbonyl protein	0.2358	0.0352	0.1178	0.2982
GSH	-0.6923	< 0.0001	-0.5584	< 0.0001
Thiols	0.5786	< 0.0001	0.5050	< 0.0001
SOD	-0.4561	< 0.0001	-0.3448	0.0017
Catalase	0.7377	< 0.0001	0.5268	< 0.0001
Vitamin C	-0.0918	0.4181	-0.0292	0.7965
Vitamin E	0.7054	< 0.0001	0.4486	< 0.0001

Table 3. MnSOD polymorphism genotypes and baseline levels of biochemical and oxidative stress parameters of study subjects.

Genotypes	CONTROL			HYPERCHOLESTEROLEMIA		
	AA	AV	VV	AA	AV	VV
n	26	11	3	4	22	14
Glucose (mmol/L)	4.60 ± 0.08	4.46 ± 0.09	4.64 ± 0.05	4.84 ± 0.16	4.75 ± 0.06	4.80 ± 0.12
Total cholesterol (mmol/L)	3.79 ± 0.90	3.79 ± 0.17	3.88 ± 0.27	8.02 ± 0.61 ^{†††}	8.14 ± 0.44 ^{†††}	8.42 ± 0.46 ^{†††}
HDL cholesterol (mmol/L)	1.27 ± 0.05	1.34 ± 0.09	1.58 ± 0.17	1.25 ± 0.16	1.12 ± 0.08	1.21 ± 0.11
LDL cholesterol (mmol/L)	2.00 ± 0.64	1.97 ± 0.07	1.88 ± 0.21	5.90 ± 0.59 ^{†††}	5.85 ± 0.47 ^{†††}	5.95 ± 0.49 ^{†††}
Triglycerides (mmol/L)	1.12 ± 0.10	1.05 ± 0.14	0.92 ± 0.23	1.92 ± 0.37	2.54 ± 0.42 [†]	2.74 ± 0.31 [†]
hs-CRP (mg/L)	0.20 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.03	1.58 ± 0.83 [†]	2.05 ± 0.33 ^{†††}	1.92 ± 0.44 [†]
TBARS (nmol MDA/mL serum)	6.22 ± 0.25	8.55 ± 0.26 [*]	9.06 ± 0.03 [*]	8.97 ± 0.19 ^{††}	9.84 ± 0.30	12.45 ± 0.49 ^{***††}
Carbonyl protein (nmol/mg protein)	0.84 ± 0.04	1.05 ± 0.08	1.33 ± 0.11 ^{***}	0.80 ± 0.06	0.99 ± 0.04	1.28 ± 0.02 ^{***}
GSH (μmol/mL plasma)	1.07 ± 0.04	1.42 ± 0.05 ^{***}	1.74 ± 0.12 ^{***}	0.90 ± 0.07	0.57 ± 0.02 ^{**†††}	0.43 ± 0.03 ^{***†††}
Thiols (μmol/mL plasma)	0.84 ± 0.04	1.03 ± 0.04 [*]	1.13 ± 0.09 [*]	1.09 ± 0.05 [†]	1.20 ± 0.01 [†]	1.44 ± 0.03 ^{***†}
SOD (U/mg hemoglobin)	0.79 ± 0.01	0.59 ± 0.02 ^{***}	0.45 ± 0.07 ^{***}	0.71 ± 0.03	0.53 ± 0.03 ^{**}	0.46 ± 0.03 ^{***}
Catalase (U/g hemoglobin)	100.10 ± 1.34	124.40 ± 3.84 [*]	133.60 ± 2.69 [*]	142.70 ± 3.26 ^{††}	184.40 ± 7.74 ^{**†††}	245.20 ± 4.26 ^{***†††}
Vitamin C (μmol/L serum)	31.08 ± 0.62	33.15 ± 0.43	38.48 ± 1.82 [*]	40.92 ± 2.03 ^{†††}	31.35 ± 0.91 ^{***}	27.76 ± 1.27 ^{***†††}
Vitamin E (μmol/L serum)	7.32 ± 0.25	8.73 ± 0.19	10.21 ± 0.22	12.12 ± 0.85 ^{†††}	11.76 ± 0.15 ^{†††}	14.44 ± 0.96 ^{††}

Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared to genotype AA into each group (control and hypercholesterolemia); [†]P<0.05, ^{††}P<0.01, ^{†††}P<0.001 compared to respective genotype observed in control group.

5 DISCUSSÃO

O estudo aqui descrito teve como principais resultados a associação significativa entre os níveis de IMA e hipercolesterolemia e da ocorrência de maior risco de hipercolesterolemia em indivíduos portadores do genótipo VV do polimorfismo Ala16Val da MnSOD.

A hipercolesterolemia está associada a várias manifestações e disfunções endoteliais, sendo considerado um dos maiores fatores de risco para desencadear a aterosclerose (KANNEL et al., 1979; ROCHA e LIBBY, 2009). A aterosclerose é uma patologia caracterizada por inflamação crônica da parede vascular, que está associada a uma grande produção de EROs, ativação das células endoteliais e acúmulo de leucócitos na parede arterial (KOTUR-STEVLJEVIC et al., 2007).

Como destacado anteriormente, os resultados do **Artigo 1** evidenciaram que a hipercolesterolemia mostrou associação significativa com o aumento do ox-LDL, dos anti-ox-LDL e de marcadores inflamatórios como a PCR-us. Estas associações, considerando os trabalhos prévios publicados na literatura já eram esperadas. Entretanto, adicionalmente, foi verificada a associação entre hipercolesterolemia e altos níveis de IMA. Tal resultado, pelo nosso conhecimento e revisão científica realizada até o momento da publicação do estudo, foi o primeiro a ser publicado. A possível explicação biológica relacionada a tal associação pode ser considerada através de alguns fatores causais. A hipercolesterolemia poderia aumentar a predisposição a aterosclerose e diminuir a reperfusão do oxigênio. Assim, sujeitos que apresentam níveis elevados de IMA podem ter uma predisposição para o desenvolvimento de placas de ateroma. Esta possível explicação é corroborada por resultados adicionais encontrados no nosso estudo, uma vez que foi observada uma correlação positiva entre altos níveis de colesterol e PCR-us, que são concordantes com os dados encontrados na literatura (REIFENBERG et al., 2005; PACKARD e LIBBY 2008; POSTADZHIYAN et al., 2008; MARTIN et al., 2009). Em sujeitos hipercolesterolêmicos, a formação da placa está associada a um aumento da inflamação, verificado através dos elevados níveis de PCR-us, o que poderá estar relacionado a um processo isquêmico porque foi

encontrada uma correlação positiva entre os níveis sorológicos de colesterol, PCR-us e IMA.

Os resultados desse estudo também indicaram uma correlação positiva entre IMA e anti-ox-LDL. Pelo nosso conhecimento, esse também foi o primeiro estudo sobre a associação entre IMA e anti-ox-LDL. A superprodução de RL pode produzir uma modificação química na estrutura da albumina humana do soro, resultando em um aumento dos níveis de IMA, que parece ser um biomarcador de estresse oxidativo. A dosagem de IMA no soro de sujeitos hipercolesterolêmicos assintomáticos pode contribuir na avaliação prognóstica, pois os seus resultados foram associados com anti-ox-LDL, sugerindo o envolvimento da IMA com o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas subclínicas. Elevados níveis de colesterol favorecem o estresse oxidativo, provocando uma modificação do LDL. Em condições de estresse oxidativo, ocorre oxidação dos fosfolipídios da lipoproteína a qual torna-se oxidada (RODRIGUEZ-PORCEL et al., 2001; MADAMANCHI et al., 2005; ROCHA e LIBBY, 2009).

Os RL desempenham um importante papel na disfunção endotelial, a qual é caracterizada por uma perda da função protetora do endotélio, ocorrendo uma internalização do colesterol e recrutamento de células inflamatórias para o interior da parede vascular, iniciando o processo aterosclerótico (ARMSTRONG et al., 2006 a; RIDKER, 2009). O estresse oxidativo pode ser um determinante para o aumento dos níveis de PCR, promovendo um processo pró-aterosclerótico nos estágios iniciais das doenças cardíacas (RIDKER et al., 2000; KASAP et al., 2007). Nesse estudo, os valores de IMA e PCR-us foram significativamente elevados em sujeitos com hipercolesterolemia.

A IMA está associada com uma excessiva oxidação protéica (ABRAMSON et al., 2005), podendo estar envolvida na patogênese da aterosclerose, especialmente nos quadros subclínicos. Parece ter uma pequena meia-vida, retornando para os valores basais em 6-12 horas, como foi demonstrado recentemente em pacientes com angina pectoris estável após uma rápida isquemia induzida durante a realização de angioplastia (DUSEK et al., 2006).

O dano das células endoteliais, após a resposta inflamatória, tem sido associado com elevados níveis de IMA (BOGAVAC-STANOJEVIĆ et al., 2007). Vários estudos

demonstraram que a isquemia, seguida pela reperfusão estimula uma cascata de reações pró-inflamatórias que são conhecidas por conduzir a produção de EROs (VASSALLE et al., 2008; AMIN e ABD EL-TWAB, 2009). O aumento do estresse oxidativo associado à hipercolesterolemia induz altos níveis de ox-LDL, os quais estão ligados com a resposta inflamatória nas vênulas (STOKES et al., 2002). A modificação oxidativa do LDL leva a formação de epítomos imunogênicos na molécula de LDL, os que estimulam a formação de anticorpos contra ox-LDL, detectados no soro. Anticorpos anti ox-LDL presentes nas lesões ateroscleróticas demonstram bloquear a fagocitose do ox-LDL pelos macrófagos, sugerindo um possível papel na prevenção da formação de CE (SHAW et al., 2001; TINAHONES et al., 2005; PENGO et al., 2008).

