



UFSM

Dissertação de Mestrado

**OXIMAS COMO INIBIDORES DA OXIDAÇÃO DE
LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE**

Rafael de Lima Portella

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**OXIMAS COMO INIBIDORES DA OXIDAÇÃO DE
LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE**

por

Rafael de Lima Portella

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em Bioquímica
Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica.

Santa Maria, RS, Brasil

2009

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

A comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

**OXIMAS COMO INIBIDORES DA OXIDAÇÃO DE
LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE**

elaborada por
Rafael de Lima Portella

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

.....
Prof(a). Dr(a). Nilda Berenice de Vargas Barbosa
(Presidente/Co-Orientadora)
(UFSM)

.....
Prof. Dr. Rafael Noal Moresco
(UFSM)

.....
Prof(a). Dr(a). Marilise Escobar Burger
(UFSM)

Santa Maria, 09 de junho de 2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por sempre guiar meu caminho.

À minha família, pelo amor, pelo incentivo, pela dedicação, pela compreensão, pelos valores sempre transmitidos para mim.

Ao meu orientador Prof. Félix Alexandre Antunes Soares, pela orientação e ensinamentos transmitidos ao longo de minha formação acadêmica, e principalmente pela amizade e confiança na execução deste trabalho. Admiro-o pelos seus conhecimentos e dedicação ao seu trabalho.

À minha co-orientadora Prof^a. Nilda Berenice de Vargas Barbosa, pela dedicação na realização dessa defesa de dissertação.

À professora Andreza Fabro de Bem, pelos conhecimentos transmitidos desde o começo da minha vida acadêmica e como aluno de iniciação científica até o momento. Admiro-a pelos seus conhecimentos e dedicação ao seu trabalho.

Aos professores João Batista Teixeira da Rocha, Cristina Wayne Nogueira e Gilson Zeni, pelos seus conhecimentos e exemplos de dedicação a serem seguidos.

A todos os colegas dos laboratórios do Prof. João, da Prof^a Cristina e do Prof. Gilson e, especialmente, aos colegas do laboratório do Prof. Félix, pela amizade, pela ajuda, pela descontração e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos professores e aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, que de alguma maneira contribuíram para a minha formação científica.

À funcionária Angélica pela dedicação e competência com que realiza o seu trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização deste curso.

A CAPES pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

OXIMAS COMO INIBIDORES DA OXIDAÇÃO DE LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE

AUTOR: Rafael de Lima Portella
ORIENTADOR: Félix Alexandre Antunes Soares
CO-ORIENTADORA: Nilda Berenice de Vargas Barbosa
LOCAL E DATA DA DEFESA: Santa Maria, 09 de junho de 2009.

A oxidação da LDL é uma hipótese da aterogênese e sugere que o acúmulo de lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL) na parede do vaso é um evento precoce na progressão da doença. A oxLDL é uma molécula oriunda das modificações oxidativas que ocorrem nos componentes lipídicos e na apolipoproteína B (apoB) da LDL. A oxLDL ajuda a promover a aterosclerose através de mecanismos imunológicos e inflamatórios que levam à formação de células espumosas (foam cells). Existem estudos mostrando que diferentes antioxidantes inibem tanto a oxidação da LDL *ex vivo* quanto o desenvolvimento de aterosclerose em modelos de animais experimentais. Em vista disto, neste trabalho foi avaliado o efeito das propriedades antioxidantes das oximas butano-2,3-dionethiosemicarbazone e 3-(phenylhidrazono)butano-2-ona contra a oxidação da LDL isolada e do soro induzida por Cu^{2+} . A formação de dienos conjugados, a perda da fluorescência do triptofano e a formação de TBARS foram avaliadas como parâmetros de oxidação. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que ambas as oximas foram capazes de prevenir a oxidação da LDL e do soro induzidas por Cu^{2+} de maneira dependente da concentração. Ambas as oximas causaram um aumento significativo na fase lag da formação de dienos conjugados e uma diminuição significativa na produção de TBARS. Além disso, as oximas se mostraram efetivas em proteger a fase inicial da oxidação da LDL, indicada pela destruição de resíduos de triptofano da apoB e a subsequente fase de propagação. A oxima butano-2,3-dionethiosemicarbazone mostrou-se mais eficaz do que a 3-(phenylhidrazono) butano-2-one em todos os parâmetros analisados. Em conclusão, ambas as oximas foram efetivas em proteger a LDL da oxidação. Esta proteção pode contribuir para evitar a oxidação de LDL *in vivo* e possivelmente a aterogênese. No entanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer as propriedades antioxidantes das oximas contra outros geradores de radicais livres e o mecanismo molecular pelo qual as mesmas reduzem a oxidação da LDL.

Palavras-chave: oximas, antioxidante, aterosclerose, radicais livres.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Graduation Course in Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

OXIMES AS INHIBITORS OF LOW DENSITY LIPOPROTEIN OXIDATION

AUTHOR: Rafael de Lima Portella

ADVISOR: Félix Alexandre Antunes Soares

CO-ADVISOR: Nilda Berenice de Vargas Barbosa

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, June 09th, 2009.

The oxidation of low density lipoprotein is now an established hypothesis of atherogenesis and suggests that accumulation of oxidized low density lipoprotein (oxLDL) in the vessel wall is an early event in disease progression. OxLDL represents a variety of modification of both lipid and apolipoprotein B (apoB) components by peroxidation. This promotes atherosclerosis through inflammatory and immunologic mechanisms that lead to the formation of macrophage foam cells. There are studies showing that different antioxidants inhibit both *ex vivo* LDL oxidation and atherosclerosis in experimental animals. In view of this, we have evaluated the antioxidant properties of the new oximes butane-2,3-dionethiosemicarbazone and 3-(phenylhydrazono)butan-2-one against Cu²⁺-induced LDL and serum oxidation. Conjugated dienes formation, loss of tryptophan fluorescence, and TBARS formation were assessed as oxidation parameters. The results obtained in this study showed that both oximes are able to prevent Cu²⁺-induced LDL and serum oxidation in a concentration-dependent manner. Moreover, both oximes caused a significant increase in lag phase of conjugated dienes formation and a significant decrease in TBARS production. Indeed, oximes protected the early stage of LDL oxidation as destruction of tryptophan residues of ApoB and the subsequent propagation phase. Oxime butane-2,3-dionethiosemicarbazone showed to be more effective than 3-(phenylhydrazono) butan-2-one in all parameters analyzed. In conclusion, both oximes exhibited a protective role in LDL and serum oxidation. This protection may contribute to prevent LDL oxidation *in vivo* and thus the atherogenesis. However, further studies are needed to clarify the oximes antioxidant properties against other models of free radical generators and the molecular mechanism in which oximes prevent LDL oxidation.

Key-words: oximes, antioxidant, atherosclerosis, free radicals.

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1:** Chemical structure of butane-2,3-dionethiosemicarbazone oxime and 3-(phenylhydrazone) butan-2-one oxime. 15
- Figure 2:** Lag phase values for conjugated diene formation in isolated LDL. 16
- Figure 3:** Effects of oximes on conjugated diene formation in isolated LDL. 17
- Figure 4:** Effects of oximes on triptophan fluorescence decrease during LDL oxidation. 19
- Figure 5:** Effects of oximes on oxidation $t_{1/2}$ values for triptophan fluorescence. 19
- Figure 6:** Effects of oxime concentrations on conjugated diene formation during serum oxidation. 20

LISTA DE TABELAS

Table 1: Effects of butane-2,3-dionethiosemicarbazone oxime concentrations on time-dependent changes in the TBARS production during LDL oxidation	17
Table 2: Effects of 3-(phenylhydrazone) butan-2-one oxime concentrations on time-dependent changes in the TBARS production during LDL oxidation	18
Table 3: Lag phase and maximum oxidation rate for conjugated diene formation in serum	20

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
SUMÁRIO	viii
APRESENTAÇÃO	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aterosclerose	1
1.1.1 Aspectos gerais	1
1.1.2 Características da aterosclerose	1
1.1.3 Características morfológicas da aterosclerose	2
1.1.4 Oxidação da LDL	4
1.1.5 Hipótese da modificação oxidativa da LDL	5
1.1.6 Evidências da aterogenicidade da LDL oxidada.....	7
1.2. Antioxidantes e aterosclerose	8
1.2.1. Oximas.....	9
1.1. Objetivo geral	11
1.2. Objetivos específicos	11
2. MANUSCRITO	12
2.1. Oximas como inibidores da oxidação de lipoproteína de baixa densidade	13
3. DISCUSSÃO	22
4. CONCLUSÕES	24
5. PERSPECTIVAS	25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO**, está descrita uma sucinta revisão bibliográfica sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra no item **MANUSCRITO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

Os itens, **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**, no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

No item **PERSPECTIVAS** estão expostos os possíveis estudos para continuação do estudo do autor, referente a esse assunto.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** se referem somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO** desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aterosclerose

1.1.1 Aspectos gerais

A aterosclerose é a principal causa de morbidade e mortalidade nos países desenvolvidos e vem se tornando um problema cada vez maior em países em desenvolvimento que adquirem hábitos ocidentais (Stocker e Keaney, 2004). É responsável pela gênese de doenças cardiovasculares (DCV), sendo a mais comum e de maior incidência o infarto agudo do miocárdio que, em 85% a 90% dos pacientes, se deve à obstrução aguda da artéria coronária, resultante da cascata de eventos vasculares iniciados pela ruptura da placa aterosclerótica (Patterson, Eisner *et al.*, 1995).

