

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM LABORATÓRIO CLÍNICO II

**Metodologias para determinação da lipoproteína de baixa
densidade oxidada (LDL-ox) como marcador de risco cardiovascular**

**Assay methods oxidized low density lipoprotein (LDL-ox) as a marker of
cardiovascular risk**

Michele Duarte¹ & Andreza Fabro de Bem²

¹ Farmacêutica Bioquímica - Aluna do Curso de Especialização em Laboratório Clínico –

² Professora de Bioquímica Clínica - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas –
Universidade Federal de Santa Maria - RS

RESUMO: Atualmente, acredita-se que as doenças inflamatórias estão fortemente ligadas a condição de estresse oxidativo. Dentre elas, uma das mais estudadas é a aterosclerose. A aterosclerose é uma doença de grande importância mundial, devido a alta mortalidade resultante de condições clínicas decorrentes da doença, como o infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular cerebral. As lipoproteínas oxidadas, especialmente a lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox), estão presentes no plasma de pacientes com aterosclerose. Estudos demonstram que a modificação da LDL é um fator importante no desenvolvimento da doença. Por isso, a determinação da LDL-ox plasmática é essencial não apenas para investigar sua relevância para as doenças cardiovasculares, mas também como um auxiliar no diagnóstico destas doenças. Estudos sobre a susceptibilidade da LDL à oxidação, dosagens bioquímicas de produtos da oxidação da LDL, ensaios imunológicos para a pesquisa da LDL-ox e de anticorpos anti LDL-ox tem sido utilizados como marcadores de risco para desenvolvimento de aterosclerose, e conseqüentemente, de eventos cardíacos e vasculares graves. Este trabalho discute brevemente alguns métodos de avaliação da oxidação da LDL.

Palavras Chaves: aterosclerose, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox), métodos.

ABSTRACT: Currently, the inflammatory disorders are believe to strongly correlate with the condition of oxidative stress. Amongst them, one of the most studied is atherosclerosis. Atherosclerosis is a disease of great world-wide importance, due to the high mortality of decurrently clinical conditions of the illness, as acute myocardial infarction and stroke. The oxidized lipoproteins, especially the oxidized low density lipoprotein (LDL-ox), are present in the plasma of patients with atherosclerosis. Studies have demonstrated that the modification of the LDL is an important factor in the development of the illness. Therefore, the determination of the plasma LDL-ox is essential not only to investigate its relevance for the atherosclerotic diseases, but also to help in the diagnosis of these illness. Studies of the susceptibility of the LDL to oxidation, measurements of LDL oxidation products, immunological assays to research LDL-ox and antibodies against LDL-ox have been carried through as markers of risk for development of atherosclerosis, and consequently, of serious cardiac and vascular events. This work briefly argues some methods of evaluation of the oxidation of the LDL.

Key words: atherosclerosis, low density lipoprotein (LDL), oxidized low density lipoprotein (LDL-ox), methods.

1. INTRODUÇÃO

Pequenas quantidades de radicais livres de oxigênio são constantemente formadas em resposta a estímulos externos e internos nos organismos aeróbicos.^[1-3] Uma produção elevada de radicais livres pode levar a um desequilíbrio, principalmente quando o sistema antioxidante natural não é eficiente em eliminar este excesso de produção, podendo ocorrer então o chamado estresse oxidativo. A associação entre o excesso de espécies reativas de oxigênio e doenças inflamatórias, doenças autoimunes, aterosclerose e doenças neurológicas degenerativas, como, por exemplo, Esquizofrenia^[4,5], Síndrome de Down^[6], Mal de Alzheimer^[7] e Doença de Parkinson^[8,9] é bem reconhecida atualmente, sendo o mecanismo de injúria celular o mais aceito para explicar esta correlação.

A aterosclerose é uma das doenças mais estudadas atualmente, e tem sua patogênese altamente ligada a condição de estresse oxidativo. É uma doença multifatorial e progressiva que afeta a parede dos vasos sanguíneos e que pode levar a complicações importantes, sendo as mais conhecidas o infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral, enfermidades agudas, além da doença vascular periférica, de natureza crônica.^[10,11]

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morbidade e mortalidade nos países ocidentais^[12-14], do mesmo modo no Brasil, são responsáveis por 25% dos óbitos, vitimando 250.000 pessoas por ano^[15]. Números dos Estados Unidos da América demonstram que a aterosclerose é o principal fator de risco para acidente vascular cerebral, e este é a terceira maior causa de morte no país.^[12-14]

Por ser uma doença de grande importância e prevalência mundial, a aterosclerose tem sido exaustivamente investigada ao longo dos anos. A teoria mais aceita para explicar sua patogênese é a hipótese oxidativa. Existem grandes evidências do importante papel da lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox) na etiologia da aterosclerose^[16-18]. A teoria oxidativa diz que os lipídeos circulantes, principalmente a LDL, podem penetrar no endotélio das artérias e, ao entrar, sofrem modificações oxidativas por produtos metabólicos, radicais livres de oxigênio e enzimas produzidos pelas células vasculares (macrófagos, células endoteliais e musculares lisas)^[19], processo este catalisado pela presença de metais de transição, como ferro e cobre.^[20-21]