Uma correlação negativa entre HDL e PCR-us foi encontrada nesse estudo, estando também de acordo com dados obtidos por Wadham et al. (2004). Vários estudos relataram que o HDL inibe a liberação de citocinas e a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais. Esses relatos sugerem uma potente capacidade antiinflamatória do HDL, o qual pode ser considerado como agente protetor, inibindo a aterogênese (MINEO et al., 2006). O HDL pode exercer um efeito protetor através da inibição da modificação oxidativa do LDL, o qual tem um papel central na iniciação e progressão da aterosclerose. Vários trabalhos sugerem que o HDL pode agir como um antioxidante, devido à atividade das proteínas que se encontram associada a ele, como é o caso da paraoxonase (DEAKIN et al., 2007; JUREK et al., 2008, SCHWARTZ, 2009).

A hipercolesterolemia provoca uma disfunção endotelial devido à excessiva produção de EROs, incluindo o aumento na geração de superóxidos (MINOR et al., 1990; HUANG et al., 2008). O superóxido (O_2^-) é um potente radical livre, e contribui para o desenvolvimento da aterosclerose por inibir o efeito vasodilatador do óxido nítrico (THOMAS et al., 2008; MULLER e MORAWIETZ, 2009).

A excessiva produção de anión superóxido e seus derivados estimulam a mitogênese celular, promovendo mutação gênica especialmente da enzima superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD), (MATTES, 2000; FORTUNATO e DI TARANTO, 2007; DEDOUSSIS et al., 2008).

Com base neste contexto, o estudo realizado no **Manuscrito 1**, verificou uma associação positiva entre a hipercolesterolemia e o polimorfismo genético da Ala16Val MnSOD, onde foi observado uma menor frequência dos genótipos AA no grupo hipercolesterolêmico quando comparado com os outros genótipos. Em estudos prévios realizados por nosso grupo, foi verificado que a população em geral apresenta como genótipo mais freqüente o AA, correspondente a 14,5%, em recém-nascidos foi encontrado 18,5 % e em adultos e idosos 25-29% (TAUFER et al., 2005). Em recente investigação, foi encontrada uma associação entre o polimorfismo genético da Ala16Val MnSOD e obesidade, onde foi constatado que a frequência do genótipo AA está reduzida em torno de 10% em sujeitos obesos quando comparados com sujeitos do grupo controle (MONTANO et al., 2009).

Relatos na literatura sugerem que o polimorfismo da Ala16Val pode estar associado com o desenvolvimento do DM2 em japoneses-americanos. Os autores acreditam que esta associação pode ser devido à ineficiente dismutação das EROs pelo alelo V, o que pode conduzir para uma maior suscetibilidade à intolerância a glicose (NAKANISHI et al., 2008). Recentes investigações confirmam que o genótipo AA+AV da Ala16Val MnSOD é um independente fator protetor contra o desenvolvimento da nefropatia diabética em pacientes Chineses (LIU et al., 2009).

Considerando os resultados anteriormente publicados e apresentados aqui, o estudo realizado sugere que este polimorfismo tem alguma influência no metabolismo oxidativo, estando relacionado a desordens endócrinas como obesidade e hipercolesterolemia. A fundamentação fisiopatológica desse polimorfismo está baseada na observação das condições patológicas que predisõem a eventos cardiovasculares, como hipertensão, hipercolesterolemia e diabetes, que se associam com o estresse oxidativo. Essa observação e outros dados obtidos em investigações adicionais evidenciam que o aumento do estresse oxidativo está decisivamente implicado na patogênese da disfunção endotelial e, conseqüentemente, da aterosclerose (WASSMANN et al., 2004).

No **Manuscrito 1**, não foi verificado uma associação positiva entre os níveis sorológicos do ox-LDL, anti-ox-LDL, PCR-us e o polimorfismo da Ala16Val MnSOD. Os mais altos níveis desses biomarcadores podem estar somente relacionados à

hipercolesterolemia propriamente dita (DUARTE et al., 2007), não sendo influenciados pelo polimorfismo da MnSOD. Entretanto, esses resultados podem ser diferentes, na condição de estresse fisiológico. Este foi o caso do estudo conduzido por Isbir et al. (2008), onde pesquisaram o possível efeito do polimorfismo da Ala16Val MnSOD na produção de IL-6 e nos níveis enzimáticos de MnSOD em 42 pacientes que realizaram cirurgia cardíaca e cardiopulmonar. Os autores encontraram níveis semelhantes de IL-6 na avaliação pré-operatória, porém níveis de IL-6 no pós-operatório foram significativamente elevados em todos os pacientes e mais significativos nos que apresentavam o alelo V (AV+VV). Estes dados sugerem que o polimorfismo da Ala16Val MnSOD tem um papel importante na liberação de citocinas.

Outra investigação interessante verificou a associação entre o polimorfismo da MnSOD e as células sanguíneas, sendo realizada em 498 pacientes com DC e 627 sujeitos saudáveis. Os resultados indicaram que o alelo A, aumenta a atividade enzimática da MnSOD mitocondrial, protegendo os macrófagos contra a apoptose induzida pelo ox-LDL e reduz os riscos de DC e IAM (FUJIMOTO et al., 2008).

Os resultados do **Manuscrito 1** também demonstraram que os níveis de colesterol HDL foram menores em sujeitos hipercolesterolêmicos que apresentavam o alelo V (AV+VV), quando comparados com os hipercolesterolêmicos AA e com os sujeitos saudáveis AA, AV e VV. Os níveis de HDL são inversamente proporcionais com a ocorrência de eventos cardiovasculares e parecem exercer um importante papel na proteção vascular (BARTER et al., 2007; AMIN e ABD EL-TWAB, 2009). Sujeitos com elevados níveis plasmáticos de HDL são menos suscetíveis às DC (SPIEKER et al., 2002). Por outro lado, a redução nos níveis de HDL é um fator predisponente a aumentar a incidência de DC, como o IAM e acidente vascular cerebral (AVC) (BURING et al., 2002; FREITAS et al., 2009).

Entre os mecanismos pelos quais o HDL exerce um efeito protetor, pode-se incluir a sua ação de facilitar o transporte reverso do colesterol, levando o colesterol ao fígado para ser excretado, impedindo que o mesmo penetre na vasculatura. Além disso, o HDL exerce efeito vasoprotetor, ao estimular a expressão das células progenitoras endoteliais, que são derivadas da medula óssea (PETOUMENOS et al., 2009). O HDL reduz o estresse oxidativo na parede vascular, contribuindo como um fator anti-

aterogênico. Contudo, estudos complementares, que venham a verificar variáveis intervenientes possíveis (inclusive dieta e atividade física), devem ser realizados para evidenciar a relação entre níveis de HDL e o polimorfismo da Ala16Val MnSOD.

No **Manuscrito 2**, evidenciou-se um aumento do estresse oxidativo em sujeitos hipercolesterolêmicos, especialmente nos que apresentavam o genótipo VV para o polimorfismo da Ala16Val MnSOD. Esse é o primeiro estudo avaliando o estresse oxidativo e sua associação com o polimorfismo da Ala16Val superóxido dismutase.

Existe um consenso de que a hipercolesterolemia e a aterosclerose representam um estado de estresse oxidativo aumentado caracterizado por uma oxidação de lipídios e de proteínas na parede vascular (SKILTON et al., 2007). A lipoperoxidação pode interromper a organização da membrana e causar modificações em sua fluidez e permeabilidade. Por conseguinte, prejudicando a atividade das enzimas ligadas à membrana, o transporte e a função do sistema de segundo mensageiro (VALKO et al., 2007, ZEDÁK et al., 2009). Além disso, tem sido demonstrado que a lipoperoxidação tem um importante papel nas respostas inflamatórias crônicas como na aterosclerose (SERDAR et al., 2006; VASSALLE et al., 2008).

No **Manuscrito 2**, alguns indicadores de estresse oxidativo estavam elevados nos sujeitos hipercolesterolêmicos, incluindo os níveis de TBARS. Esses achados estão associados ao dano das estruturas lipídicas pelos RL. Nesse estudo, nós verificamos uma correlação positiva entre os níveis de CT e TBARS. Esses resultados estão de acordo com recentes estudos, que mostraram uma associação entre a peroxidação lipídica com altos níveis sorológicos de lipídios (DUARTE et al., 2007; YANG et al., 2008). TBARS tem sido associado como um preditor de eventos cardiovasculares em pacientes com doenças cardíacas estabelecidas, independente dos tradicionais fatores de risco e de marcadores inflamatórios (WALTER et al., 2004).

As proteínas constituem os principais componentes das células vivas, e uma pequena modificação na sua estrutura promove importante alteração nas suas funções. Os principais alvos para ataque das EROs são os lipídios e as proteínas. A formação da proteína carbonil parece ser um fenômeno comum durante a oxidação proteica, e a sua quantificação pode ser usada para medir a extensão do dano oxidativo (DALLE-DONNE et al., 2003). Os resultados do presente estudo indicam um aumento da proteína

carbonil no plasma dos sujeitos hipercolesterolêmicos. Nossos resultados estão de acordo com estudos prévios realizados Fu et al. (1998), os quais investigaram o papel dos radicais na oxidação das proteínas nas placas ateroscleróticas, e eles concluíram que os produtos reativos provenientes da oxidação protéica são possíveis contribuidores da aterogênese vascular.