No Brasil, de todas as mortes estimadas para o ano de 1997, segundo estimativa do Ministério da Saúde, 34,1% foram associadas à aterosclerose (Costa e Meale, 2002). Somente no ano de 2002 no Brasil, foram registradas 396.210 mortes causadas por doenças cardiovasculares (Mathers, 2003).

1.1.2 Características da aterosclerose

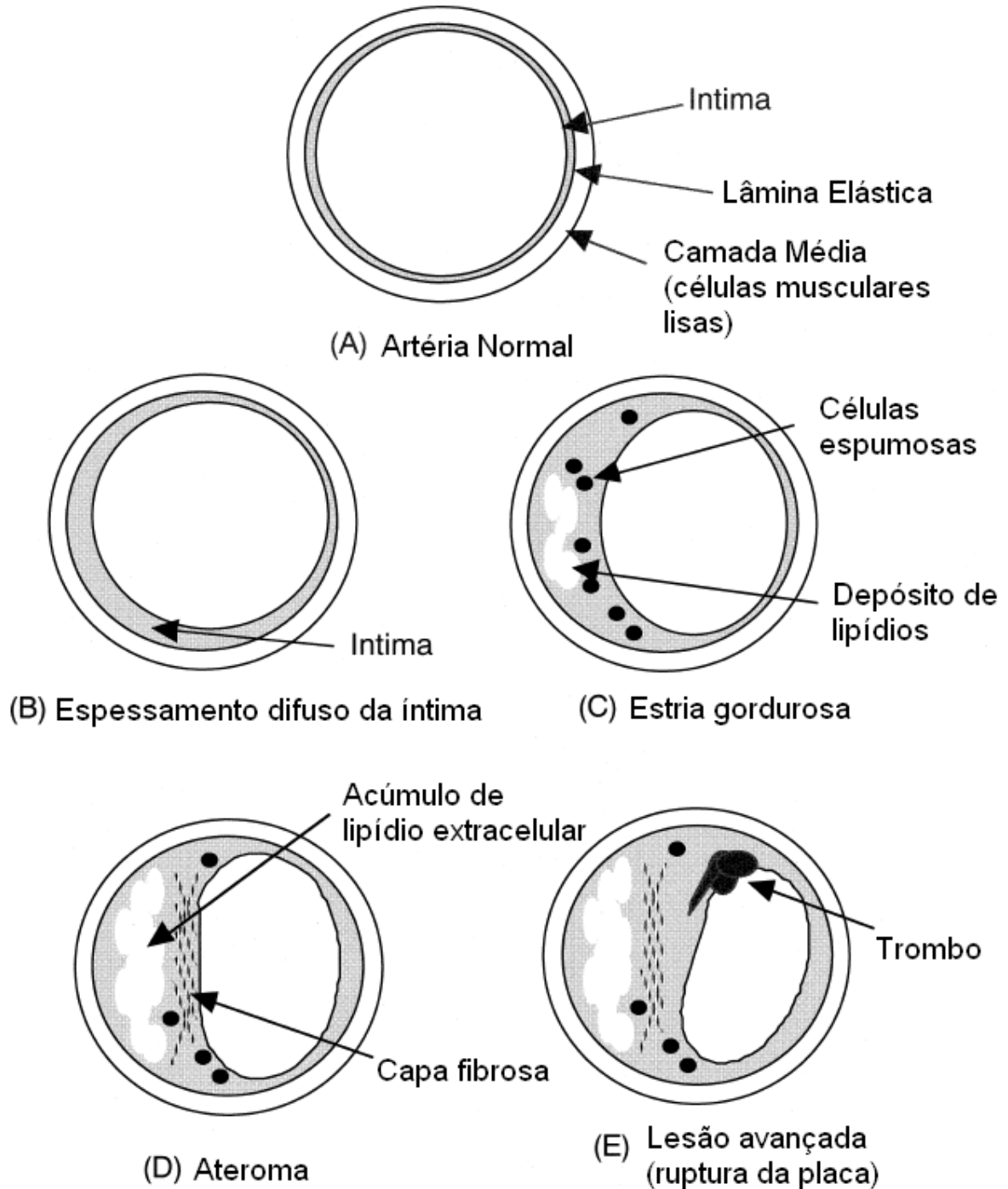
A aterosclerose é uma doença bastante complexa, cujo desenvolvimento envolve inúmeros eventos celulares e moleculares, dentre os quais se destacam a inflamação, o acúmulo de lipídios, a morte celular e a fibrose. Esta desordem é caracterizada pelo acúmulo de colesterol em macrófagos nas artérias de médio e grande calibre. Este depósito leva a proliferação de certos tipos celulares dentro da parede arterial que gradualmente reduzem o lúmen do vaso e impedem o fluxo sanguíneo. Esse processo pode ser bastante insidioso, durando décadas até a formação de uma lesão aterosclerótica. Porém, essa lesão pode se tornar vulnerável à força física do fluxo sanguíneo e se romper, causando a exposição dos componentes da parede arterial e levando assim, à formação de trombos que podem comprometer a suplementação de oxigênio em órgãos importantes como o coração, os pulmões e o cérebro (Stocker e Keaney, 2004).

1.1.3 Características morfológicas da aterosclerose

A aterosclerose tipicamente é manifestada em três estágios conhecidos como lesões precoces, lesões em desenvolvimento e lesões maduras (Keaney, 2000). As lesões precoces são caracterizadas por áreas nodulares de deposição de lipídios nomeadas morfolologicamente como “estrias gordurosas”. Estas representam macrófagos cheios de lipídios e células musculares lisas em áreas focais da camada íntima. Estas lesões precoces podem se desenvolver em torno dos 10 anos de idade e aumentar para ocupar até 1/3 da superfície da aorta na terceira década de vida. As lesões em desenvolvimento representam o próximo estágio das estrias gordurosas. Elas são encontradas inicialmente em áreas das artérias coronárias e aorta abdominal principalmente durante a terceira e quarta década de vida. Estas placas fibrosas têm formas elipsóides, são firmes e cobertas por uma camada fibromuscular. Por último, as lesões podem progredir para formas complicadas e avançadas, que são caracterizadas por áreas fibrosas calcificadas da artéria com ulcerações visíveis. Este tipo de lesão está associado com a formação de trombos, êmbolos e conseqüentemente com as doenças cardiovasculares.

A anatomia típica da artéria normal e com lesões ateroscleróticas estão ilustradas no esquema 1 (Itabe, 2003). Na artéria normal, existe uma camada de células endoteliais revestindo a superfície do lúmen do vaso que está em contato direto com o sangue (1a). Uma camada composta de elastina chamada lâmina elástica situa-se entre as células endoteliais e a camada de células musculares lisas. No estágio precoce da lesão aterosclerótica, o qual é referido como um espessamento difuso da camada íntima (1b), ocorre um acúmulo de fibras de colágeno e lipídios, bem como a invasão de várias células incluindo macrófagos entre as células endoteliais e a lâmina elástica. As estrias gordurosas são pedaços macroscópicos sob a parede do vaso, os quais coalescem para formar grandes lesões. Nesse estágio, há um acúmulo maciço de lipídios no espaço da camada íntima e um grande número de células espumosas, que derivam de macrófagos carregados de lipídios. Algumas células espumosas são derivadas de células musculares lisas (1c). A capa fibrosa é formada com células musculares lisas e numerosas proteínas fibrosas tais como o colágeno. Nas regiões mais profundas do ateroma são encontrados um acúmulo maciço de macrófagos, células musculares lisas e proteínas de matriz extracelular (1d). Quando a superfície luminal da lesão aterosclerótica é danificada ou rompida, as plaquetas imediatamente se aderem e se agregam no local rompido e assim formam o trombo (1e). A formação de trombos e êmbolos pode levar a uma oclusão completa do vaso sanguíneo e esta é considerada a causa primária do infarto do miocárdio e cerebral.

Diversos estudos têm apontado que placas ateromatosas ricas em lipídios e células espumosas são as mais vulneráveis e propensas a sofrer uma ruptura.



Esquema 1. Mudanças na estrutura da parede do vaso sanguíneo durante o desenvolvimento da aterosclerose.

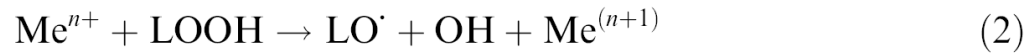
1.1.4 Oxidação da LDL

A LDL é uma das principais partículas transportadora de lipídios no plasma e consiste de éster de colesterol, fosfolipídios, colesterol livre, triglicerídios e apolipoproteína B100. A LDL que circula no plasma pode atravessar o espaço subendotelial e ser removida da circulação. Acredita-se que a oxidação da LDL não ocorra na circulação por causa das propriedades antioxidantes do plasma. Presume-se, no entanto, que a oxidação da LDL *in vivo* aconteça no espaço subendotelial, mediada principalmente por agentes oxidantes derivados de células ali presentes. No entanto, a transição bidirecional da LDL através do espaço subendotelial pode resultar em uma pequena quantidade de LDL oxidada na circulação sanguínea (Stocker e Keaney, 2004).