A modificação oxidativa da LDL acontece na íntima do vaso e parece ocorrer em duas fases. Na primeira fase, ou fase inflamatória, os lipídeos da LDL sofrem oxidação, sem que ocorram grandes modificações na apolipoproteína B, o que resulta na formação da LDL minimamente oxidada (LDL-ox min) [22]. Nesta fase, a LDL-ox min contribui para o estado inflamatório da parede vascular, pois pode recrutar monócitos circulantes através do aumento da expressão de glicoproteínas de adesão da superfície das células. Os monócitos então se aderem à superfície da parede vascular e outras moléculas específicas (proteína quimiotática específica, proteína-1 quimiotática monocitária) podem atraí-los para o espaço subendotelial, onde se diferenciam em macrófagos [23]. Na camada íntima do vaso as partículas de LDL-ox min podem sofrer intensiva oxidação por espécies reativas de oxigênio (ERO) e enzimas produzidas pelos macrófagos, como a mieloperoxidase e a lipoxigenase, transformando-as em LDL altamente oxidada (LDL-ox), caracterizando assim, a segunda fase da modificação oxidativa da LDL [24] (Figura 1). Nesta fase, surgem produtos de decomposição lipídica, os quais podem reagir com resíduos de lisina da apolipoproteína-B, modificando-os, o que torna a LDL mais eletronegativa. [25,26]

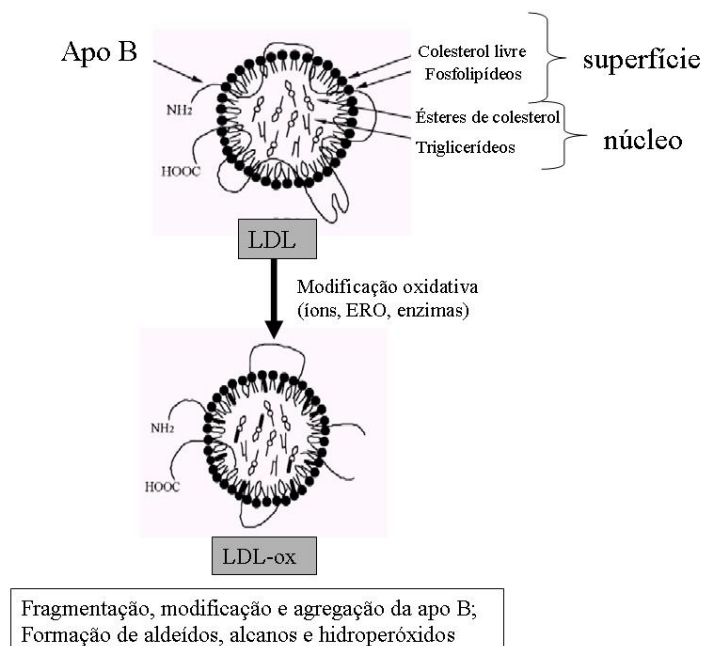


Figura 1: Dano oxidativo afeta os componentes lipídicos e protéicos da LDL. Adaptado de Yamaguchi et al., 2002.

A oxidação da LDL é inibida pela lipoproteína de alta densidade (HDL), a qual contém propriedades antioxidantes. [24]

As LDL-ox passam a ser reconhecidas pelos receptores do tipo scavenger dos macrófagos, que não são regulados pelo conteúdo celular de colesterol [27,28]. Ocorre captação indiscriminada de LDL-ox e acúmulo maciço de colesterol nos macrófagos, formando-se as células espumosas [29,30]. Após essa fase inicial, desenvolvem-se as estrias gordurosas, que se caracterizam pelo acúmulo de células espumosas e lipídeos extracelulares, levando à inflamação e espessamento da parede arterial [31], além disso, acontece a migração de células musculares da camada média da parede vascular para a íntima, estimulada pelos fatores de crescimento derivados das plaquetas, fator de crescimento derivado do fibroblasto e fator de crescimento *b*. A estria gordurosa é a lesão inicial da aterosclerose, que pode progredir, e a medida que isso acontece, forma-se uma capa fibrosa que envolve as células espumosas, leucócitos, lipídeos e células musculares lisas no centro da lesão. [32]

Diferentes mediadores inflamatórios são liberados no espaço intimal, perpetuando e ampliando o processo, levando finalmente à formação da placa aterosclerótica. As placas podem ser divididas em estáveis ou instáveis [32]. As mais instáveis, portanto mais propensas à ruptura, possuem alto conteúdo lipídico em seu interior [33-34]. A fissura e o rompimento de placas instáveis pode levar à formação de trombos, responsáveis muitas vezes pelos acidentes vasculares e pelos infartos [35,36], conseqüências mais graves da aterosclerose.

Além de contribuir significativamente para o surgimento das células espumosas, a LDL-ox possui várias outras atividades pró-aterogênicas, dentre elas: formação de intermediários e produtos finais da reação de oxidação que são citotóxicos para células da parede vascular, causando não só a morte celular por necrose, devido a lipoperoxidação de componentes da célula [37-38], como também a apoptose [39]; induz e perpetua o estado inflamatório no local de seu acúmulo, por ser quimiotática para monócitos e por aumentar a expressão de gens das células endoteliais que sintetizam substâncias responsáveis por recrutar monócitos [40-43]; favorece a secreção de interleucina-1 pelos monócitos, o que aumenta a proliferação de células musculares lisas na lesão [44].