O efeito da espécie reativa é equilibrado pela ação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. A defesa dos antioxidantes é extremamente importante, uma vez que estes promovem a remoção direta dos RL e fornecem proteção máxima nos sítios biológicos (ZEDÁK et al., 2009). Em nosso estudo, foi demonstrado que a atividade da SOD estava diminuída nos sujeitos hipercolesterolêmicos. A SOD constitui a primeira linha de defesa celular contra os danos provocados pelo ânion superóxido e pelo peróxido de hidrogênio. A insuficiente detoxicação dessas espécies reativas pelas enzimas antioxidantes pode conduzir a um desequilíbrio entre a formação de EROs e os sistemas antioxidantes. A baixa atividade da SOD pode ser também atribuída à inativação da enzima devido à oxidação protéica provocada pelas EROs (NELSON. et al., 2006). Entretanto, a atividade da catalase estava aumentada em sujeitos hipercolesterolêmicos e essa constatação pode ser explicada porque durante o estresse oxidativo há um aumento primário do $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 . Supõe-se que qualquer atividade aumentada de catalase é secundária nesses casos, refletindo uma tentativa de compensar parcialmente o aumento do estresse oxidativo. Existem evidências de que esta segunda alternativa de induzir a produção de enzimas antioxidantes em resposta a um insulto oxidativo pode ser protetor como um modo de desenvolver um mecanismo de tolerância induzida a um maior insulto subsequente (REPINE, 1991; MATÉS et al., 1999; VALKO et al., 2007).

O GSH desempenha um importante papel na detoxicação de EROs e, portanto, pode prevenir dano celular provocado pelo estresse oxidativo (XU et al., 2008). Vários dados reportam, na literatura, que indivíduos portadores de doenças crônicas, como as doenças cardíacas, artrite, diabetes e neoplasias, apresentam níveis plasmáticos de GSH menores que os controles, sugerindo o papel protetor do GSH contra muitas patologias (SHIMIZU et al., 2004). Nosso estudo também revelou uma elevação nos níveis de tióis em sujeitos hipercolesterolêmicos. Segundo Wronska-Nofer e

colaboradores (2007), as concentrações de tióis estão elevadas em sujeitos expostos cronicamente ao dissulfeto de carbono (CS₂) e com doenças coronárias.

Dados encontrados no **Manuscrito 2** mostraram um aumento nos níveis sorológicos da Vit E. Esses achados confirmam que a Vit E atua como um neutralizador do radical peroxil, sendo um importante antioxidante nos casos de hipercolesterolemia. A Vit E pode regular a proliferação das células musculares lisas e dos monócitos provocados pelas EROs, por mecanismos que envolvem a inibição da proteína quinase C (PKC), basicamente dependente da Vit E e de suas isoformas e estereoisômeros (SERDAR et al., 2006). Nossos resultados são consistentes com as observações de Hasty et al. (2007), em que a Vit E tem sido demonstrada como sendo anti-aterogênica.

Com base nos resultados obtidos no **Artigo 1** e no **Manuscrito 2**, sugere-se uma significativa correlação entre colesterol total, PCR-us e biomarcadores do estresse oxidativo. Várias evidências apóiam o conceito de que a hipercolesterolemia ativa uma cascata de reações pró-inflamatórias que são conhecidas por levar à produção de EROs. A oxidação de lipídios e proteínas provoca um aumento progressivo dos níveis de PCR-us. Vários relatos sugerem que a PCR desempenha um papel direto na fisiopatologia, desenvolvimento e progressão da aterosclerose (DOHI et al., 2007)

Os resultados dos **Manuscritos 1** e **2** demonstram uma associação entre a hipercolesterolemia e o genótipo VV para o polimorfismo da MnSOD, bem como o aumento de estresse oxidativo, representado especialmente pelo aumento dos níveis de proteína carbonil e TBARS. O alelo Ala/Ala apresenta uma estrutura protéica do tipo α -hélice, que permite o seu eficiente transporte do citosol para a mitocôndria. A valina variante (Ala/Val ou Val/Val) parece apresentar uma estrutura β -hélice pregueada, dificultando assim o seu transporte para o espaço mitocondrial e, desta forma, reduzindo a sua atividade antioxidante (BOHNI et al., 1983; SHIMODA-MATSUBAYASHI et al., 1996; ROSENBLUM et al., 1996).

A variante Val da MnSOD pode estar presente em uma concentração mais baixa na mitocôndria e, logo, os pacientes homozigotos Val/Val possuem uma baixa resistência ao estresse oxidativo. Supõe-se, então, que a produção aumentada de catalase, tióis e Vit E seria uma forma secundária para compensar parcialmente o aumento do estresse oxidativo. Corroborando com nossos resultados, vários estudos

sugeriram que o polimorfismo da MnSOD está associado com doenças induzidas pelo dano oxidativo, inclusive a aterosclerose. Dedoussis e colaboradores (2008) encontraram elevados níveis de ox-LDL em homens de média idade que apresentavam o genótipo Val/Val, quando comparados com os outros alelos (Ala/Ala e Ala/Val). Recentemente, Fujimoto et al. (2008) encontraram que a variante alanina aumenta a atividade da MnSOD mitocondrial, protegendo os macrófagos contra a apoptose induzida pelo ox-LDL e reduzindo o risco de síndromes coronarianas agudas e DC. Montano et al. (2009) encontraram uma maior frequência do genótipo VV em indivíduos obesos.

A análise desses 3 trabalhos, aqui mencionados, permite entender um pouco mais sobre o efeito da hipercolesterolemia e os mecanismos envolvidos na formação de aterosclerose. Os resultados sugerem que elevados níveis de colesterol promovem um aumento do estresse oxidativo, o qual compromete a integridade vascular. A vasculatura é danificada pelo influxo de LDL que se oxida e desencadeia uma cascata inflamatória representada pela formação de anti-ox-LDL e níveis elevados de PCR-us. A superprodução de RL faz com que a albumina, uma importante proteína plasmática, possa sofrer uma modificação química na sua estrutura, resultando em um aumento da IMA, que parece ser um biomarcador do estresse oxidativo.

É importante salientar que o estresse oxidativo está associado ao polimorfismo da Ala16Val MnSOD, especialmente nos sujeitos que apresentam homozigose para o genótipo VV, o que pode acarretar uma redução na atividade da SOD. O desequilíbrio entre a geração de EROs e as defesas antioxidantes promovem modificações biomoleculares as quais modificam a atividade enzimática, provocando mutações gênicas, comprometendo a fisiologia celular e contribuindo progressivamente para o desencadeamento de patologias promotoras de morbidade e/ou mortalidade.

6 CONCLUSÃO

- A hipercolesterolemia está associada a um aumento dos biomarcadores inflamatórios e estresse oxidativo, que poderá induzir a formação de radicais livres reduzindo a capacidade da albumina em se ligar ao cobalto durante a isquemia, resultando em um aumento dos níveis de IMA.
- Existe uma associação significativa entre IMA e PCR-us. Esses dados sugerem um possível papel da IMA como um marcador de desenvolvimento de placa de ateroma.
- A hipercolesterolemia está associada à expressão do genótipo VV.
- Sujeitos normolipêmicos e colesterolêmicos com genótipo VV apresentam redução nos níveis plasmáticos de HDL.
- Na hipercolesterolemia, ocorre um aumento na oxidação de lipídios e proteínas e a redução de alguns antioxidantes como redução da atividade enzimática da SOD.
- Sugere-se uma associação entre o genótipo VV da MnSOD com a hipercolesterolemia e o os biomarcadores do estresse oxidativo. Uma explicação biológica possível para essa associação pode ser um desequilíbrio entre a formação de superóxidos e a deficiente detoxicação por parte da SOD, nos sujeitos hipercolesterolêmicos que apresentam o genótipo VV.

7 PERSPECTIVAS

1. Avaliar as apolipoproteínas A (apoA) e B (apoB), Lp A, óxido nítrico (NO), paraoxonase (PON1), além dos biomarcadores da coagulabilidade sanguínea.
2. Avaliar as moléculas de adesão vascular molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão da célula vascular-1 (VCAM-1), selectinas, integrinas e as citocinas inflamatórias como interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2) e interleucina-6 (IL-6).
3. Estudar os possíveis polimorfismos das enzimas antioxidantes como a CAT e GSHPx.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, J.L. et al. Association between novel oxidative stress markers and C-reactive protein among adults without clinical coronary heart disease. **Atherosclerosis**, v. 178, p. 115-121, 2005.

AIKENS, J.; DIX, T. A. Peroxy radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. **J Biol Chem**, v. 266, p. 15091-15098, 1991.

ALBERTINI, R.; MORATTI R.; DE LUCA G. Oxidation of low-density lipoprotein in atherosclerosis from basic biochemistry to clinical studies. **Curr Mol Med**, v. 2, p. 579-592, 2002.

AL-BUSTAN, S. A, et al. Apolipoprotein E, C1 and B gene polymorphisms in a sample of patients with coronary heart disease in the Kuwaiti population **Med Princ Pract**, v. 18, p. 294-299, 2009.

ALEXANDROVA, M. L.; BOCHEV, P. G. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. **Free Radic Biol Med**, v.39, p. 297-316, 2005.

ALEXEYEV, M.F. Is there more to aging than mitochondrial DNA and reactive oxygen species? **FEBS J**, v. 276, p. 5768-5787, 2009.

ALWAILI, K. et al. Approach to the diagnosis and management of lipoprotein disorders. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v.16, p 132-140, 2009.

AMBERGER, A.; MACZEK, C.; JURGENS, G. Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and Hsp60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxidized low-density lipoproteins. **Cell Stress Chaperones**, v. 2, p. 94-103, 1997.