O mecanismo de oxidação da LDL *in vivo* é ainda matéria de grande especulação. De acordo com um dos mais prováveis cenários, a peroxidação lipídica começaria nos ácidos graxos poliinsaturados da superfície fosfolipídica da LDL e então se propagaria para o núcleo, terminando com a oxidação de todos os lipídios da partícula, seguida pela degradação dos grupos lisina da apoB (Esterbauer, Wag *et al.*, 1993). A apoB modificada pelos produtos de degradação lipídica (aldeídos) tem sua afinidade pelo receptor alterada, fazendo com que a LDL seja capturada pelos receptores scavenger dos macrófagos de uma maneira descontrolada, levando assim ao desenvolvimento das células espumosas (“foam cells”) e da lesão aterosclerótica (Esterbauer, Wag *et al.*, 1993).

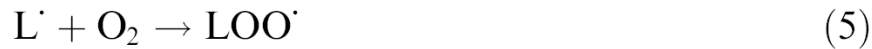
A modificação oxidativa da LDL pode ser dividida em três estágios. O primeiro estágio é conhecido como a iniciação da peroxidação lipídica e envolve a formação inicial de espécies de radicais dentro da partícula. O segundo estágio é conhecido como estágio de propagação da oxidação e representa a porção da oxidação da LDL envolvendo uma reação em cadeia, isto é, cada radical produzido na partícula produz mais do que um radical subsequente. O estágio final da oxidação da LDL é conhecido como decomposição porque os hidroperóxidos lipídicos formados dentro da partícula de LDL decompõem-se em aldeídos e cetonas reativas, os quais levam a modificação da porção da apoB da LDL e mudam a carga líquida da LDL (Keaney, 2000).

Uma vez que os hidroperóxidos lipídicos tenham se estabelecido na partícula de LDL, fica relativamente fácil gerar radicais livres, especialmente na presença de íons metálicos como mostrado nas equações (1) e (2).



Em sistemas lipídicos que contenham quantidades traço de hidroperóxidos de lipídio (LOOH), íons metálicos (Me) como o cobre ou o ferro podem catalisar a decomposição de hidroperóxidos de lipídio em radicais peroxil (LOO•) e alcoxil (LO•) como mostrado nas equações (1) e (2) respectivamente.

Estes radicais peroxil e alcoxil rapidamente reagem com outros grupos metileno bis-alílico (LH) de ácidos graxos poliinsaturados extraindo átomos de hidrogênio e formando hidroperóxidos de lipídio (LOOH) e hidróxidos de lipídio (LOH), bem como radicais de carbono (L•) como representado nas Equações (3), (4) e (5), respectivamente (Keaney, 2000).



1.1.5 Hipótese da modificação oxidativa da LDL

A hipótese de que a modificação oxidativa da LDL aumenta sua aterogenicidade surgiu no início da década de 80 (Fogelman, Shechter *et al.*, 1980; Henriksen, Mahoney *et al.*, 1981; Heinecke, Rosen *et al.*, 1984; Morel, Dicorleto *et al.*, 1984; Steinbrecher, Parthasarathy *et al.*, 1984). Desde que os macrófagos foram identificados como as principais células envolvidas na origem das células espumosas, as quais marcam o início das lesões arterocleróticas, aumentou notavelmente as investigações sobre os mecanismos envolvidos na formação das células espumosas. Apesar da inegável associação de elevados níveis de LDL com a aterosclerose, estudos *in vitro* têm evidenciado que a LDL *per se* não parece ser aterogênica (Henriksen, Mahoney *et al.*, 1981; 1983; Steinbrecher, Parthasarathy *et al.*, 1984). Inicialmente pensava-se que a formação das células espumosas era mediada pelos receptores de LDL. No entanto, essa hipótese acabou se tornando improvável. Um dos indícios para o problema com esta hipótese derivou das observações que pacientes com hipercolesterolemia

familiar, os quais não apresentam receptores de LDL funcionais, manifestam aterosclerose precocemente, já na primeira década de vida. Além disso, foi evidenciado que a incubação de LDL com macrófagos normais, os quais possuem receptores de LDL funcionais, não forma células espumosas (Goldstein, Ho *et al.*, 1979). De fato, níveis elevados de LDL geralmente causam uma redução na disponibilidade de receptores de LDL nas membranas, devido ao aumento da endocitose dos mesmos (Goldstein, Ho *et al.*, 1979).

Na busca de receptores alternativos de LDL, Brown e Goldstein, em 1979, observaram que a modificação química da LDL via acetilação leva a formação de células espumosas quando incubadas com macrófagos. A captação específica e saturável da LDL modificada pelas células era característica de captação por receptor, o qual foi denominado de “receptor acetil-LDL” e hoje é reconhecido como um dos muitos “receptores scavenger” que estão presentes nos macrófagos e outros tipos celulares (Krieger, Acton *et al.*, 1993). Nestes estudos não foram identificados mecanismos *in vivo* associados ao processo de acetilação de LDL, no entanto, eles especulavam outras modificações que pudessem facilitar o reconhecimento da LDL pelos receptores scavenger. Ainda em 1979, estudos com culturas de células endoteliais e de músculo liso vascular humano mostraram que a LDL podia danificar estas células (Hessler, Robertson *et al.*, 1979) e que os danos eram dependentes da modificação oxidativa da LDL (Hessler, Morel *et al.*, 1983; Morel, Hessler *et al.*, 1983; Morel, Dicorleto *et al.*, 1984). De acordo com tais constatações, posteriormente foi demonstrado que modificações oxidativas na molécula de LDL, induzidas em culturas de células, facilitam o reconhecimento da LDL pelos receptores scavenger de macrófagos e levam a formação de células espumosas (Henriksen, Mahoney *et al.*, 1981; 1983). Em 1990, Hermann Esterbauer com interesse especial em química de aldeídos descobriu que a LDL, a principal vilã em termos de deposição de colesterol na parede arterial, podia ser facilmente oxidada na presença de íons metálicos de transição (em particular ferro e cobre); e que este processo envolvia a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados por radicais livres e formação de aldeídos (Esterbauer, Dieber-Rotheneder *et al.*, 1990). A formação de bases de Schiff entre o aldeído e o grupo ϵ -amino do resíduo de aminoácido lisina pode modificar a apoB e alterar seu reconhecimento pelo receptor de LDL.

Na mesma época, Daniel Steinberg e colaboradores (1983) evidenciaram que a incubação de LDL com células, como macrófagos ou outras células em cultura, causava mudanças na molécula LDL de forma que ela não era mais reconhecida pelos seus receptores normais (Henriksen, Mahoney *et al.*, 1983). A LDL oxidada torna-se mais eletronegativa e mais facilmente reconhecida pelos receptores scavenger dos macrófagos.

1.1.6 Evidências da aterogeneidade da LDL oxidada

Embora níveis plasmáticos elevados de LDL sejam um dos principais riscos para doenças cardiovasculares, o(s) mecanismo(s) envolvido(s) no papel desta lipoproteína em tais desordens não se encontram totalmente esclarecidos. Vários estudos têm apontado a LDL oxidada como um agente aterogênico (Witztum e Steinberg, 1991; Parthasarathy e Rankin, 1992), visto que: (1) LDL oxidada exerce uma variedade de efeitos aterogênicos *in vitro* e *in vivo* (Witztum e Steinberg, 1991; Berliner, Navab *et al.*, 1995); (2) partículas parecidas com lipoproteínas com danos oxidativos foram isoladas de lesões ateroscleróticas (Witztum e Steinberg, 1991; Baynes e Thorpe, 2000; Marathe, Harrison *et al.*, 2000; Meagher e Fitzgerald, 2000; Podrez, Abu-Soud *et al.*, 2000; Subbanagounder, Watson *et al.*, 2000; Uchida, 2000); (3) produtos de oxidação lipídica como o malondialdeído foram detectados imuno-histologicamente em lesões ateroscleróticas de humanos e de animais (Esterbauer, Gebicki *et al.*, 1992); (4) diversos antioxidantes estruturalmente independentes retardaram a formação de lesões ateroscleróticas em animais hipercolesterolêmicos e em primatas (Esterbauer, Gebicki *et al.*, 1992; Lynch e Frei, 1994; Jessup e Leake, 1995). Assim, lipídios derivados de lipoproteínas danificadas oxidativamente podem ter importância fundamental na aterogênese.

A LDL oxidada é citotóxica e tem vários efeitos proaterogênicos causados pelos seus diversos produtos de oxidação. Entre estes efeitos destacam-se: capacidade de atrair e induzir a adesão de monócitos no endotélio, de promover a formação de células espumosas (“foam cells”), de danificar células (por vias necróticas e apoptóticas), de induzir migração e proliferação de células musculares lisas, de interferir no processo de relaxamento vascular mediado pelo endotélio, de induzir a liberação de citocinas dos macrófagos, de alterar a expressão de genes inflamatórios de células vasculares e de aumentar a expressão de receptores scavenger de macrófagos. Além disso, seus efeitos imunogênicos estimulam a formação de anticorpos e a ativação de células T, aumentam a capacidade de agregação das partículas de LDL, facilitando sua captação por macrófagos e aumentam a capacidade pró-coagulante por indução de fatores teciduais e estimulação da agregação plaquetária (Navab, Fogelman *et al.*, 1995; Chisolm e Penn, 1996; Steinberg, 1997; Tsimikas e Witztum, 2000; Bruckdorfer, 2008).