Somam-se a estes efeitos, o aumento na disfunção endotelial, a indução da agregação plaquetária e a formação de trombos e a desestabilização das placas ateromatosas, por mecanismos que incluem a expressão de metaloproteínas, todos promovidos pela LDL-ox^[45].

A reação de lipoperoxidação em cadeia dos lipídeos da LDL tem sido muito utilizada em métodos experimentais que visam avaliar a oxidação da LDL in vitro, deste modo inferindo seu estado oxidativo in vivo. Valendo-se desta reação facilmente induzida pela presença de metais, é possível quantificar e qualificar a cinética da modificação oxidativa da LDL, bem como dosar os produtos formados no processo de lipoperoxidação, como o malondialdeído (MDA) e outros, os quais podem ser utilizados como marcadores do estado oxidativo da LDL. Deste modo, é possível sugerir o uso do estado oxidativo da LDL como um dado adicional para a avaliação do risco de aterosclerose e doenças cardiovasculares.

Este trabalho enumera algumas metodologias que avaliam a oxidação de LDL in vivo e in vitro, bem como discute sua possível utilização clínica e experimental.

2. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO DA LDL

Para avaliar a oxidação da LDL, como um primeiro passo, faz-se necessário o isolamento desta lipoproteína. O isolamento é geralmente feito através da ultracentrifugação das amostras, que utiliza o gradiente de densidade das lipoproteínas para separá-las em bandas.^[46]

2.1. Susceptibilidade da LDL à oxidação: Medida de dienos conjugados:

Este método permite avaliar a oxidação lipídica através do acompanhamento da cinética da reação de formação de dienos conjugados durante a oxidação da LDL, monitorando continuamente a mudança na absorbância da amostra no comprimento de onda de 234 nm. Para iniciar o processo de oxidação é utilizada a incubação da LDL com íons de metais de transição, como o cobre. A oxidação não ocorre instantaneamente, e o

tempo decorrido entre a adição dos íons e o início da formação dos dienos é chamado de fase lag e pode ser utilizado como um parâmetro do estado oxidativo inicial da LDL. ^[47]

A fase lag é medida em minutos e a susceptibilidade da LDL à oxidação pode ser inferida pela duração desta fase, pois quanto mais curta esta fase, maior a susceptibilidade da LDL à oxidação ^[47], o que se reflete também in vivo. ^[48,49]

Outros parâmetros podem ser utilizados a fim de se averiguar a oxidação da LDL por este método, como a medida da absorvância inicial da amostra em 234nm e a razão da oxidação por hora, expressa como a produção de dienos conjugados por minuto por miligrama de proteína de LDL, durante a fase de propagação da reação. Além destes, podem ser também aferidos outros índices, como a quantidade máxima de dienos formada e o tempo necessário para a formação dessa quantidade máxima de dienos. ^[50] Todos estes parâmetros poderiam auxiliar na determinação do estado oxidativo da LDL.

Experimentalmente, estes dados são utilizados como parâmetros de comparação em populações estudadas ^[51,52], mas o tempo requerido para se fazer este teste e a dificuldade de padronização existente torna difícil o emprego deste método na rotina clínica laboratorial. ^[53]

2.2. Modificação da mobilidade eletroforética:

Durante a oxidação da LDL, formas mais eletronegativas da lipoproteína surgem devido a reação de grupos amino de resíduos de lisina da apoB com aldeídos, produtos finais da peroxidação de ácidos graxos polinsaturados. ^[54]

Valendo-se da diferença na mobilidade eletroforética existente entre a LDL e a LDL-ox é possível avaliar a oxidação da LDL através de várias técnicas de eletroforese, com sensibilidade e especificidade diferentes. ^[53]

A eletroforese fornece um parâmetro qualitativo da oxidação da LDL pois avalia sua modificação durante o processo de oxidação, o que pode ser um aspecto vantajoso do uso deste método, com relação a outros que utilizam parâmetros quantitativos, mais sujeitos a erros. ^[53]

Além do aumento na mobilidade da LDL, a oxidação também produz fragmentação protéica na lipoproteína, causando bandas mais dispersas ^[55], outro parâmetro útil para determinar a oxidação da LDL através da eletroforese.

Muitos estudos utilizam diferentes técnicas de eletroforese de LDL para avaliar a oxidação desta lipoproteína em grupos de indivíduos, como por exemplo, em crianças e adolescentes hipercolesterolêmicos ^[56] e em diabéticos tipo II ^[57].