AMIN, K.A.; ABD EL-TWAB, T.M. Oxidative markers, nitric oxide and homocysteine alteration in hypercholesterolemic rats: role of atorvastatin and cinnamon. **Int J Clin Exp Med**, v.2, p.254-265, 2009.

AMIRTHARAJ, G.J. et al. Fatty acids influence binding of cobalt to serum albumin in patients with fatty liver. **Biochim Biophys Acta**, v. 1782, p. 349-354, 2008.

APPELTON, D.W.; SARKAR, B. The absence of specific copper (II)-binding site in dog albumin. **J Biol Chem**, v. 246, p. 5040-5046, 1971.

ARMSTRONG, E. J.; MORROW, D. A.; SABATINE, M. S. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes: part I: introduction and cytokines. **Circulation**, v.113, p.72-75, 2006. (a)

ARMSTRONG, E. J.; MORROW, D. A.; SABATINE, M. S. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes: part I: introduction and cytokines. **Circulation**, v.113, p.72-75, 2006. (b)

AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. São Paulo: Oficina de Textos. 2006.

AZZI, A. et al. A sensor and an information transducer of the cell oxidation status. **Am Soc Nutr**, v. 62, p. 1337S-1346S, 1995.

BADIMÓN, L.; VILAHUR, G.; PADRÓ, T. Lipoproteins, platelets and atherothrombosis. **Rev Esp Cardiol**, v. 62, p. 1161-1178, 2009.

BAL, W. et al. Multimetal binding site of serum albumin. **J Inorg Biochem**, v.70, p. 33-39, 1998.

BAR-OR, D. et al. Characterization of the Co²⁺ and Ni²⁺ binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin. **Eur J Biochem**, v. 268, p. 42-47, 2001.

BAR-OR, D.; LAU, E.; WINKLER, J. V. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia: a preliminary report. **J Emerg Med**, v. 19, p. 311-315, 2000.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BARTER, P. et al. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. **N Engl J Med**, v. 357, p.1301-1310, 2007.

BATLOUNI, M. Hipótese oxidativa da aterosclerose. **Arq Bras Cardiol**, v. 68, p. 55-63, 1997.

BATTISTI, V. et al. Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. **Clin Biochem**, v. 41, p.511-518, 2008.

BAUMEISTER S.E. et al. Predictive modeling of health care costs: do cardiovascular risk markers improve prediction? **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil**, 2009, doi: 10.1097/HJR.0b013e328333a0b7 (*in press*).

BEAL, M.F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. **Free Radic Biol Med**, v. 32, p. 797-803, 2002.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. Effect of vitamin C supplementation on plasma vitamin C and E levels. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 8, p. 207-210, 1999.

BERG, K.K. et al. The additive contribution from inflammatory genetic markers on the severity of cardiovascular disease. **Scand J Immunol**, v. 69, p.36-42, 2009.

BERRY, C. E.; HARE, J. M. Xanthine oxidoreductase in the cardiovascular system: Molecular mechanisms and pathophysiologic implications. **J Physiol**, v. 55, p. 589-606, 2004.

BHATT, D. L. et al. International Prevalence, Recognitions, and Treatment of Cardiovascular Risk Factors in Outpatients with Atherothrombosis. **JAMA**, v. 295, p. 180-189, 2006.

BICA, C.G. et al. MnSOD gene polymorphism association with steroid-dependent cancer. **Pathol Oncol Res**, v. 15, p. 19-24, 2008.

BOGAVAC-STANOJEVIĆ, N. et al. Lipid and inflammatory markers for the prediction of coronary artery disease: a multi-marker approach. **Clin Biochem**, v. 40, p.1000-1006, 2007.

BOHNI, P.C.; DAUM, G.; SCHATZ, G. Import of proteins into mitochondria. Partial purification of a matrix-located protease involved in cleavage of mitochondrial precursor polypeptides. **J Biol Chem**, v. 258, p. 4937-4943 1983.

BONITHON-KOPP, C. et al. Combined effects of lipid peroxidation and antioxidant status on carotid atherosclerosis in a population aged 59-71 y: The EVA Study. Etude sur le Vieillissement Arteriel. **Am J Clin Nutr**, v. 65, p. 121-127, 1997.

BORDERIE, D. et al. High ischemia-modified albumin concentration reflects oxidative stress but not myocardial involvement in systemic sclerosis. **Clin Chem**, v. 50, p.2190-2193, 2004.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCH, L.; MASSARO, D. **Oxygen, gene expression and cellular function**. New York: Marcel Decker, 1997.

BRAMBILLA, D. et al. The role of antioxidant supplement in immune system, neoplastic, and neurodegenerative disorders: a point of view for an assessment of the risk/benefit profile. **Nutr J**, v.7, p.29-38, 2008.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p. 813-820, 2001.

BURING, J.E. et al. Decreased HDL2 and HDL3 cholesterol, Apo A-I and Apo A-II, and increased risk of myocardial infarction. **Circulation**, v. 85, p. 22-29, 2002.

CECCONI, C. et al. The role of glutathione status in the protection against ischemic and reperfusion damage, effects of N-acetylcysteine. **J Mol Cell Cardiol**, v. 20, p. 5-13, 1988.

CHAN, A. C. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 71, p. 725-731, 1993.

CHARAKIDA, M. et al. Inflammatory and thrombotic processes are associated with vascular dysfunction in children with familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v. 204, p. 532-537, 2009.

CHATTERJEE, M. Augmented nitric oxide generation in neutrophils: Oxidative and pro-inflammatory implications in hypertension. **Free Radic Res**, v. 43, p. 1195-1204, 2009.

CHERUBINI, A. et al. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radic Biol Med**, v. 39, p. 841-852, 2005.

CHO, D. K. et al. Ischemia-modified albumin is a highly sensitive serum marker of transient myocardial ischemia induced by coronary vasospasm. **Coron Artery Dis**, v.18, p. 83-87, 2007.

CICHOTA, L.C. et al. Evaluation of ischemia-modified albumin in anemia associated to chronic kidney disease. **J Clin Lab Anal**, v. 22, p. 1-5, 2008.

COLLINS, A.R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, p. 143–151, 2008.

CONNOR, K. M. Manganese superoxide dismutase enhances the invasive and migratory activity of tumor cells. **Cancer Res**, v. 67, p. 10260-10267, 2007.

COOPER, A. D. Hepatic uptake of chylomicron remnants. **J Lipid Res**, v. 38, p. 2173-2192, 1997.

CORDERO, A. et al. Usefulness of triglycerides-to-high-density lipoprotein cholesterol ratio for predicting the first coronary event in men. **Am J Cardiol**, v. 104, p. 1393-1397, 2009.

CORREA, M.C. et al. Oxidative stress and erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) in hypertensive and ischemic patients of both acute and chronic stages. **Biomed Pharmacother**, v. 62, p. 317-324, 2008.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clin Chim Acta**, v. 329, p. 23-38, 2003.

DAVIES, K.J.A. **Oxidative damage & repair: chemical, biological and medical aspects**. Oxford: Pergamon, 1991.

DE GROOT, D.; PASTERKAMP, G.; HOEFER, I.E. Cardiovascular risk factors and collateral artery formation. **Eur J Clin Invest**, v. 12, p. 1036-1047, 2009.

DEAKIN, S.; MOREN, X.; JAMES, R.W. HDL oxidation compromises its influence on paraoxonase-1 secretion and its capacity to modulate enzyme activity. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.27, p. 1146-1152, 2007.

DEAN, R. T. et al. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **J Biochem**, v. 324, p 1-18, 1997.

DEDOUSSIS, G. V. et al. Age-dependent dichotomous effect of superoxide dismutase Ala16Val polymorphism on oxidized LDL levels. **Exp Mol Med**, v. 40, p. 27-34, 2008.

DEL MAESTRO, R.F. An approach to free radicals in medicine and biology. **Acta Physiol Scand**, v. 492, p. 153-168.1980.

DELANTY, N. et al. A 8-epi PGF2 alpha generation during coronary reperfusion. A potential quantitative marker of oxidant stress in vivo. **Circulation**, v. 95, p. 2492-2499, 1997.

DHALLA, N.S.; TEMSAH, R.M.; NETTICADAN, T. Role os oxidative stress in cardiovascular diseases. **J Hypertens**, v. 18, p. 655-673, 2000.

DI LISA, F. Mitochondria and vascular pathology. **Pharmacol Rep**, v. 61, p. 123-130, 2009.

DODD, S. et al. N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. **Expert Opin Biol Ther**, v.8, p.1955-1962, 2008.

DOHI, Y. et al. Association among C-reactive protein, oxidative stress, and traditional risk factors in healthy Japanese subjects. **Int J Cardiol**, v.115, p. 63-66, 2007.

DONNE, I. D. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clin Chim Acta** , v. 329, p. 23-38, 2003.

DOWEIKO, J.P.; NOMPLEGGI, D.J. Role of albumin in human physiology and pathophysiology. **JPEN**, v.15, p. 207-211, 1991.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, p. 47-95, 2002.

DUARTE, M. M. M. F. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. **FEBS J**, v. 274, p. 2707-2714, 2007.

DUBININA, E.E.; PUSTYGINA, A.V. Oxidative modification of proteins, its role in pathologic states. **Ukr Biokhim Zh**, v. 80, p. 5-18, 2008.

DUSEK, J. et al. Prognostic significance of ischemia modified albumin after percutaneous coronary intervention. **Clin Chim Acta**, v. 367, p.77-80, 2006.

ECKARDSTEIN, A. V.; NOFER, J. R.; ASSMANN, G. High density lipoproteins and arteriosclerosis: pole of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, p. 13-27, 2001.