Vários estudos de caso-controle têm demonstrado altos níveis de LDL oxidada no plasma de pacientes com doenças cardíacas ou de indivíduos propensos a desenvolver desordens cardiovasculares (Toshima, Hasegawa *et al.*, 2000; Ehara, Ueda *et al.*, 2001;

Holvoet, Mertens *et al.*, 2001; Sigurdardottir, Fagerberg *et al.*, 2002; Suzuki, Kohno *et al.*, 2002; Nordin Fredrikson, Hedblad *et al.*, 2003; Holvoet, Kritchevsky *et al.*, 2004; Shimada, Mokuno *et al.*, 2004; Meisinger, Baumert *et al.*, 2005). Toshima et al. demonstraram que os níveis plasmáticos de LDL oxidada podem ser considerados mais específicos e sensíveis como marcador de risco de doenças cardíacas quando comparado aos níveis de colesterol total, triglicerídios, apoB ou HDL. Níveis elevados de LDL oxidada também foram identificados como um forte preditor para doenças coronárias em homens de meia idade (Meisinger, Baumert *et al.*, 2005). Atualmente está bem estabelecida, por vários grupos de pesquisa, a estreita correlação existente entre doenças cardiovasculares e o aumento da LDL oxidada (Holvoet, Vanhaecke *et al.*, 1998; Toshima, Hasegawa *et al.*, 2000; Ehara, Ueda *et al.*, 2001; Tsimikas, Brilakis *et al.*, 2005; Holvoet, Jenny *et al.*, 2007).

1.2. Antioxidantes e aterosclerose

Estudos recentes sugerem que certos produtos naturais podem fornecer um acesso a antioxidantes alternativos, como por exemplo, os polifenóis presentes em várias frutas e vegetais. Estes podem melhorar o metabolismo lipídico, reduzir a produção de LDL oxidada e melhorar potencialmente a aterogênese (Gorinstein, Zemser *et al.*, 1999; Hu e Willett, 2002; Keen, Holt *et al.*, 2005; Covas, Nyssonen *et al.*, 2006). De acordo, foi observado que pacientes após um evento de infarto do miocárdio, que adotaram uma dieta Mediterrânea, significativamente reduziram desordens cardiovasculares subseqüentes quando comparados com pacientes com dieta Ocidental [52]. Uma relação inversa entre o consumo de alimentos ricos em flavonóides e a mortalidade por doença arterial coronariana tem sido observada em outros estudos com epidemiológicos (Muller, 1994).

Numerosos experimentos com animais têm mostrado efeitos benéficos de antioxidantes contra no desenvolvimento de aterosclerose. Por exemplo, a droga antioxidante probucol e as vitaminas E e C exibiram efeitos antiateroscleróticos em coelhos New Zealand White tratados com colesterol (Bocan, Mueller *et al.*, 1992). O beta-caroteno inibiu o desenvolvimento de aterosclerose em coelhos tratados com colesterol, apesar de uma perda do efeito sobre a oxidação da LDL *ex vivo* (Shaish, Daugherty *et al.*, 1995). Probuco e seus análogos prolongaram o tempo de oxidação da LDL e reduziram a aterogênese em coelhos com hipercolesterolemia hereditária (Carew, Schwenke *et al.*, 1987; Kita, Nagano *et al.*, 1987; Mao, Yates *et al.*, 1991; Fruebis, Steinberg *et al.*, 1994). Altas doses de vitamina E

também foram efetivas em reduzir a progressão de aterosclerose nessa espécie de coelhos (Willingham, Bolanosa *et al.*, 1993).

Com base na gravidade dos efeitos deletérios que podem ser induzidos pela LDL oxidada e nos efeitos benéficos obtidos com o uso de antioxidantes nas desordens cardiovasculares tanto em animais experimentais como em humanos, faz-se importante a busca por novas substâncias antioxidantes que possam ser usadas de forma efetiva no tratamento da aterogênese.

1.2.1. Oximas

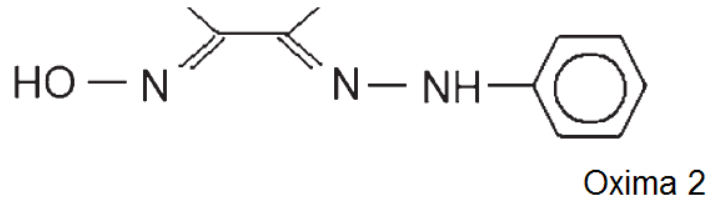
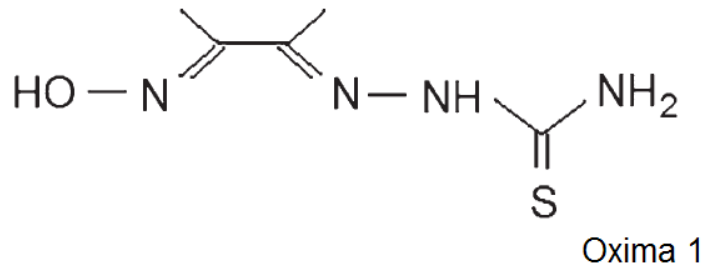
As oximas são compostos químicos que obedecem a fórmula molecular geral $R_1R_2C=N-OH$. Segundo a identidade dos radicais R_1 e R_2 ligados ao carbono que estabelece a ligação com a porção $N-OH$, as oximas podem ser classificadas como aldoximas ou cetoximas. As aldoximas possuem uma cadeia lateral orgânica como um dos radicais ligados ao carbono, e um átomo de hidrogênio como sendo o segundo radical. As cetoximas, por sua vez, apresentam duas cadeias laterais orgânicas como radicais. As oximas são, em sua maioria, sólidos cristalinos com pouca solubilidade em água e derivados da condensação de uma porção hidroxilamida (NH_2OH) com um aldeído ou uma cetona por catálise ácida. O termo oximas foi primeiramente definido no século XIX e deriva da contração das palavras oxigênio e imida (oxigênio+imida = oxima) (Arena, 1979).

As oximas são geralmente utilizadas como potentes antídotos no tratamento de intoxicações por organofosforados (Worek, Thiermann *et al.*, 2004), por serem capazes de promover a reversão da inibição da enzima acetilcolinesterase induzida pelo agente tóxico. Além deste efeito, estudos recentes têm indicado determinadas oximas como potentes agentes antioxidantes. Silva *et al.* mostraram que a oxima K027 reduz a peroxidação lipídica causada por malation em córtex prefrontal de camundongos (Da Silva, Farina *et al.*, 2008).

As oximas 3-(fenil hidrazona) butano-2-ona e butano-2,3-dionatiosemicarbazona são oximas inéditas sintetizadas recentemente e conseqüentemente pouco se sabe sobre suas propriedades farmacológicas e/ou toxicológicas. No entanto, alguns estudos já têm evidenciado que quando administradas via subcutânea, não causam alterações nos níveis de tióis não-protéico, de peroxidação lipídica e na atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase em camundongos (Puntel, Gubert *et al.*, 2008; Puntel, De Carvalho *et al.*, 2009). Com relação à atividade antioxidante, Puntel *et al.* demonstraram que a oxima 3-(fenil hidrazona) butano-2-ona reduz a produção de TBARS em homogeneizado de cérebro de

camundongos induzida por malonato e ferro (Puntel, Gubert *et al.*, 2008). De acordo com tais constatações, estudos posteriores mostraram que a oxima butano-2,3-dionatiosemicarbazona neutraliza diferentes espécies reativas como os radicais hidroxil, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio *in vitro* e também inibe a peroxidação lipídica induzida por diferentes agentes oxidantes em homogeneizados de tecidos de camundongo *in vitro* (Puntel, De Carvalho *et al.*, 2009).

Abaixo estão apresentadas as estruturas das oximas butano-2,3-dionatiosemicarbazona (Oxima 1) e 3-(fenil hidrazona) butano-2-ona (Oxima 2).



OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Avaliar as propriedades antioxidantes das oximas 3-(fenil hidrazona) butano-2-ona e butano-2,3-dionatiosemicarbazona em prevenir modificações oxidativas nas porções lipídicas e protéicas das LDLs humanas.

1.2. Objetivos específicos

- Determinar a capacidade das oximas em prevenir a formação de dienos conjugados em LDL humana isolada e de soro humano;
- Verificar o efeito das oximas sobre a formação de TBARS em LDL humana isolada;
- Avaliar a capacidade das oximas em prevenir a oxidação do triptofano da apoB da LDL humana isolada;

2. MANUSCRITO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo. O artigo encontra-se na formatação de publicação da revista científica Life Sciences.