2.3. Dosagem de produtos da peroxidação lipídica:

Estes marcadores são amplamente usados na determinação do estresse oxidativo através da avaliação da peroxidação lipídica, baseando-se na determinação da concentração dos produtos mais estáveis resultantes desta reação. ^[58]

2.3.1. Dosagem de hidroperóxidos lipídicos:

Dentre os vários produtos de degradação e decomposição resultantes da reação de oxidação da LDL, os primeiros a se formarem são os hidroperóxidos lipídicos, e sua dosagem também pode ser feita para aferir o estado oxidativo da LDL. ^[58]

O conteúdo ou acúmulo de hidroperóxidos lipídicos em uma amostra pode ser aferido usando técnicas espectrofotométricas, onde o produto da reação dos hidroperóxidos com reagentes, como por exemplo FOX, desenvolvido por Wolff et al. ^[59] pode ser dosado. O resultado pode ser expresso em uma razão hidroperóxidos lipídicos/concentração de colesterol na amostra. ^[53]

Outra técnica de dosagem de hidroperóxidos lipídicos também usa a espectrofotometria para a leitura dos resultados, porém utiliza a reação dos hidroperóxidos com um sistema enzimático de glutathione peroxidase/glutathione reduzida e NADPH. São feitas duas medidas de absorbância em 340 nm, uma anterior à reação e uma posterior, visando determinar o decréscimo da absorbância, devido a oxidação do NADPH neste comprimento de onda. ^[50,60]

Este método é amplamente utilizado, sozinho ou em conjunto com outros métodos, por ensaios científicos publicados recentemente, com o objetivo de avaliar indiretamente a oxidação da LDL em diversas amostras biológicas. ^[50, 58]

2.3.2. Dosagem de malondialdeído (MDA):

O malondialdeído (MDA), composto de três carbonos, é um dos principais produtos finais da peroxidação lipídica de ácidos graxos polinsaturados (principalmente ácido

aracldônico) e seus ésteres, sendo formado pela cisão destes ácidos graxos, após a peroxidação. [61]

O MDA é o marcador para determinar peroxidação lipídica mais amplamente utilizado atualmente [62] e o método para sua dosagem geralmente se baseia na reação clássica do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um complexo colorido, de absorvância máxima no comprimento de onda de 532 nm. [63]

A técnica espectrofotométrica é a mais empregada para determinar a concentração de MDA em amostras biológicas [64], mas existem algumas limitações neste método, principalmente a interferência devido a reações entre TBA e outros compostos biológicos. Este problema vem sendo resolvido usando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a determinação de MDA, após a reação com TBA, possibilitando uma maior separação do composto formado e tornando o método mais específico. [65-67]

Este aperfeiçoamento da técnica e outros semelhantes têm sido muito utilizados para determinação dos níveis de MDA em uma grande variedade de amostras biológicas. [68-74]

A dosagem de MDA é a base para muitos ensaios científicos que visam determinar indiretamente o estado oxidativo da LDL em determinados grupos, como por exemplo, em pacientes com psoríase [50], autismo [62], e até em voluntários saudáveis. [75]

2.3.3. Dosagem de F₂-Isoprostanos:

Outros produtos da oxidação também podem ser dosados para determinar oxidação lipídica em amostras biológicas, além de MDA e hidroperóxidos lipídicos.

Este é o caso dos F₂-Isoprostanos (produtos da oxidação do ácido aracldônico), que atualmente é considerado como um método específico para determinar a peroxidação lipídica. [76,77] Os F₂-Isoprostanos podem ser quantificados utilizando extração de fase sólida, CLAE e Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa (CG-EM). [78,79]

Existem também ensaios imuno-enzimáticos sendo desenvolvidos, capazes de detectar a presença de F₂-Isoprostanos no plasma e na urina, até mesmo em pequenas concentrações [80,81], que poderão ser muito úteis clinicamente para auxiliar na avaliação de risco cardiovascular.

2.3.4. Dosagem de outros produtos de peroxidação lipídica:

Além dos já citados, outros produtos de oxidação de lipoproteínas também têm sido propostos como marcadores de oxidação da LDL. Um exemplo são os ácidos hidroieicosatetranóicos (HETEs), derivados da oxidação do ácido aracdônico e os ácidos hidroioctadecanóicos (HODEs), resultantes da oxidação do ácido linoléico.^[79] Estes compostos já foram encontrados aderidos à placa aterosclerótica, e cogita-se que sua presença está associada à placas instáveis e sujeitas à ruptura.^[82]

A presença destes compostos pode ser determinada, após a extração da fração lipídica do material a ser analisado, por técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).^[82]

Da mesma forma, estão sendo propostos outros marcadores como os hidrocarbonetos voláteis de cadeia curta, etano e pentano, igualmente formados durante a peroxidação lipídica, que são medidos como gases respiratórios utilizando-se cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massa.^[83-85]

2.4. Métodos imunológicos:

Uma das propriedades que diferenciam a LDL nativa da LDL-ox é sua capacidade imunogênica. A LDL-ox possui um papel imunogênico no processo da aterosclerose, pois é considerada um autoantígeno formado na lesão aterosclerótica.^[86,87]

A evidência que apóia esta afirmação é o fato de que são encontrados no sangue e nas lesões de pacientes com aterosclerose, além de em animais experimentais, anticorpos IgM e IgG, específicos para LDL-ox.^[86, 88-90]

A partir desta constatação foi possível desenvolver métodos imunológicos para verificar a presença de LDL-ox e quantificá-la. Estes métodos podem avaliar a presença de LDL-ox na amostra, utilizando anticorpos anti-LDL-ox ou ainda medir os autoanticorpos, usando a própria lipoproteína oxidada.