EMMANUEL, L. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, p. 1412-1418, 2009.

ERDINÇLER, D. S. et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental animals: effects of aging and hypercholesterolemic diet. **Clin Chim Acta**, v. 265, p. 77-84, 1997.

FAGAN, G. J. et al.. The albumin cobalt binding test: analytical performance of a new automated chemistry assay for the detection of ischemia modified albumin (IMA). **JCLA**, v. 25, p. 178-187, 2002.

FALKENSAMMER, J. et al. Serum levels of ischemia-modified albumin in healthy volunteers after exercise-induced calf-muscle ischemia. **Clin Chem Lab Méd**, v. 45, p. 535-540, 2007.

FANDOS, M. et al. Impact of cardiovascular risk factors on oxidative stress and DNA damage in a high risk Mediterranean population. **Free Radic Res**, v. 43, p. 1179-1186, 2009.

FANG, X. et al. Overexpression of human superoxide dismutase inhibits oxidation of low-density lipoprotein by endothelial cells. **Circ Res**, n. 82, p. 1289-1297, 1998.

FDA. New test to rule out heart attack. 2003. Disponível em <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/psn/transcript.cfm?show=15>> Acesso em: 10 out. 2009.

FERDINANDY, P.; SCHULZ, R.; BAXTER, G.F. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning pharmacological reviews. **Pharmacol Rev**, v. 59, p. 418-458, 2007.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Assoc Med Bras**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FIELDING, C. J.; FIELDING, P. E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. **J Lipid Res**, v. 36, p. 211-228, 1995.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FORTUNATO, G.; Di TARANTO, M. D. Polymorphisms and the expression of genes encoding enzymes involved in cardiovascular diseases. **Clin Chim Acta**, v. 381, p. 21-25, 2007.

FOTI, M.C.; AMORATI, R. Non-phenolic radical-trapping antioxidants. **J Pharm Pharmacol**, v. 61, 1435-48, 2009

FREDRICKSON, D.S; LEVY, R.I; LEES, R.S. Fat transport in lipoproteins – and integrated approach to mechanisms and disorders. **N Engl J Med**, v. 276, p. 32-44, 1967.

FREI, B.; STOCKER, R.; AMES, B. N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, p. 9748-9752, 1988.

FREI, B.; ENGLAND, L.; AMES, B. N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, p. 6377-6381, 1989.

FREITAS, E.V. Importance of HDL-c for the occurrence of cardiovascular disease in the elderly. **Arq Bras Cardiol**, v. 93, p. 231-238, 2009.

FU, S. et al. Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. **Biochem J**, v. 333, p.519-525, 1998.

FUJIMOTO, H. et al. Manganese superoxide dismutase polymorphism affects the oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis of macrophages and coronary artery disease. **Eur Heart J**, v. 29, p. 1267-1274, 2008.

FUKUMOTO, M.; SHOJI, T.; EMOTO, M. Antibodies against oxidized LDL and carotid artery intima-media thickness in a healthy population. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, p. 703-707, 2000.

GAŁECKA, E. Antioxidative enzymes--structure, properties, functions. **Pol Merkur Lekarski**, v. 25, p. 266-8, 2008.

GALLAGHER, C. J. et al. Association between haplotypes of manganese superoxide dismutase (SOD2), smoking, and lung cancer risk. **Free Radic Biol Med**, v. 46, p. 20-24, 2009.

GALVANI, S. et al. Carbonyl scavenger and antiatherogenic effects of hydrazine derivatives. **Free Radic Biol Med**, v. 45, 1457-1467, 2008.

GAUTIER, E.; JAKUBZICK, C.; RANDOLPH, G.J. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, p. 1412-1418, 2009.

GAZE, D. C. Ischemia modified albumin: a novel biomarker for the detection of cardiac ischemia. **Drug Metab Pharmacokinet**, v. 24, p. 333-341, 2009.

GENG, Y. J.; HANSSON, G. K. Interferon- γ inhibits scavenger receptor expression and formation in human monocyte-derived macrophages. **J Clin Invest.** , v. 89, p. 1322–1330, 1992.

GOLDBERG, I. J. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. **J Lipid Res**, v. 37, p. 693-707, 1996.

GOTTLIEB, M.G. et al. Association among oxidized LDL levels, SOD2, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. **Genet Mol Res**, v. 4, p.691-703, 2005.

GUL, M. et al. Cellular and clinical implications of glutathione. **Indian J Exp Biol**, v. 38, p. 625-634, 2000.

GUNDUZ, A. et al. Ischemia-modified albumin levels in cerebrovascular accidents. **Am J Emerg Med**, v. 26, p. 874-878, 2008.

GUPTA, S. Lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia: a systematic review. **Obstet Gynecol Surv**, v. 64, p. 750-759, 2009.

HAFIZE, U. et al. Plasma protein carbonyl and thiol stress before and after laparoscopic gastric banding in morbidly obese patients. **Obes Surg**, v. 17, p. 1367-1373, 2007.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, v.186, p.1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. I. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. **FEBS Lett**, v.281, p. 9-19, 1991.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **Am J Clin Nutr**, v. 57, p. 715S-724S, 1993.

HALLIWELL, B.; ZHAO, K.; WHITEMAN, M. Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. **Free Radic Res**, v.31, p.651-669, 1999.

HALLIWEL B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs aging**, v. 18, p. 685-716, 2001.

HALLIWEL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**, v. 141, p. 312-322, 2006.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. **Free radicals in biology and medicine**. 4th ed. Oxford/UK: Clarendon Press/Oxford Science Publications; 2007.

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

HARRIS, A.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Oxidative stress, alpha-tocopherol therapy, and atherosclerosis. **Curr Atheroscler Rep**, v. 4, p. 373-380, 2002.

HARRISON, D. et al. Role of oxidative stress in atherosclerosis. **Am J Cardiol**, v. 91, p. 7A–11A, 2003.

HASTY, A.H. et al. Effects of vitamin E on oxidative stress and atherosclerosis in an obese hyperlipidemic mouse model. **J Nutr Biochem**, v.18, p. 127-133, 2007.

HE, X.M; CARTER, D.C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. **Nature**, v. 358, p. 209-215, 1992.

HEINECKE, J. W. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidised low density lipoprotein hypothesis. **Arteriosclerosis**, v. 141, p. 1-15, 1998.

HIROI, S. et al. A. Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 261, p. 332-339, 1999.

HOLVOET, P. et al. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. **Circulation**, v. 98, p. 1487-1494, 1998.

HUANG, J. et al. Role of redox signaling and poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase activation in vascular smooth muscle cell growth inhibition by nitric oxide and peroxynitrite. **J Vasc Surg**, v. 47, p. 599-607, 2008.

ISBIR, S. et al. Effect of Ala16Val genetic polymorphism of MnSOD on antioxidant capacity and inflammatory response in open heart surgery. **In Vivo** v. 22, p.147-151, 2008.

JONES, J.L.; LAKASING, E.; ARCHONTAKIS, S. Familial Hypercholesterolaemia: different perspectives. **Nurs Stand**, v. 50, p. 35-38, 2009.

JORDÃO, A.A. et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Med Rib Preto**, v. 31, p. 434-449, 1998.

JUREK, A. et al. The ability of HDL to inhibit VCAM-1 expression and oxidized LDL uptake is impaired in renal patients. **Clin Biochem**, v. 41, p. 1015-1018, 2008.

KAKKO, S. et al. The signal sequence polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 168, p.147-152, 2003.

KALININA, E. V, CHERNOV, N.N, SAPRIN, A.N. Involvement of thio-, peroxi-, and glutaredoxins in cellular redox-dependent processes. **Biochemistry**, v. 13, p. 1493-1510, 2008.

KAMOUN, P. L. ; ALAIN - VERNEUIL, H. D. **Bioquímica e Biologia Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

KANNEL, W.B.; CASTELLI, W.P.; GORDON, T. Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. **Ann Int Med**, v.90, p.85-91, 1979.

KARADAG, M.K.; AKBULUT, M. Low HDL levels as the most common metabolic syndrome risk factor in heart failure. **Int Heart J**, v. 50, p. 571-580, 2009.

KASAP, S. et al. Serumcardiacmarkers in patientswith acute myocardial infarction: oxidative stress, C-reactive protein and N-terminal probrain natriuretic peptide. **J Clin Biochem Nutr**, v. 41, p. 50-57, 2007.

KASPAROVA, S. et al. Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. **Neurochem Int**, v. 46, p. 601-611, 2005.

KATSIKI, N.; MANES, C.H. Is there a role for supplemented antioxidants in the prevention of atherosclerosis? **Clin Nutr**, v. 28, p. 3-9,2009.

KAWAKAMI A, YOSHIDA M. Apolipoprotein CIII links dyslipidemia with atherosclerosis. **J Atheroscler Thromb**, v. 16, p. 6-11, 2009.

KAZANIS, K. et al. Ischemia modified albumin, high-sensitivity C-reactive protein and natriuretic peptide in patients with coronary atherosclerosis. **Clin Chim Acta**, v. 408, p.65-69, 2009.

KHAWAJA, F.J.; KULLO, I. J. Novel markers of peripheral arterial disease. **Vasc Med**, v.14, p 381-392, 2009.

KINNULA, V. L.; CRAPO, J. D. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. **Free Radic Biol Med**, v. 36, p. 718-744, 2004.

KINSCHERF, R. et al. Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase in macrophages by oxidized LDL: its relevance in atherosclerosis of humans and heritable hyperlipidemia rabbits. **FASEB J**, n. 11, p. 1317-1328, 1997.