2.1. Oximas como inibidores da oxidação de lipoproteína de baixa densidade

Manuscrito publicado na revista Life Sciences

OXIMES AS INHIBITORS OF LOW DENSITY LIPOPROTEIN OXIDATION

Rafael de Lima Portella, Rômulo Pillon Barcelos, Andreza Fabro de Bem, Vanessa Santana Carratu, Leandro Bresolin, João Batista Teixeira Rocha, Félix Alexandre Antunes Soares

Life Sciences 83 (2008) 878-885



Oximes as inhibitors of low density lipoprotein oxidation

Rafael de Lima Portella^a, Rômulo Pillon Barcelos^a, Andreza Fabro de Bem^b, Vanessa Santana Carratu^c, Leandro Bresolin^d, João Batista Teixeira da Rocha^a, Félix Alexandre Antunes Soares^{a,*}

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

^b Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^c Departamento de Química, Fundação Universidade de Rio Grande, Campus Carreiros, Rio Grande, RS, Brazil

^d Universidade Federal do Acre, Campus Cruzeiro do Sul, Cruzeiro do Sul, AC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 August 2008

Accepted 3 October 2008

Keywords:

Low density lipoprotein

Serum

Oxime

Copper

Atherosclerosis

ABSTRACT

Aims: Several lines of evidence support the hypothesis that the oxidation of low density lipoprotein (LDL) may play a crucial role in the initiation and progression of atherosclerosis. Various studies have shown a positive effect of antioxidant compounds on oxidative modification of LDL and atherogenesis. In view of this, we have investigated the possible antioxidant activity of two new oximes against Cu²⁺-induced LDL and serum oxidation. Oximes are used in organophosphate (OP) poisoning acting by restoring the cholinesterase function. However, their antioxidant capacities are not well understood and poorly studied.

Main methods: We measured, in a Cu²⁺-induced oxidation, the conjugated dienes formation in serum and LDL and the loss of tryptophan fluorescence as well as the TBARS formation in the LDL.

Key Findings: Our results showed that both oximes act as antioxidant and they are able to prevent LDL oxidation in a concentration-dependent manner. When human LDL or serum was oxidized by Cu²⁺, our oximes showed a significant increase in the lag phase of conjugated dienes and a significant decrease in the thiobarbituric acid reactive substances production. Moreover, oximes protected tryptophan residues of ApoB-100 in the early stage of LDL oxidation and during the subsequent propagation phase.

Significance: These results indicated for the first time that oximes have a potential antioxidant activity and they could act in the prevention of LDL and serum oxidation. Thus, we speculated that our oximes could act as antiatherogenic compounds besides their well described role as antidote for organophosphate poisoning.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Atherosclerotic cardiovascular disease is the number one cause of death in Western countries and is a rapidly growing problem worldwide. It is a pathophysiological condition in which arteries undergo gradual thickening of the intima causing decreased elasticity, narrowing and reduced blood supply. This affects the arterial wall and leads to angina pectoris, myocardial infarction and stroke (Steinberg et al., 1989).

Atherosclerosis is well recognized as a chronic inflammatory disease involving both humoral and cellular mechanisms (Hansson, 2001; Libby, 2002). The oxidation of low density lipoprotein (LDL) plays a key role in the pathogenesis of atherosclerosis (Steinberg et al., 1989; Witztum and Steinberg, 1991; Esterbauer, 1993). Evidences to support this theory include the presence of oxidized lipids and proteins in human atherosclerotic lesions (Carpenter et al., 1995; Suarna et al., 1995; Hazell et al., 1996). Repeated exposure of LDL to an

oxidative environment could increase its susceptibility to oxidation (Walzem et al., 1995; Gotoh et al., 1996). On further modifications of the intima, oxidized LDL is taken up by macrophage scavenger receptors, gradually leading to the formation of foam cells and fibrous plaques (Parthasarathy et al., 1986).

LDL can be modified in a cell-free system by transition metals such as iron and copper and by all the major cells of the arterial wall such as endothelial cells, smooth muscle cells, and monocyte-macrophages (Cathcart et al., 1985; Hiramatsu et al., 1987; Heinecke et al., 1986, 1993). Products of Cu²⁺-induced LDL oxidation have similar biological activities to that oxidized in vivo (Steinbrecher et al., 1984; Steinberg et al., 1989; Ylä-Herttuala et al., 1989). These products have been widely used as a model of atherosclerosis in relevant studies (Jialal and Devaraj, 1996; Rice-Evans et al., 1996).

One possible method to prevent atherosclerotic diseases would be the administration of antioxidant substances thereby making LDL less sensitive to oxidation. Indeed, different synthetic antioxidants inhibit lesion development in various animal models of atherosclerosis (Tangirala et al., 1995; Cynshi et al., 1998; Witting et al., 1999). Another line of defense against oxidative stress might be by the hydrolysis of specific oxidative products by hydrolases such as paraoxonase and acetylcholine esterase. Low serum paraoxonase

* Corresponding author. Departamento de Química, CCNE, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 3220 9522; fax: +55 55 3220 8978.

E-mail address: felix_antunes_soares@yahoo.com.br (F.A.A. Soares).

and acetylcholine esterase activities were found to be associated with increased prevalence of atherosclerosis and cardiovascular diseases (Menache et al., 1982; Aviram et al., 2000; Durrington et al., 2001; Mackness et al., 2004).

Oximes, combined with anticholinergic drugs, are used as antidotal regimens for organophosphate poisoning (Gray, 1984). Hereby, anticholinergic drugs act only symptomatically while oximes may restore the enzyme function. However, Silva et al., 2008 showed that oximes were able to reduce the lipid peroxidation caused by malathion in the prefrontal cortex besides restoring the enzyme function. Additionally, Puntel et al., 2008 showed that 3-(phenylhydrazono) butan-2-one oxime was able to decrease the TBARS production in brain homogenates induced by malonate and iron. Following these considerations, we investigated the possible antioxidant activity of two new oximes, butane-2,3-dionethiosemicarbazone oxime and 3-(phenylhydrazono) butan-2-one oxime, which present no information on Cu²⁺-induced LDL and serum oxidation.

Materials and methods

Synthesis of oximes

The butane-2,3-dionethiosemicarbazone oxime (oxime 1) was prepared by the mixture of 1 mol diacetylmonoxime with 1 mol of thiosemicarbazide both dissolved in ethanol, and made acid by the addition of 0.5 mL of acetic acid 0.1 M. After three h of stirring and reflux, a pale yellow product was formed, collected by filtration, washed with water and dried in vacuum, yield 70%, mp 225 °C. IR: $\nu = 1595 \text{ cm}^{-1}$ (C=N), 1296 cm^{-1} (C=S), 1087 cm^{-1} (O-N), 3251 cm^{-1} (N-H), 3420 cm^{-1} (O-H) (Nandi et al., 1984).

The 3-(phenylhydrazono)butan-2-one oxime (oxime 2) was prepared by a simple mixture and reflux for 3 h of 1 mol diacetylmonoxime with 1 mol of phenylhydrazine chloride both dissolved in a mixture of ethanol-H₂O (2:1, v/v) and 0.5 mL of sodium acetate 6 M. On heating, a dark orange product was formed, collected by filtration, washed with water, and dried in vacuum (yield 70%, mp 190 °C) (Puntel et al., 2008).

For all the experimental procedures, oxime 1 solutions were prepared in ethanol and oxime 2 solutions were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO). The structures of oximes are presented in Fig. 1.

LDL isolation

LDL was isolated from fresh human plasma by discontinuous density-gradient ultracentrifugation as described by Silva et al., 1998, with few modifications. Briefly, plasma of non-fasted healthy normolipidemic voluntary donors collected with EDTA (1 mg/mL) was pooled and sucrose (final concentration, 0.5%) was added to prevent LDL aggregation. Five milliliters of EDTA-plasma adjusted to a density of 1.22 g/mL with solid KBr (0.326 g/mL) was layered on the bottom of a centrifuge tube. Then, 5 mL EDTA-containing sodium

chloride solution (density 1.006 g/mL) was overlaid on the top of the plasma. Ultracentrifugation was run at 65,000 rpm for 2 h at 4 °C, in a Himac CP80MX ultracentrifuge. LDL particles were collected by the aspiration of the yellow/orange band at the middle of the saline layer and dialyzed exhaustively overnight at 4 °C with 10 mM phosphate buffer (pH 7.4). Protein concentration in LDL solution was determined by Lowry's method (Lowry et al., 1951). The purity of LDL preparation was verified by agarose gel electrophoresis (>98%). Isolated LDL was stored at -20 °C for no longer than 2 weeks.

LDL oxidation

Conjugated dienes and TBARS formation

LDL samples (50 μg protein/mL) were pre-incubated at 37 °C in a medium containing 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) and different oxime concentrations (0–5 μM). After 5 min, the oxidation was initiated by the addition of CuSO₄ (1.6 μM or 5 μM). The oxidation was monitored by measuring the increase in absorbance at 234 nm due to conjugated diene (CD) formation as previously described (Esterbauer et al., 1989). Aliquots were also removed at different time points for evaluating thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) production as previously described (Ohkawa et al., 1979).