Estes métodos vêm sendo muito utilizados em estudos científicos que visam avaliar diretamente a oxidação da LDL in vivo, em determinadas populações, como por exemplo: em gestantes^[91], em pacientes com doença cardiovascular^[92] e em fumantes.^[93]

2.4.1. Determinação de autoanticorpos anti LDL-ox:

Os níveis de autoanticorpos fornecem uma evidência indireta da importância da LDL-ox na doença cardiovascular e podem ser determinados por um procedimento de enzima imunoensaio (EIA).^[94]

Na dosagem de autoanticorpos por ELISA do tipo indireto, a LDL oxidada pelo íon Cu^{++} é fixada nos micropoços da placa, como forma de antígeno, onde os anticorpos, se presentes na amostra, se ligarão especificamente. Após uma etapa de lavagem, um anticorpo IgG anti-humano específico ligado a uma enzima (conjugado) é adicionado para se ligar aos anti LDL-ox ligados à LDL-ox. Depois da remoção do conjugado que não se ligou, por uma nova etapa de lavagem, o substrato cromogênico da enzima é adicionado, sendo então modificado pela enzima ligada ao anticorpo anti-humano, gerando solução colorida. A concentração da imunoglobulina específica anti LDL-ox é quantificado pela mudança de cor na solução, detectável por um leitor de ELISA. A intensidade de cor desenvolvida é diretamente proporcional à concentração de anticorpos anti LDL-ox na amostra.^[50, 95]

2.4.2. Determinação da LDL-ox:

Os níveis de LDL-ox também podem ser mensurados por ensaios de ELISA, do tipo sanduíche, utilizando anticorpos monoclonais para diferentes epítomos da LDL-ox humana. Geralmente em um mesmo ensaio são usados mais de um anticorpo aderido à parede da placa. Após a adição da amostra, a LDL-ox existente no soro se liga aos anticorpos anti LDL-ox da placa. Depois de uma etapa de lavagem, o anticorpo anti LDL-ox acoplado a enzima é adicionado. Após nova lavagem, o substrato cromogênico é adicionado e modificado pela enzima. Como na técnica de ELISA descrita para dosagem de anticorpos anti LDL-ox, a quantidade de LDL-ox presente na amostra é diretamente proporcional à cor desenvolvida na solução. O nível de LDL-ox nas amostras pode ser expressa em unidades/mL.^[92,96,97]

3. CONCLUSÃO

Na maioria dos estudos em animais experimentais e em humanos, a oxidação da LDL vem sendo avaliada por métodos indiretos, alguns discutidos neste trabalho

(determinação de produtos da peroxidação lipídica, avaliação da susceptibilidade da LDL à oxidação, modificação da mobilidade eletroforética) e até recentemente o único meio para acessar a oxidação da LDL in vivo tem sido a quantificação de autoanticorpos contra a LDL-ox e a LDL-ox por métodos imunológicos.^[90] (Figura 2).

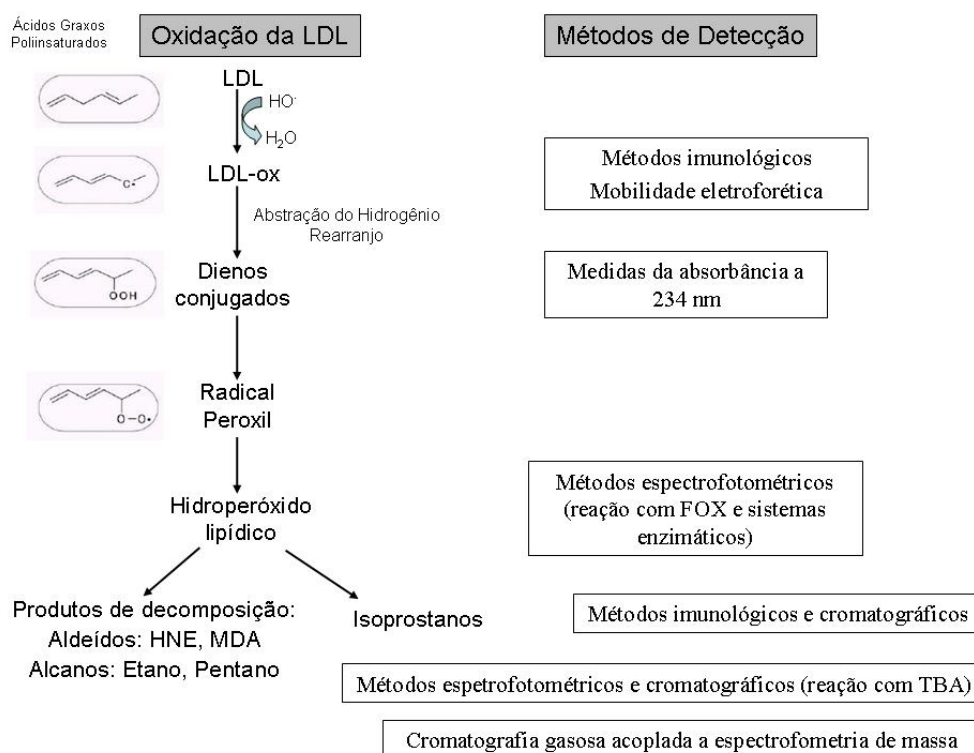


Figura 2: Modificação oxidativa dos componentes lipídicos da LDL e métodos para avaliação do dano oxidativo.