KIRMIZIS, D.; CHATZIDIMITRIOU, D. Antiatherogenic effects of vitamin E: the search for the Holy Grail. **Vasc Health Risk Manag**, v. 5, p. 767-74, 2009.

KOKOSZKA, E. J. et al. Increased mitochondrial oxidative stress in the SOD2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increases apoptosis. **PNAS**, n. 98, p. 2278-2283, 2001.

KONDO, T.; HIROSE, M.; KAGEYAMA, K. Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis. **J Atheroscler Thromb**, v. 16, p. 532-538, 2009.

KOTUR-STEVLJEVIC, J. et al. Correlation of oxidative stress parameters and inflammatory markers in coronary artery disease patients. **Clin Biochem**, v. 40, p. 181-187, 2007.

KOUNNAS, M. Z. et al. The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor- related protein binds and internalizes Pseudomonas exotoxin A. **J Biol Chem**, v. 267, p. 12420-12423, 1992.

KRAGH-HANSEN, U. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. **Dan Med Bull**, v. 37, p. 57-84, 1990.

KUBO, T. et al. High-sensitivity C-reactive protein and plaque composition in patients with stable angina pectoris: a virtual histology intravascular ultrasound study. **Coron Artery Dis**, v. 20, p. 531-535, 2009.

KUMAR, A.; CANNON, C.P. Acute coronary syndromes: diagnosis and management, part I. **Mayo Clin Proc**, v.10, p. 917-938, 2009.

KUSUMOTO, F. M. **Fisiopatologia cardiovascular**. México: Novo México, 2001.

LAMACK, J. A.; HIMBURG, H. A.; FRIEDMAN, M. H. Effect of hypercholesterolemia on transendothelial EBD–albumin permeability and lipid accumulation in porcine iliac arteries. **Atherosclerosis**, v. 184, p. 255-263, 2005.

LANDMESSER, U. et al. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure. Role of xanthine oxidase and extracellular superoxide dismutase. **Circulation**, v. 106, p. 3073-3078, 2002.

LEICHTWEIS, S.; JI, L. L. Glutathione deficiency intensifies ischaemia-reperfusion induced cardiac dysfunction and oxidative stress. **Acta Physiol Scand**, v. 179, p. 1-10, 2001.

LEVINI RL, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 464-468, 1990.

LEVITAN, I.; VOLKOV, S.; SUBBAIAH, P.V. Oxidized LDL: Diversity, patterns of recognition and pathophysiology. **Antioxid Redox Signal**, 2009, doi:10.1089/ars.2009.2733 (*in press*).

LEY, K. The role of selectins in inflammation and disease. **Trends Mol Med**, v. 9, p. 263-268, 2003.

LI, H. et al. Manganese superoxide dismutase polymorphism, prediagnostic antioxidant status, and risk of clinical significant prostate cancer. **Cancer Res**, v. 65, p. 2498-2504, 2005.

LIBBY, P. Changing concepts of atherogenesis. **J Int Med Res**, v. 247, p. 349-358, 2000.

LIBBY P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, p. 868-874, 2002.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G.K. Inflammation in Atherosclerosis: From Pathophysiology to Practice. **J Am Coll Cardiol**, v. 54, p. 2129-2138, 2009.

LIU, L. et al. The manganese superoxide dismutase Val16Ala polymorphism is associated with decreased risk of diabetic nephropathy in Chinese patients with type 2 diabetes. **Mol Cell Biochem**, v. 322, p. 87-91, 2009.

LUO, J. **Manganese Superoxide Dismutase**. Free radical and Radiation Biology Program, p. 2-10, 2001.

LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, p. 233-241, 2000.

MADAMANCHI, N.R.; VENDROV, A.; RUNGE, M.S. Oxidative stress and vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, p. 29-38, 2005.

MAISONNEUVE E. et al. Rules governing selective protein carbonylation. **PLoS One**, v.4, p. 7269, 2009.

MANDELKER, L. Introduction to oxidative stress and mitochondrial dysfunction. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 38, p. 1-30, 2008.

MANTHA, S. V.; KALRA, J.; PRASAD, K. Effects of probucol on hypercholesterolemia-induced changes in antioxidant enzymes. **Life Sci**, v. 58, p. 503-509, 1996.

MARANGON, K. et al. Low and very low density lipoprotein composition and resistance to copper-induced oxidation are not notably modified in smokers. **Clin Chim Acta**, v. 265, p. 1-12, 1997.

- MARNETT, L. J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, v. 21, 361-370, 2000.
- MARTIN, M. et al. Complement activation and plasma levels of C4b-binding protein in critical limb ischemia patients. **J Vasc Surg**, v. 50, p.100-106, 2009.
- MARTINS, E.O.; DRAKENBERG, T. Cadmium II, zinc II and copper II ions binding to bovine serum albumin. A ^{113}Cd NMR study. **Inorganic Chim Acta**, v.67, p. 71-74, 1982.
- MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **J Nutr Biochem**, v.16, p. 577-586, 2005.
- MATÉS, J.M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; NÚÑEZ, C.I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin Biochem**, v.32, p. 595-603, 1999.
- MATSUURA, E. et al. Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis. **Prog Lipid Res**, v. 45, p. 466-86, 2006.
- MATTES, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, p. 83-104, 2000.
- MAYNE, S. T. Antioxidants nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **J Nutr**, v. 133, p. 933-940, 2003.
- MCKENNEY, J. Atherosclerosis in a managed care plan: hypercholesterolemia treatment patterns and low-density lipoprotein cholesterol monitoring. **J Clin Lipidol** v. 3, p. 385-392, 2009.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annu Rev Biochem**, v. 52, p. 711-60, 1983.
- MINEO, C. et al. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. **Circ Res**, v. 98, p. 1352-1364, 2006.

MINOR, R.L.J.R. et al. Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. **J Clin Invest**, v.86, p.109-116, 1990.

MONTANO, M.A.E. et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. **Mol Cell Biochem**, v. 328, p. 33-40, 2009.

MOREL, D. W. Reduced cholesterol efflux to mildly oxidized high density lipoprotein. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 200, p.408-416, 1994.

MOSCA, M. et al. Antioxidant nutrient supplementation reduces the susceptibility of low density lipoprotein to oxidation in patients with coronary artery disease. **J Am Coll Cardiol**, v.30, n.2, p. 392-9, 1997.

MOTHES, E.; FALLER, P. Evidence that the principal coil-binding site in human serum albumin is not at the N-terminus: implication on the albumin cobalt binding test for detecting myocardial ischemia. **Biochem**, v. 46, n. 8, p. 2267-2274, 2007.

MULLER, G.; MORAWIETZ, H. Nitric oxide, NAD(P)H oxidase and atherosclerosis. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, p. 1711-1731, 2009.

NAGAYOSHI, Y. et al. Differences in oxidative stress markers based on the aetiology of heart failure: Comparison of oxidative stress in patients with and without coronary artery disease. **Free Radic Res**, v. 43, p. 1159-1166, 2009.

NAKANISHI, S. et al. Manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism is associated with the development of type 2 diabetes in Japanese-Americans. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 81, p. 381-385, 2008.

NELSON, S. et al. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: a fundamentally new approach to antioxidant therapy. **Free Radic Biol Med**, v. 40, p. 341-347, 2006.

NG, C. J. et al. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. **Free Radic Biol Med**, v. 38, p. 153-163, 2005.

NINIO, E. Phospholipid mediators in the vessel wall: involvement in atherosclerosis. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 8, p. 123-131, 2005.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NOZAL, M. J. et al. Determination of glutathione, cysteine and N-acetylcysteine in rabbit eye tissues using high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with 5-5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). **J Chromatogr A**, v. 778, p. 347-353, 1997.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

OGUNRO, P.S. et. al. Plasma lipid peroxidation and total antioxidant status among dyslipidaemic and hypertensive Nigerians with high risk of coronary heart disease. **West Afr J Med**, v. 28, p. 87-91, 2009.

OH, S. et al. Anti-obesity agents: a focused review on the structural classification of therapeutic entities. **Curr Top Med Chem**, v. 9, p. 466-481, 2009.

OSIPOV, R.M. et al. Effect of hypercholesterolemia on myocardial necrosis and apoptosis in the setting of ischemia-reperfusion. **Circulation**, v. 120, p.S22- S30, 2009.

PACKARD, R.R.S.; LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. **Clin Chem**, v. 54, p. 24-38, 2008.

PARK, Y.Y. Ischemia/reperfusion lung injury increases serum ferritin and heme oxygenase-1 in rats. **J Physiol Pharmacol**, v.13, p.181-187, 2009.

PATEL, S. et al. The "atheroprotective" mediators apolipoprotein A-I and Foxp3 are over-abundant in unstable carotid plaques. **Int J Cardiol**, 2009 doi:10.1016/j.ijcard.2009.05.024 (*in press*).

PEASE, R. J.; LEIPER, J. M. Regulation of hepatic apolipoprotein-B-containing lipoprotein secretion. **Current Opin Lipidol**, v. 7, p. 132-138, 1996.

PENGO, V. et al. Antibodies to oxidized LDL/ β 2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome patients with venous and arterial thromboembolism. **Thromb Res**, v. 122, p.556-559, 2008.

PERSSON, J.; NILSSON, J.; LINDHOLM, M. W. Cytokine response to lipoprotein lipid loading in human monocyte-derived macrophages. **Lipids Health Dis**, v. 5, n. 17, p. 1–8, 2006.

PETOUMENOS, V.; NICKENIG, G.; WERNER, N. High density lipoprotein exerts vasculoprotection via endothelial progenitor cells. **J Cell Mol Med**, v. 12, n. 4, p. 1582-1588, 2008.