Measurement of LDL-tryptophan fluorescence

The fluorescence spectra of native LDL display a single band centered at approximately 332 nm, which is assigned to the tryptophan (Trp) residues in ApoB-100 (Giessauf et al., 1995). Loss of tryptophan fluorescence is a marker for oxidations at the protein core of LDL (Reyftmann et al., 1990; Giessauf et al., 1995). Tryptophan (Trp) fluorescence was measured in a solution of LDL (50 μg protein/ml) in PBS (10 mM) pH 7.4 at 37 °C, using a Shimadzu spectrofluorometer (excitation at 282 nm and emission at 331 nm) (Reyftmann et al., 1990; Giessauf et al., 1995). The kinetics of LDL oxidation was followed by measuring the decrease of Trp-fluorescence, corresponding to the decomposition of this amino acid, after the addition of 5 μM CuSO₄, in absence or presence of oximes. The cuvettes had to be removed from the excitation light between the single measurements to avoid photooxidation of the tryptophan residues; fluorescence was measured every 20 min. Data are shown as the percent decrease of Trp fluorescence in each sample. The time required for reaching half Trp fluorescence ($t_{1/2}$) was calculated.

Serum oxidation

Venous blood was drawn from nonfasted healthy normolipidemic voluntary donors into tubes containing no anticoagulant and centrifuged at 1000 g for 15 min. Serum diluted 100-fold was incubated at 37 °C in a medium containing 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) and different oxime concentrations (0–5 μM). The oxidation was initiated by the addition of CuSO₄ (30 μM) and CD formation was monitored at 245 nm as previously described (Schnitzer et al., 1998).

Determination of lag phase and maximum oxidation rate

In the studies of CD formation, there are several parameters which can be obtained from diene vs. time profiles. The value of the lag phase is commonly determined graphically by the intercept of the tangents to the slow and fast increase of the diene absorption. Another parameter is the maximum oxidation rate, given by the peak of the first derivative, i.e. change of A_{234} as a function of time (Gieseg and Esterbauer, 1994).

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SD. Statistical analysis was performed using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student–Newman–Keuls test when appropriate. In addition, linear regression was performed to identify a possible dose dependent effect. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

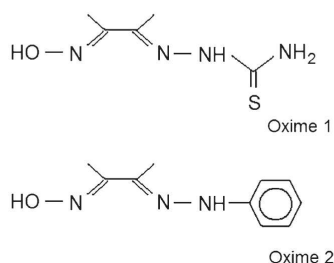


Fig. 1. Chemical structures of butane-2,3-dionethiosemicarbazone oxime (oxime 1) and 3-(phenylhydrazono)butan-2-one oxime (oxime 2).

Results

Effects of oximes on the LDL oxidation

There is a question about whether higher or lower Cu²⁺ concentration would be more appropriate to be used and more revealing of the properties of LDL (Rice-Evans et al., 1996; Ziouzenkova et al., 1998). This way, we used two distinct Cu²⁺ concentrations. Low oxidation in LDL was detected when Cu²⁺ was not present in the reaction medium, which could be caused by the assay time exposure.

Conjugated diene (CD) production

Oximes caused a concentration-dependent increase of the lag phase (Fig. 2) (oxime 1: $r^2=0.818$ and $r^2=0.949$, $p<0.001$; oxime 2: $r^2=0.886$ and $r^2=0.867$, $p<0.001$, to 1.6 and 5 μM Cu²⁺ concentrations, respectively). Fig. 3 shows the CD production vs. time profiles to oximes 1 and 2.

Oxime 1 caused a significant increase on lag phase from 1.32 to 3.3 μM in both Cu²⁺ concentrations used here (Fig. 2). At concentra-

tions of 2 and 3.3 μM the oxime 1 totally prevented the oxidation of LDL by 1.6 μM Cu²⁺ (Fig. 3A and B). In the same way, oxime 2 (1 to 5 μM) caused a significant increase on lag phase in LDL oxidation induced by both Cu²⁺ concentrations utilized (Fig. 2). However, oxime 2 was unable to prevent the total oxidation of LDL in our conditions (Fig. 3C and D).

The maximum oxidation rate decreased significantly ($p<0.01$) at the concentration of 3.3 μM by the oxime 1 compared to control levels when LDL was oxidized by 1.6 μM or 5 μM Cu²⁺. On the other hand, oxime 2 showed no significant difference on the maximum oxidation rate (data not shown).

TBARS production

LDL oxidation was also evaluated by TBARS formation. Tables 1 and 2 show a significant effect of oximes in preventing TBARS formation induced by Cu²⁺. The protective effects of oximes were similar to the ones presented in the CD experiments. Oxime 1 (2 and 3.3 μM) and oxime 2 (3 and 5 μM) protected the LDL of TBARS formation induced by 1.6 μM Cu²⁺, as evidenced by low TBARS levels

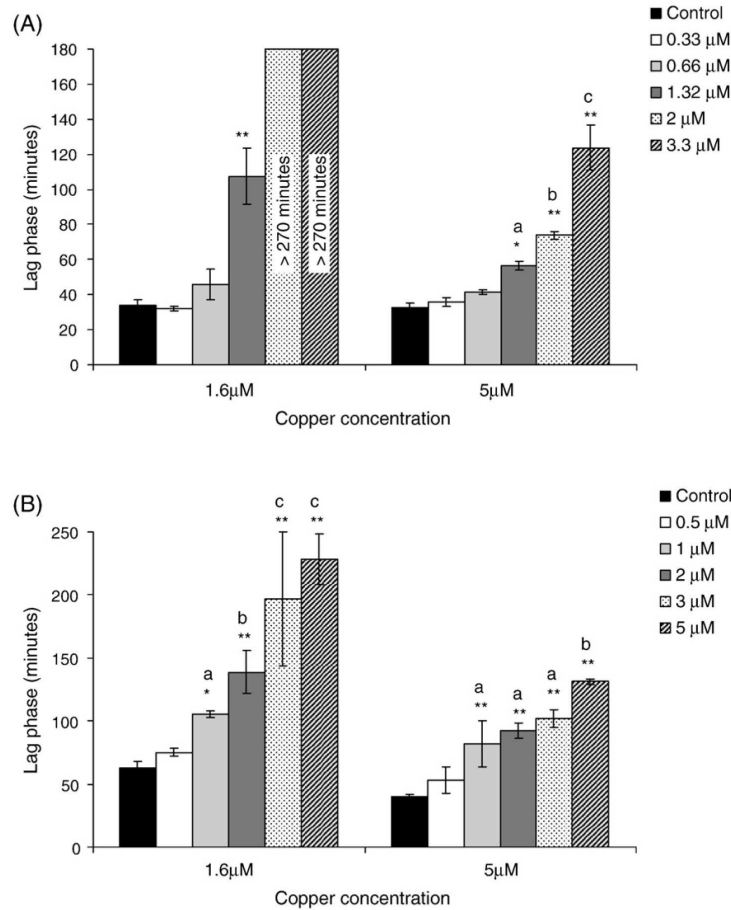


Fig. 2. Lag phase values for conjugated diene formation in isolated LDL. LDL (50 μg/mL) was oxidized in the presence of either 1.6 or 5 μM Cu²⁺, and different concentrations of oxime 1 (A) or oxime 2 (B). The values are expressed as mean ± S.D. of three independent experiments. Means with different letters (a,b,c) differ significantly ($p<0.05$) compared to the different oxime concentrations at the same Cu²⁺ concentration. “>270 min” indicate a lag phase higher than the time assay. * $p<0.01$ compared to control. ** $p<0.001$ compared to control.