Em avaliações clínicas, para diagnóstico ou acompanhamento de pacientes de alto risco, os métodos mais utilizados para determinar a oxidação da LDL são os métodos imunológicos, por seu reduzido tempo de execução, fácil adaptação à rotina laboratorial e disponibilidade de kits comerciais.

Já os métodos espectrofotométricos e cromatográficos são mais utilizados em estudos diversos na área de saúde. Geralmente cada estudo utiliza mais de um método, combinando métodos indiretos entre si ou estes com métodos imunológicos para avaliar o estado oxidativo da LDL nos mais diversos grupos populacionais.

A eletroforese também é muito utilizada na avaliação das modificações oxidativas na LDL em estudos científicos. Além disso, sugeriu-se que a eletroforese capilar poderia ser um método de triagem clínica em grandes populações. ^[53]

Os métodos de avaliação da oxidação da LDL abordados neste trabalho e outros aqui não citados podem futuramente ser utilizados de forma mais ampla na triagem e no seguimento de pacientes com doenças cardiovasculares, além de continuarem a contribuir para a elucidação dos mecanismos da aterogênese e da contribuição da LDL-ox para o desenvolvimento da doença.

4.REFERÊNCIAS:

1. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239-247.
2. Finkel T. Reactive oxygen species and signal transduction. *IUBMB Life* 2001;52:3-6.
3. Finkel, T. Oxidant signals and oxidative stress. *Cur Opin Cell Bio* 2003;15:247-254.
4. Herken H, Uz E, Ozyurt H, Sogut S, Virit O, Akyol O. Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2001;6:66-73.
5. Akyol O, Herken H, Uz E, et al. The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002;26:995-1005.
6. Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 2000;7:153-163.
7. Cristen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am Journal Clin Nutr* 2000;71:621S-629S.
8. Bostantjopoulou S, Kyriazis G, Katsarou Z, Kiosseoglou G, Kazis A, Mentenopoulos G. Superoxide dismutase activity in early and advanced Parkinson's disease. *Funct Neurol* 1997;12:63-68.
9. Torsdottir G, Kristinsson J, Sveinbjornsdottir S, Snaedal J, Johannesson T. Copper, ceruloplasmin, superoxide dismutase and iron parameters in Parkinson's disease. *Pharmacol Toxicol* 1999;85: 239-243.
10. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidised lipoproteins in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 1996;20: 707-727.
11. Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17: 1859-1967.
12. Murray C, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: global burden of disease study. *Lancet* 1997;349:1436-1442.
13. Chambless LE, Folsom AR, Clegg LX et al. Carotid wall thickness is predictive of incident clinical stroke: the Atherosclerotic Risk in Communities (ARIC) study. *Am J Epidemiol* 2000;151: 478-487.
14. Nagai Y, Kitagawa K, Sakaguchi M et al. Significance of earlier carotid atherosclerosis for stroke subtypes. *Stroke* 2001;32:1780-1785.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Dislipidemias em pacientes de alto risco de desenvolver eventos cardiovasculares. www.portal.saude.gov.br (capturado em 21/04/05).

16. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond Cholesterol. Modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320: 915-924.
17. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and the antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992;13: 341-390.
18. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991;88:1785-1792.
19. Steinberg D, Witztum JL. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation* 2002;105:2107-2111.
20. Morel DM, Di Corletto PE, Chisholm GW. Endothelial and smooth muscle cells alter low-density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Atherosclerosis* 1984;4:357-364.
21. Heineck JW, Rosen H, Chait A. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* 1984;74: 1890-1894.
22. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM et al. Atherosclerosis: Basic Mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995;91: 2488-2496.
23. Goldman L, Ausiello D. Cecil: Tratado de Medicina Interna . 22° ed. Amsterdam: Editora Elsevier; 2005.
24. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-241.
25. Jialal I, Devaraj S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Chem* 1996; 42: 498-506.
26. Camejo G, Halberg C, Manschik-Lundin A et al. Hemin binding and oxidation of lipoproteins in serum: mechanisms and effect on the interaction of LDL with human macrophages. *J Lipid Res* 1998;39: 755-766.
27. Brown MS, Goldstein JL. Scavenging for receptors. *Nature* 1990;343: 508-509.
28. Sparrow CP, Parthasarathy S, Steinberg D. A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1989;264: 2599-2604.
29. Autio I, Jaakola O, Solakivi T, Nikkari T. Oxidized low-density lipoprotein is chemotactic for arterial smooth muscle cells in culture. *FEBS Lett* 1990; 277: 247-249.
30. Leake DS. Effects of mildly oxidised low density lipoprotein on endothelial cell function. *Curr Opin Lipidol* 1991; 2: 301-305.

31. Tsimikas S, Beyer RW, Patel R et al. Prospective evaluation of the role of oxidized LDL in acute coronary syndromes treated with percutaneous intervention. *Circulation*. 2000;102: 11-13.
32. Ross R. Atherosclerosis- an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
33. Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J* 1993;69: 377-381.
34. Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 1989;84:1086-1095.
35. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 1992;326:242-250.
36. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 1992;326:310-318.
37. Coffey MD, Cole RA, Colles SM, Chisolm GM. In vitro cell injury by oxidized low density lipoprotein involves lipid hydroperoxide-induced formation of alkoxyl, lipid, and peroxy radicals. *J Clin Invest* 1995;96:1866-1873.
38. Thomas JP, Geiger PG, Girotti AW. Lethal damage to endothelial cells by oxidized low density lipoprotein: role of selenoperoxidases in cytoprotection against lipid hydroperoxide and iron-mediated reactions. *J Lipid Res* 1993;34: 479-490.
39. Lizard G, Monier S, Cordelet C, et al. Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7-beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19: 1190-1200.
40. Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84: 2995-2998.
41. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990;344:254-257.
42. Leonard EJ, Yoshimura T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today* 1990;11: 97-101.
43. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362:801-809.