PILKA, E. S. et al. Structural basis for substrate specificity in human monomeric carbonyl reductases. **PLoS One**, v. 4, p. 7113-7123, 2009.

PIWOWAR, A.; KNAPIK-KORDECKA, M.; WARWAS, M. Ischemia-modified albumin level in type 2 diabetes mellitus-Preliminary report. **Dis Markers**, v. 24, p. 311-317, 2008.

POLI, G. et al. Cholesterol oxidation products in the vascular remodeling due to atherosclerosis. **Mol Aspects Med**, v. 30, p.180-189, 2009.

POLK, J.D. et al. Clinical utility of the cobalt-albumin binding assay in the diagnosis of intestinal ischemia. **J Trauma**, v. 64, p. 42-45; 2008.

POSTADZHIYAN, A.S. et al. Circulating soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and their association with clinical outcome, troponin T and C-reactive protein in patients with acute coronary syndromes. **Clin Biochem**, v. 41, p.126-133, 2008.

PRASAD, K.; KALRA, J. Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis. **Am Heart J**, v. 125, p. 958-971, 1993.

PRASAD, K. C-reactive protein (CRP)-lowering agents **Cardiovasc Drug Rev**, v. 24, p. 33-50, 2006.

PRYOR, W.A. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. **Free Radic Biol Med**, v. 28, p. 141-164, 2000.

QIAO, M. et al. Thiol oxidative stress induced by metabolic disorders amplifies macrophage chemotactic responses and accelerates atherogenesis and kidney injury in ldl receptor-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, p. 1779-1786, 2009.

QUINLAN, G.J.; MARTIN, G.S.; EVANS, T.W. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. **Hepatology**, v. 41, p.1211-1219, 2005.

RAY, J. G.; ROSENDAAL, F. R. The role of dyslipidemia and statins in venous thromboembolism. **Curr Control Trials Cardiovasc Med**, v. 2, p. 165-170, 2001.

REAL, J.T. et al. Increased oxidative stress levels and normal antioxidant enzyme activity in circulating mononuclear cells from patients of familial hypercholesterolemia. **Metabolism**, v. 59, p. 293-298, 2009.

REIFENBERG, K. et al. Role of C-reactive protein in atherogenesis: can the apolipoprotein E knockout mouse provide the answer? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, p.1641-1646, 2005.

REPINE, J. E. Oxidant – antioxidant balance: some observations from studies of ischemia–reperfusion in isolated perfused rat hearts. **Am J Med**, v. 91, p. 45-53, 1991.

RETSKY, K.L. et al. Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. **Free Radic Biol Med**, v. 26, p. 90-98, 1999.

RIDKER, P.M. et al. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. **N Engl J Med**, v. 342, p. 836-843, 2000.

RIDKER, P.M. Testing the inflammatory hypothesis of atherothrombosis: scientific rationale for the cardiovascular inflammation reduction trial (CIRT). **J Thromb Haemost**, v. 7, p. 332-339, 2009.

ROBBINS, S.L. **Fundamentos de Robbins - Patologia Estrutural e Funcional**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

ROCHA, V.Z.; LYBBY, P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. **Nat Rev Cardiol**, v. 6, 399-409, 2009.

RODRIGUEZ-PORCEL, M. et al. Hypercholesterolemia impairs myocardial perfusion and permeability: role of oxidative stress and endogenous scavenging activity. **J Am Coll Cardiol**, v. 37, p. 608-615, 2001.

ROSENBLUM, J. S.; GILULA, N. B.; LERNER, R. A. On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, p. 4471-4473, 1996.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. **Antioxidants defense system and oxidative stress**. In: VIGO-PELFREY (Ed). Membrane lipid oxidation. Boca Raton: CRC, p.151-170, 1991.

ROSS, R. Atherosclerosis is in inflammatory disease. **Am Heart J**, v. 138, p. 419-420, 1999.

SALONEN, J. T. et al. Antioxidant supplementation in atherosclerosis prevention (ASAP) study: a randomized trial of the effect of vitamins E and C on 3-year progression of carotid atherosclerosis. **J Int Med Res**, v. 248, p. 377-386, 2001.

SBAROUNI, E. et al. Ischemia-modified albumin in relation to exercise stress testing. **J Am Coll Cardiol**, v. 48, p. 2482-2484, 2006.

SCALIA, R.; APPEL, J. Z.; LEFER, A. M. Leukocyte-endothelium interaction during the early stages of hypercholesterolemia in the rabbit: role of P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 18, p. 1093-1100, 1998.

SCHWARTZ, G.G. High-density lipoprotein cholesterol as a risk factor and target of therapy after acute coronary syndrome. **Am J Cardiol**, v. 104, p. 46E-51E, 2009.

SCHWENKE, D. C. et al. Differences in LDL oxidizability by glycemic status: the insulin resistance atherosclerosis study. **Diabetes Care**, v. 26, p. 1449-1455, 2003.

SEETHARAM, D. et al. High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I. **Circ Res**, v. 98, p. 63-72, 2006.

SEIXAS-CAMBÃO, M.; LEITE-MOREIRA, A.F. Pathophysiology of chronic heart failure. **Rev Port Cardiol**, v.28, p. 439-471, 2009.

SEIZI, O. **Fundamentos de Toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Ateneu, 2003.

SEO, D.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. **Curr Atheroscler Rep**, v. 11, p. 182-187, 2009.

SERDAR, Z. et al. A. Lipid and protein oxidation and antioxidant status in patients with angiographically proven coronary artery disease. **Clin Biochem**, v. 39, p. 794-803, 2006.

SHAO, B.; HEINECKE, J.W. HDL, lipid peroxidation, and atherosclerosis. **J Lipid Res**, v. 50, p. 599-601, 2009.

SHAW, P.X. et al. Human derived anti oxidized LDL autoantibody blocks uptake of oxidized LDL by macrophages and localizes to atherosclerotic lesions in vivo. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, p.1333-1339, 2001.

SHIMIZU, H. et al. Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study. **Stroke**, v. 35, p. 2072-2077, 2004.

SHIMODA-MATSUBAYASHI, S. et al. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 226, p. 561-565, 1996.

SKALEN, K. et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. **Nature**, v. 417, p. 750-754, 2002.

SKILTON, M.R. et al. A comparison of the NCEP-ATPIII, IDF and AHA/NHLBI metabolic syndrome definitions with relation to early carotid atherosclerosis in subjects with hypercholesterolemia or at risk of CVD: evidence for sex-specific differences. **Atherosclerosis**, v. 190, p. 414-422, 2007.

SMITH, C.; MARKS, A.; LIEBERMAN, M. **Mark's Basic Medical Biochemistry – A Clinical Approach**. 2th ed. Baltimore:Lippincott Williams & Wilkins,2007.

SORENSEN, L.; GORMSEN, L.; NIELSEN, S. VLDL-TG kinetics: a dual isotope study for quantifying VLDL-TG pool size, production rates and fractional oxidation in humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 297, p. E1324-E1330, 2009.

SPIEKER, L.E. et al. High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. **Circulation**, v. 105, p.1399-1402, 2002.

STADTMAN, E. R. Role of oxidant species in aging. **Curr Med Chem**, v. 11, p. 1105-1112, 2004.

STAMPFER, M.J.; RIMM, E. B. Epidemiologic evidence for vitamin E in prevention of cardiovascular disease. **Am J Clin Nutr**, v.62, p.1365S-1369S, 1995.

STEWART, A. J. et al. Bioinorganic chemistry special feature: interdomain zinc site on human albumin. **PNAS**, v. 100, p. 3701-3706, 2003.

STOKES, K.Y. et al. The role of T-lymphocytes in hypercholesterolemia-induced leukocyte-endothelial interactions. **Microcirculation**, v.9, p. 407-417, 2002.

STOKES, K.Y.; GURWARA, S.; GRANGER, D.N. T-cell-derived interferon-gamma contributes to arteriolar dysfunction during acute hypercholesterolemia.

SUN, Y. et al. Protective mechanism of complex vitamin B and GSH on fatty liver. **Wei Sheng Yan Jiu**, v. 38, p. 413-416, 2009.

SUTTON, A. et al. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. **Pharmacogenetics**, v. 13, p.145-57, 2003.

TASOULIS, M.K. et al. High concentrations of reactive oxygen species in the BAL fluid are correlated with lung injury in rabbits after hemorrhagic shock and resuscitation. **Tohoku J Exp Med**, v. 219, p.193-199, 2009.

TAUFER, M. et al. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 60, p. 432-438, 2005.

TCHOUA, U.; GILLARD, B.K.; POWNALL, H.J. HDL superphospholipidation enhances key steps in reverse cholesterol transport. **Atherosclerosis**, 2009, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.10.002 (*in press*).

TEMPLE, M. D.; PERRONE, G. G.; DAWES, I. W. Complex cellular responses to reactive oxygen species. **Trends Cell Biol**, v.15, p. 319-326, 2005.

THOMAS, S.R.; WITTING, P.K.; DRUMMOND, G.R. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, p. 1713-1765, 2008.

TINAHONES, F.J. et al. Influence of age and sex on levels of anti-oxidized LDL antibodies and anti-LDL immune complexes in the general population. **J Lipid Res**, v. 3, p. 452-457, 2005.

TOUSOULIS, D. et al. Inflammatory and thrombotic mechanisms in coronary atherosclerosis. **Heart**, v. 89, p. 993-997, 2003.

TOUSOULIS, D.; CHARAKIDA, M.; STEFANADIS, C. Endothelial function and inflammation in coronary artery disease. **Heart**, v. 92, p. 441-444, 2006.