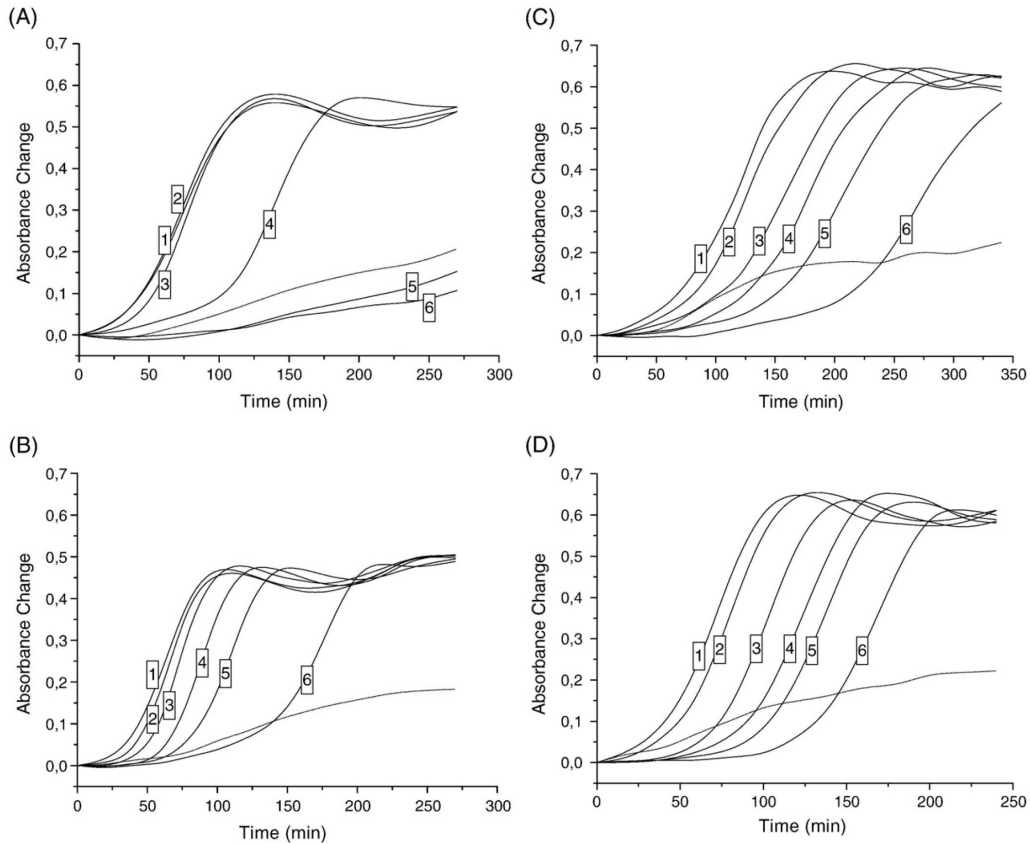


Fig. 3. Effects of oximes 1 and 2 on conjugated diene formation. LDL (50 μg protein/mL) was incubated in PBS 10 mM (pH 7.4) at 37 °C in the presence of 1.6 μM (panels A and C) or 5 μM (panels B and D) Cu²⁺. In panels A and B, incubation medium did not contain oxime (1) or contained 0.33 μM (2), 0.66 μM (3), 1.32 μM (4), 2 μM (5) or 3.3 μM (6) of oxime 1. In panels C and D, incubation medium did not contain oxime (1) or contained 0.5 μM (2), 1 μM (3), 2 μM (4), 3 μM (5) or 5 μM (6) of oxime 2. Conjugated diene formation was measured by determining the absorbance at 234 nm every 20 min. Dashed line represents the control without Cu²⁺ and oxime.

recorded at 180 min (Tables 1 and 2). In addition, oxime 1 at 3.3 μM was also able to keep a low LDL TBARS formation induced by 5 μM Cu²⁺ during 90 min compared to 30 min caused by control (Table 1). A

similar effect was found for oxime 2, when at 5 μM it could inhibit an increase of TBARS formation induced by 5 μM Cu²⁺ during 120 min (Table 2).

Table 1
Effects of oxime 1 concentrations on time-dependent changes in the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) production during LDL oxidation

[Oxime 1]		Time (min)							
		0	30	60	90	120	150	180	
1.6 μM CuSO ₄	Control	0.268±0.099	0.623±0.099	1.426±0.102	3.116±0.853	3.909±0.535	4.067±0.086	4.537±0.333	
	0.33 μM	0.273±0.068	0.541±0.087	1.891±0.351	3.558±0.747	4.329±0.63	4.581±0.216	4.701±0.226	
	0.66 μM	0.235±0.119	0.454±0.109	1.29±0.123	3.176±0.224	4.132±0.244	4.718±0.406	4.882±0.365	
	1.32 μM	0.241±0.112	0.306±0.137*	0.514±0.093***	0.705±0.177***	1.579±0.934***	3.192±0.902*	4.324±0.363	
	2 μM	0.257±0.074	0.262±0.102*	0.284±0.076***	0.295±0.091***	0.338±0.125***	0.432±0.053***	0.732±0.302***	
	3.3 μM	0.224±0.096	0.251±0.105*	0.279±0.028***	0.257±0.096***	0.273±0.109***	0.366±0.05***	0.426±0.065***	
5 μM CuSO ₄	Control	0.301±0.038	0.541±0.059	1.995±0.174	3.149±0.245	3.859±0.277	4.018±0.066	3.952±0.156	
	0.33 μM	0.317±0.009	0.404±0.058	1.968±0.215	3.236±0.133	4.045±0.282	4.078±0.235	4.138±0.109	
	0.66 μM	0.289±0.05	0.366±0.053*	1.41±0.197**	3.105±0.175	4.116±0.247	4.214±0.085	4.368±0.068	
	1.32 μM	0.273±0.034	0.328±0.098*	0.814±0.139***	2.165±0.288***	4.1±0.271	4.351±0.137	4.412±0.198	
	2 μM	0.273±0.038	0.311±0.082*	0.541±0.099***	1.115±0.166***	3.28±0.327*	4.056±0.133	4.597±0.104	
	3.3 μM	0.268±0.066	0.295±0.098*	0.437±0.093***	0.601±0.077***	1.137±0.401***	1.913±0.771***	3.728±0.779	

LDL (50 μg protein/mL) was incubated at 37 °C in the presence of 1.6 μM or 5 μM Cu²⁺. Data are expressed as mean ±SD of three experiments. The values were expressed by nmol MDA/20 μg protein LDL.

*p<0.05 compared to control.

**p<0.01 compared to control.

***p<0.001 compared to control.

Table 2
Effects of oxime 2 concentrations on time-dependent changes in the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) production during LDL oxidation

	[Oxime 2]	Time (min)						
		0	30	60	90	120	150	180
1.6 μM CuSO_4	Control	0.333 \pm 0.025	0.508 \pm 0.087	0.743 \pm 0.081	1.066 \pm 0.033	1.864 \pm 0.162	2.547 \pm 0.121	3.439 \pm 0.438
	0.5 μM	0.312 \pm 0.049	0.399 \pm 0.104	0.585 \pm 0.119	0.765 \pm 0.062***	1.372 \pm 0.175***	2.094 \pm 0.221*	3.121 \pm 0.348
	1 μM	0.323 \pm 0.041	0.372 \pm 0.095	0.481 \pm 0.127*	0.596 \pm 0.025***	0.875 \pm 0.053***	1.378 \pm 0.114***	2.438 \pm 0.279*
	2 μM	0.344 \pm 0.082	0.355 \pm 0.109	0.372 \pm 0.090**	0.377 \pm 0.033***	0.514 \pm 0.125***	0.754 \pm 0.268***	1.498 \pm 0.528***
	3 μM	0.344 \pm 0.028	0.372 \pm 0.123	0.366 \pm 0.058**	0.361 \pm 0.028***	0.366 \pm 0.074***	0.476 \pm 0.248***	0.869 \pm 0.387***
	5 μM	0.377 \pm 0.059	0.377 \pm 0.128	0.333 \pm 0.058**	0.344 \pm 0.028***	0.290 \pm 0.053***	0.394 \pm 0.059***	0.590 \pm 0.124***
5 μM CuSO_4	Control	0.273 \pm 0.053	0.426 \pm 0.134	1.350 \pm 0.341	2.799 \pm 0.204	3.974 \pm 0.156	4.395 \pm 0.173	4.526 \pm 0.087
	0.5 μM	0.246 \pm 0.059	0.312 \pm 0.087	0.820 \pm 0.371*	1.963 \pm 0.587**	3.734 \pm 0.409	4.291 \pm 0.200	4.630 \pm 0.175
	1 μM	0.224 \pm 0.053	0.257 \pm 0.066	0.410 \pm 0.199***	0.891 \pm 0.341***	2.465 \pm 0.853**	3.663 \pm 0.660	4.439 \pm 0.263
	2 μM	0.235 \pm 0.090	0.273 \pm 0.038	0.301 \pm 0.116***	0.590 \pm 0.091***	1.957 \pm 0.381***	3.389 \pm 0.423*	4.351 \pm 0.181
	3 μM	0.224 \pm 0.053	0.241 \pm 0.081	0.284 \pm 0.074***	0.426 \pm 0.043***	1.350 \pm 0.279***	2.826 \pm 0.390**	4.111 \pm 0.208
	5 μM	0.213 \pm 0.085	0.262 \pm 0.071	0.257 \pm 0.083***	0.394 \pm 0.043***	0.525 \pm 0.085***	1.121 \pm 0.166***	2.908 \pm 0.320***

LDL (50 μg protein/mL) was incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ in the presence of 1.6 μM or 5 μM Cu^{2+} . Data are expressed as mean \pm SD of three experiments. The values are expressed by nmol MDA/20 μg protein LDL.

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

*** $p < 0.001$.

Effects of oximes on the LDL tryptophan fluorescence

Fig. 4 reports the time course of Trp fluorescence decrease during Cu^{2+} -induced LDL oxidation. The LDL incubated with different concentrations of oxime 1 shows an increase in $t_{1/2}$ of Trp in a concentration-dependent manner ($r^2 = 0.928$, $p < 0.001$, Fig. 4A). When compared to the control group, the presence of oxime 2 at concentrations from 2 to 5 μM significantly increased $t_{1/2}$ of Trp (Fig. 4B) in a concentration-dependent manner ($r^2 = 0.792$, $p < 0.001$). At higher oxime concentrations used here the $t_{1/2}$ of Trp was prolonged to more than 150 min (Fig. 5).

The effect of oximes on serum oxidation

Serum oxidation was determined by CD formation at 245 nm (Fig. 6). No oxidation occurred in serum when the medium did not contain Cu^{2+} ions. Table 3 shows that oxime 1 was able to cause a significant increase in the lag phase at concentrations ranging from 0.5 to 1.32 μM . Oxime 2 was also able to increase the lag phase at the concentration of 0.75 μM or higher. Both oximes caused an increase of lag phase in a concentration dependent manner (oxime 1: $r^2 = 0.942$, $p < 0.001$; oxime 2: $r^2 = 0.918$, $p < 0.001$, linear regression). Interestingly, both oximes were found to decrease the maximum oxidation rate at higher concentrations tested here (Table 3), different from what we found on LDL experiments.