44. Ku G, Thomas CE, Akeson AL, Jackson RL. Induction of interleukin 1 beta expression from human peripheral blood monocyte-derived macrophages by 9-hydroxyoctadecadienoic acid. *J Biol Chem* 1992;267:14183-14188.
45. Horton AA, Fairhurst S. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1987;18:27-79.
46. Himber J, Buhler E, Moll D, Moser UK. Low density lipoprotein oxidation and metabolic studies. Isolation from small volumes of plasma using a tabletop centrifuge. *Int J Vitam Nutr Res* 1995;65:137-142.
47. Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun* 1989;6:67-75.
48. Regnstrom J, Nilsson J, Tornvall P, Landou C, Hamsten A. Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet* 1992;339:1183-1186.
49. Liu ML, Ylitalo K, Vakkilainen J et al. Susceptibility of LDL to oxidation in vitro and antioxidant capacity in familial combined hyperlipidemia: comparison of patients with different lipid phenotypes. *Ann Med* 2002;34:48-54.
50. Kural BV, Örem A, Cimsit G, Yandi YE, Calapoglu M. Evaluation of the atherogenic tendency of lipids and lipoprotein content and their relationships with oxidant-antioxidant system in patients with psoriasis. *Clin Chim Acta* 2003;328: 71-82.
51. Hendrickson A, Mckinstry LA, Lewis JK et al. Ex vivo measures of LDL oxidative susceptibility predict carotid artery disease. *Atherosclerosis* 2005;179:147-153.
52. Vasankari T, Ahotupa M, Toikka J et al. Oxidized LDL and thickness of carotid intima-media are associated with coronary atherosclerosis in middle-aged men: lower levels of oxidized LDL with statin therapy. *Atherosclerosis* 2001;155: 403-412.
53. Carru C, Zinellu A, Galistu F et al. The evaluation of the oxidative state of native-LDL: three methods compared. *J Biochem Biophys Methods* 2004; 61: 271-281.
54. Stocks J, Miller NE. Capillary electrophoresis to monitor the oxidative modification of low density lipoproteins. *J Lipid Res* 1998;39:1305-1309.
55. Fong LG, Parthasarathy S, Witztum JL, Steinberg D. Nonenzymatic oxidative cleavage of peptide bonds in apoprotein B-100. *J Lipid Res* 1987; 28:1466-1477.
56. Barros MRAC, Bertolami MC, Abdalla DSP, Ferreira WP. Identification of mildly oxidized low-density lipoprotein (electronegative LDL) and its auto-antibodies IgG in children and adolescents hypercholesterolemic offsprings. *Atherosclerosis*. www.sciencedirect.com (capturado em 02/07/2005).

57. Gambino R, Uberti B, Alemanno N, Pisu E, Pagano G, Cassader M. In vivo oxidizability of LDL in type 2 diabetic patients in good and poor glycemic control. *Atherosclerosis*, 2004;173:103-107.
58. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2004;43: 200-227.
59. Wolff SP. Ferrous ion oxidation in presence of ferric indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzimol* 1994;233:182-189.
60. Ruiz C, Alegria A, Barbera R, Farre R, Lagarda MJ. Determination of plasma lipid hydroperoxides by NADPH/NAD⁺ coupled enzyme reaction system evaluation of method. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35: 893-898.
61. Suttnar J, Cermak J, Dyr E. Solid-phase extraction in malondialdehyde analysis. *Anal Biochem* 1997;249: 20-23.
62. Chauhan A, Chauhan V, Brown WT, Cohen, I. Oxidative stress in autism: Increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin-the antioxidant proteins. *Life Sciences* 2004;75: 2539-2549.
63. Jain SK. Hiperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *J Biol Chem* 1989;264: 21340-21345.
64. Bird RP, Draper HH. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Methods Enzymol* 1984;105: 299-305.
65. Esterbauer H, Cheeseman KH, Dianzani MU, Poli G, Slater TF Separation and characterization of the aldehydic products of lipid-peroxidation stimulated by ADP- Fe^{2+} in rat liver microsomes. *Biochem J* 1982;208:129-140.
66. Ekstrom T, Garberg P, Egestad B, Hogberg J. Recovery of malonialdehyde in urine as a I,F-dinitrophenylhydrazine derivative analyzed with High Performance Liquid Cromatography. *Chem Biol Interact* 1988; 66:177-187.
67. Cordis GA, Maulik N, Bagchi D, Engelman RM, Das DK. Estimation of the extent of lipid-peroxidation in the ischemic and reperfused heart by monitoring lipid metabolic products with the aid of High Performance Liquid Cromatography. *J Chromatogr* 1993;632: 97-103.
68. Pilz J, Meineke I, Gleiter CH. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by High Performance Liquid Cromatography as the 2,4- dinitrophenylhydrazine derivative. *J Chromatogr B* 2000;742:315-325.
69. Cordis GA, Das DK, Riedel W. High Performance Liquid Cromatography peak identification of 2,4- dinitrophenylhydrazine derivatives of lipid peroxidation aldehydes by photodiode array detection. *J Chromatogr A* 1998;798: 117-123.