TOYOKUNI, S. Molecular mechanisms of oxidative stress-induced carcinogenesis: from epidemiology to oxygenomics. **IUBMB Life**, v. 60, p. 441-447, 2008.

TUREDİ, S. et al. The value of ischemia-modified albumin compared with d-dimer in the diagnosis of pulmonary embolism. **Respir Res**, v. 9, p. 49-61, 2008.

TUREDİ, S. et al. Ischemia-modified albumin in the diagnosis of pulmonary embolism: an experimental study. **Am J Emerg Med**, v. 27, 635-640, 2009.

UKINC, K. et al. A novel indicator of widespread endothelial damage and ischemia in diabetic patients: ischemia-modified albumin. **Endocrine**, v. 36, p. 425-432, 2009.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VAN DER ZEE, P. M. et al. Ischemia-modified albumin measurements in symptom-limited exercise myocardial perfusion scintigraphy reflect serum albumin concentrations but not myocardial ischemia. **Clin Chem**, v. 51, p. 1744-1746, 2005.

VAN ECK, M. et al. Increased oxidative stress in scavenger receptor BI knockout mice with dysfunctional HDL. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, p. 2413-2419, 2007.

VASSALLE, C et al. An oxidative stress score as a combined measure of the pro-oxidant and anti-oxidant counterparts in patients with coronary artery disease. **Clin Biochem**, v. 41, p. 1162-1167, 2008.

VERMA, S.; WANG, C. H.; LI, S. H. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. **Circulation**, v.106, p. 913-919, 2002.

VERMA, S.; SZMITKO, P. E.; YEH, E. T. H. C-reactive protein: structure affects function. **Circulation**, v.109, p. 1914-1917, 2004.

VICTOR, V. M. et al. oxidative stress and mitochondrial dysfunction in atherosclerosis: mitochondria-targeted antioxidants as potential therapy. **Curr Med Chem**, v. 9, p. 376-389, 2009.

WADHAM, C. et al. High-density lipoproteins neutralize C-reactive protein proinflammatory activity. **Circulation**, v. 109, p. 2116-2122, 2004.

WALTER, M.F. et al. Serum levels of thiobarbituric acid reactive substances predict cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease: a longitudinal analysis of the prevent study. **J Am Coll Cardiol**, v. 44, p.1996-2002, 2004.

WAN, X. S.; DEVALARAJA, M. N.; ST CLAIR, D. K. Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. **DNA Cell Biol**, v.13, p.1127-1136, 1994.

WARNHOLTZ, A. et al. Clinical aspects of reactive oxygen and nitrogen species. **Biochem Soc Symp**, v. 71, p. 121-133, 2004.

WASSMANN, S.; WASSMANN, K.; NICKENIG, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. **Hypertension** v. 40, p. 381-386, 2004.

WHICHER, J.; SPENCE, C. When is serum albumin worth measuring? **Ann Clin Biochem**, v. 24. p. 572-580, 1987.

WILSIE, L. C.; GONZALES, A. M.; ORLANDO, R. A. Syndecan-1 mediates internalization of apoE-VLDL through a low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)-independent, non-clathrin-mediated pathway. **Lipids Health Dis**, v. 5, n. 23, p. 1-8, 2006.

WISPE, J. R. et al. Synthesis and processing of the precursor for human manganese-superoxide dismutase. **Biochem Biophys Acta**, v. 994, p. 30-36, 1989.

WOLBERG, A.S.; MACKMAN, N. Venous thromboembolism: risk factors, biomarkers, and treatment. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, p. 296-297, 2009.

XU, Y. et al. Formation of hydrogen peroxide and reduction of peroxynitrite via dismutation of superoxide at reperfusion enhances myocardial blood flow and oxygen consumption in postischemic mouse. **Heart J Pharmacol Exp Ther**, v. 327, p. 402-410, 2008.

YAMAGISHI, S. I. et al. Hyperglycemia potentiates collagen induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. **Diabetes**, n. 50, p. 1491-1494, 2001.

YAMAMOTO, Y. et al. Oxidative stress in patients with hepatitis, cirrhosis, and hepatoma evaluated by plasma antioxidants. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 247, p. 166-170, 1998.

YANG, R.L. et al. Increasing in oxidative stress with progressive hyperlipidemia in human: relation between malondialdehyde and atherogenic index. **J Clin Biochem Nutr**, v. 43, p.154-158, 2008.

YOKOYAMA, S. Assembly of high-density lipoprotein. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, p. 20-27, 2006.

YOU, W.C. et al. Gastric cancer: Helicobacter pylori, serum vitamin C, and other risk factors. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, 1607-1612, 2000.

ZEDÁK, Z. et al. Antioxidants and vitamins in clinical conditions. **Physiol Res**, v. 58, p.13-17, 2009.

ZELKO, I. N.; MARIANI, J. T.; FOLZ, J. R. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. **Free Radic Biol Med**, v. 33, p.337-349, 2002.

ZENETTI, M. et al. Gene transfer of manganese superoxide dismutase reverses vascular dysfunction in the absence but not in the presence of atherosclerotic plaque. **Hum Gene Ther**, n.12, p. 1407-1416, 2001.

ZOU, Y.; LU, Y.; WEI, D. Hypocholesterolemic effects of a flavonoid-rich extract of Hypericum perforatum L. in rats fed a cholesterol-rich diet. **J Agric Food Chem**, v. 53, p. 2462-2466, 2005.

ANEXO

Anexo 01 - Demais trabalhos realizados durante o curso de doutorado:

1. Chicota L.C; Moresco, R. N.; Duarte, M. M. M. F.; Silva, J. E. P. Evaluation of Ischemia-Modified Albumin in Anemia Associated to Chronic Kidney Disease. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 22, p. 1-5, 2008.
2. Duarte, Marta M.M.F.; Rocha, João B.T.; Moresco, Rafael N.; Duarte, Thiago; Da Cruz, Ivana B.M.; Loro, Vânia L.; Schetinger, Maria R.C.. Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. *Clinical Biochemistry*, v. 42, p. 666-671, 2009.
3. Dorneles, A. ; Menezes, Charlene ; Speroto, R. L. ; Duarte, M. M. M. F. ; Morsch, Vera Maria ; Schetinger, Maria Rosa Chitolina ; Loro, V. L. . Adenine Nucleotide Hydrolysis in Patients with Aseptic and Bacterial Meningitis. *Neurochemical Research*, v. 34, p. 463-469, 2009.
4. Menezes, Charlene Cavaleiro ; Dorneles, Aracélli Gnatta ; Sperotto, Rita Leal ; Duarte, M. M. M. F. ; Schetinger, Maria Rosa Chitolina ; Loro, Vania Lúcia . Oxidative Stress in Cerebrospinal Fluid of Patients with Aseptic and Bacterial Meningitis. *Neurochemical Research*, p. 1169-1173, 2009.
5. De Bem, Andreza Fabro; De Lima Portella, Rafael; Colpo, Elisângela; Duarte, M. M. M. F. ; Frediane, Andressa ; Taube, Paulo Sergio ; Nogueira, Cristina Wayne ; Farina, Marcelo ; Da Silva, Edson Luiz ; Teixeira Rocha, João Batista . Diphenyl Diselenide Decreases Serum Levels of Total Cholesterol and Tissue Oxidative Stress in Cholesterol-fed Rabbits. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, p. 01-07, 2009.

6. Thomé, G.R. ; Mazzanti, C.M. ; Ahmed, M. ; Corrêa, M. ; Spanevello, R.M. ; Maldonado, P.A. ; Luchese, C. ; Cargnelutti, D. ; Morsch, V.M. ; Duarte, Marta Maria Medeiros Frescura ; Fiorenza, A.M. ; Nogueira, C.W. ; De Bona, K.S. ; Moretto, M.B. ; Da Luz, S.C.A. ; Mazzanti, A. ; Schetinger, M. R. C. . Activity of ectonucleotidases and adenosine deaminase in rats exposed to cigarette smoke. *Inhalation Toxicology*, v. 21, p. 906-912, 2009.
7. Sauzem, Patricia D. ; Sant& ; Machado, Pablo ; Duarte, Marta M.M.F. ; Ferreira, Juliano ; Mello, Carlos F. ; Beck, Paulo ; Bonacorso, Helio G. ; Zanatta, Nilo ; Martins, Marcos A.P. . Effect of 5-trifluoromethyl-4, 5-dihydro-1H-pyrazoles on chronic inflammatory pain model in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 616, p. 91-100, 2009.
8. Manica-Cattani, M.F.; Bittencourt, L.; Rocha, M.I.U. ; Algarve, T.D.; Bodanese, L.C.; Rech, R.; Machado, M.M.; Santos, G.F.F.; Gottlieb, M.G.V.; Schwanke, C.H.A.; Duarte, M. M. M. F.; Da Cruz, Ivana B.M.. Association Between Interleukin-1 Beta Polymorphism (+3953) and Obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 314, p. 84-89, 2009.
9. Gottlieb, M. G. V.; Alves, J. ; Da Cruz, I. B. M.; Duarte, M. M. M. F.; Moresco, R. N.; Wiehe, M.; Schwanke, C. H. A.; Bodanese, L. C. Association among metabolic syndrome, ischemia, inflammatory, oxidatives and lipids biomarkers. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2010.
10. Kaefer, M.; Piva, S. J. ; De Carvalho, J. A. M.; Silva, D. B.; Becker, A. M.; Coelho, A. C.; Duarte, M. M. M. F.; Moresco, R. N. Association between ischemia modified albumin, inflammation and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Clinical Biochemistry*, 2010.