70. Volpi N, Tarugi P. Improvement in the High Performance Liquid Chromatography malondialdehyde level determination in normal human plasma. *J Chromatogr B* 1998;713: 433-437,.
71. Hsu CS, Chiu WC, Yeh SL. Effects of soy isoflavone supplementation on plasma glucose, lipids and antioxidant enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr Res* 2003;23: 67-75.
72. O'Reilly JD, Mallet AI, McAnlis GT, Young IS, Halliwell B, Sanders TA, Wiseman H. Consumption of flavonoids in onions and black tea: lack of effect on F-2-isoprostanes and autoantibodies to oxidized LDL in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2001;73:1040-1044.
73. Young JF, Nielsen SE, Haraldsdottir J et al. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am J Clin Nutr* 1999;69: 87-94.
74. Roig R, Cascon E, Arola L, et al. Effects of chronic wine and alcohol intake on glutathione and malondialdehyde levels in rats. *Nutr Res* 2000;20:1547-1555.
75. Browsers A, Langlois M, Delanghe J et al. Oxidized low-density lipoprotein, iron stores, and haptoglobin polymorphism. *Atherosclerosis* 2004;176:189-195.
76. Meagher EA, Fitzgerald GA. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1745-1750.
77. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F2-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* 2000;28:505-513.
78. Mori TA, Croft KD, Puddey IB, Beilin LJ. An improved method for the measurement of urinary and plasma F2-isoprostanes using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 1999;268:117-125.
79. Waddington EI, Croft KD, Sienuarine K, Latham B, Puddey IB. Fatty acid oxidation products in human atherosclerotic plaque: an analysis of clinical and histopathological correlates. *Atherosclerosis* 2003;167:111-120.
80. Marangon K, Devaraj S, Tirosh O, Packer L, Jialal I. Comparison of the effect of Alpha-lipoic acid and Alpha-tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1114-1121.
81. Feillet-Coudray C, Tourtauchaux R, Niculescu M et al. Plasma levels of 8-epiPGF2 alpha an in vivo marker of oxidative stress are not affected by aging or Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:463-469.
82. Mallat Z, Nakamura T, Ohan J, Leseche G, Tedgui A, Maclouf J, Murphy RC. The relationship of hydroxyeicosatetraenoic acids and F2-Isoprostanes to plaque instability in human carotid atherosclerosis. *J Clin Invest* 1999;103:421-427.

83. Moore K, Roberts L. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res Commun* 1998;28:659–671.
84. Aghdassi E, Allard JP. Breath alkanes as a marker of oxidative stress in different clinical conditions. *Free Radic Biol Med* 2000;28: 880–886.
85. VanderJagt DJ, Harrison JM, Ratliff DM, Hunsaker LA, Vander Jagt DL. Oxidative stress indices in IDDM subjects with and without long-term diabetic complications. *Clin Biochem* 2001;34:265–270.
86. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002; 91: 281-291.
87. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21: 1876-1890.
88. Parums DV, Brown DL, Mitchinson MJ. Serum antibodies to oxidized low-density lipoprotein and ceroid in chronic periaortitis. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114: 383-387.
89. Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:1372-1376.
90. Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R et al. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet*. 1992; 339:883-887.
91. Belo L, Caslake M, Santos-Silva A, Castro EMB, Pereira-Leite L, Quintanilha A, Rebelo I. LDL size, total antioxidant status and oxidized LDL in normal human pregnancy: a longitudinal study. *Atherosclerosis* 2004;177:391-399.
92. Shimada K, Mokuno H, Matsunaga E, Miyazaki T, Sumiyoshi K, Miyauchi K, Daida H. Circulating oxidized low-density lipoprotein is an independent predictor for cardiac event in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2004;174:343-347.
93. Zarin A, Gidlund M, Boschov P, Castilho L, de Faria EC. Antibodies Against Oxidized Low-Density Lipoprotein in Normolipidemic Smokers. *Am J Cardiol* 2002; 90:651-652.
94. Yla-Herttuala S. Is oxidized low-density lipoprotein present in vivo? *Cur Opin Lipidol* 1998;9: 337-344.
95. Abdalla DSP, Damasceno NRT, Apolinário E, Oliveira JM, Fernandes I. Biomarcador da modificação oxidativa da LDL in vivo. *Rev Bras Análises Clínicas* 2002;3:115-120.
96. Itabe H, Yamamoto H, Imanaka T, et al. Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody. *J Lipid Res* 1996;37: 3745-3753.
97. Kohno H. Simple and practical sandwich-type enzyme immunoassay for human oxidatively modified low density lipoprotein using oxidized phosphatidylcholine

monoclonal antibody and antihuman apolipoprotein-B antibody. *Clin Biochem* 2000;33: 243-253.

98. Yamaguchi Y, Kunitomo M, Haginaka J. Assay methods of modified lipoproteins in plasma. *J Chromatog. B* 2002; 781:313–330.