Discussion

Our study investigated the antioxidant effect of two different oximes in different parameters of Cu^{2+} induced lipid peroxidation in human serum and isolated LDL. The results showed that the oximes tested here exhibit a concentration depend increase in the lag phase of LDL (Fig. 2) and serum oxidation (Table 3). The lag phase determination, which represents the intrinsic resistance of LDL to oxidation, is widely used in studies to test possible antiatherogenic compounds. This fact is governed by factors such as the lipid composition of the particle, the concentration of chain breaking antioxidants and the levels of seeding or endogenous lipid hydroperoxides (Reaven et al., 1991; Esterbauer et al., 1992; O'Leary et al., 1992; Frei and Gaziano, 1993; Kontush et al., 1994; Thomas et al., 1994). Several studies suggest that subjects whose LDL exhibits a short lag phase may belong to a group with a higher risk for atherosclerosis (Regnström et al., 1992; Maggi et al., 1994; De Rijke et al., 1995). There is increasing evidence that oxidative modifications of LDL play a pivotal role in the development of atherosclerosis (Witztum, 1994). Although the process of LDL oxidation remains unclear, the major mechanisms currently explored are metal ions dyshomeostasis (Swain and Gutteridge, 1995),

changes in lipoxygenase and myeloperoxidase-related pathways (Parthasarathy et al., 1989; Daugherty et al., 1994), reactive oxygen and nitrogen species generation, and alterations in the thiol status (Halliwell, 1995). In fact, endogenous and exogenous compounds with antioxidant activity have been reported to display beneficial effects against LDL oxidation (Lass et al., 1996; Lapenna et al., 1998; Alul et al., 2003; Bem et al., 2008). In view of this, we could suggest that these preliminary results indicate that the oximes tested here could be considered as a promising antiatherogenic compound.

The protective effect against LDL oxidation can occur via several mechanisms, such as (A) scavenging peroxy radicals, which break the peroxidation chain reaction, (B) chelating free Cu^{2+} to form redox-inactive complexes and thus reducing metal-catalyzed oxidation of LDL, (C) inhibiting the binding of Cu^{2+} to apolipoproteins and subsequently preventing the modification of amino acid-apoB protein residue (Berrougui et al., 2006). Since the LDL oxidation employs copper as catalyst, the formation of an oxime-copper complex could not be ruled out for discussion of our results. In LDL oxidation, oxime 1 was able to decrease the propagation rate at higher concentrations tested. In contrast, no change in the propagation rate was found when oxime 2 was used. In the LDL oxidation experiments, some oximes concentrations are smaller than copper. Then, even if the complex is quantitatively formed, the free copper concentration would be only slightly decreased. Thus, complex formation could protect the LDL if it competes with copper adsorption on the LDL, a pre-requisite for the initiation of the chain oxidation process. In line with this, this competition would lead to a decrease in the propagation rate after the lag time. This effect is observed only to oxime 1 (Fig. 3) suggesting that its protection could be due to a complex formation (López-Alarcón et al., 2007; Ziouzenkova et al., 1998). The prolongation of lag phase by oxime 2 without reduction of the propagation rate could be explained by the proposal of an inhibitory action of oxime 2 on the initiation of lipid peroxidation, during which the antioxidant is consumed and would thus not exert any further effect on the propagation of lipid peroxidation (Esterbauer et al., 1989), suggesting that its protection could not be due to a complex formation.

Formation of lipid hydroperoxides is generally accepted as an early event in LDL oxidation (Girotti, 1998), and it is known that such peroxides can decompose to further radicals and eventually to aldehydes such as malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. These aldehydes react with lysine amino groups on proteins to give adducts (Kawamura et al., 2000; Refsgaard et al., 2000). The formation of these adducts, which facilitate the recognition of oxidized LDL by the scavenger receptor, may unregulate uptake of LDL-cholesterol into cells (Kawamura et al., 1994). The antioxidant properties of oximes to prevent the LDL oxidation were supported by the inhibition of TBARS

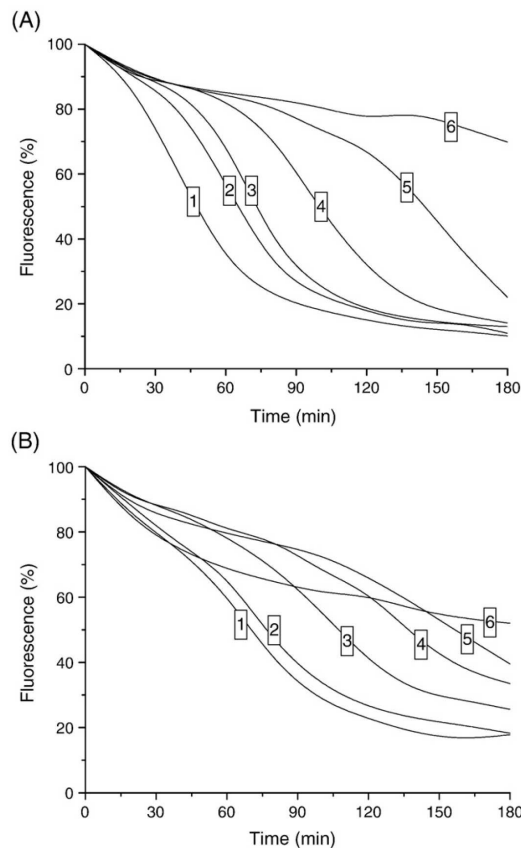


Fig. 4. Decrease of Trp fluorescence during Cu^{2+} -mediated oxidation of LDL with different concentrations of oximes. LDL (50 μg protein/mL) was incubated in PBS with 5 μM Cu^{2+} . Fluorescence (Ex/Em=282/331 nm) was measured at intervals of 20 min at 37 °C. In (A), the incubation medium did not contain oxime (1) or contained 0.33 μM (2), 0.66 μM (3), 1.32 μM (4), 2 μM (5) or 3.3 μM (6) of oxime 1. In (B), the incubation medium did not contain oxime (1) or contained 0.5 μM (2), 1 μM (3), 2 μM (4), 3 μM (5) or 5 μM (6) of oxime 2.

formation. Our results showed that oxime 1 at 3.3 μM and oxime 2 at 5 μM efficiently prevented the TBARS production after 180 min of 1.6 μM Cu^{2+} exposition.

The peroxidation of polyunsaturated fatty acids is, however, only one of the oxidative modifications occurring within the LDL particles exposed to oxidizing conditions. Other structural changes include the loss of Trp in ApoB-100. Destruction of Trp is an early event in Cu^{2+} -mediated LDL oxidation and it plays an important role in initiating the oxidation of the lipids in the LDL particle (Giessauf et al., 1995). Intrinsic ApoB-100 fluorescence has been widely used to monitor protein oxidative damages in Cu^{2+} -oxidized LDL. Our results showed that both oximes were able to prevent the Trp destruction by increasing the time to reach the half Trp fluorescence ($t_{1/2}$) (Fig. 5). Oxime 1 (2 μM) increased the $t_{1/2}$ approximately 340% compared to control, while oxime 2 at 5 μM increased the $t_{1/2}$ about 230%. This corroborates with the diene results (Fig. 2) where oxime 1 had a better activity than oxime 2. The inhibitory effect of the Trp destruction observed by both oximes contributes to their potential antioxidant effect on Cu^{2+} -induced LDL and serum oxidation. According to these evidences, oximes may interfere with LDL oxidation by interacting with some Cu^{2+} binding sites on ApoB-100 and/or should prevent the Cu^{2+} -Trp interaction by interacting directly with Cu^{2+} .

It has been suggested that LDL oxidation induced in vitro in whole plasma reflects the oxidation in vivo more adequately than in vitro oxidation of the isolated LDL (Spranger et al., 1998). LDL oxidation in vivo, however, is thought to take place in the interstitial space of the arterial wall where LDL may be shielded from the various antioxidants present in plasma (Schwartz et al., 1991; Witztum and Steinberg, 1991). Moreover, Dabbagh and Frei (1995) have examined human suction blister interstitial fluid (SBIF) as a representative of aortic intimal interstitial fluid and found that the concentrations of the aqueous antioxidant ascorbate and urate were similar to serum, and that SBIF also contained human serum albumin at 30% of the level in serum. Thus, we assessed the antioxidant capacity of oximes for lipoprotein protection using human serum. Our results showed again a significant increase in lag phase for both oximes in Cu^{2+} -induced serum oxidation (Table 3). Oxime 1 depicted superior potency as antioxidant when compared to oxime 2 as showed by Cu^{2+} -induced LDL oxidation. Additionally, oximes were more effective in preventing serum oxidation than LDL oxidation, which can be related to the high antioxidant concentrations present in serum. Karten et al., 1997 have found that the plasma supplementation (in vitro) with albumin, urate and bilirubin, considerably decreases its oxidizability measured as the

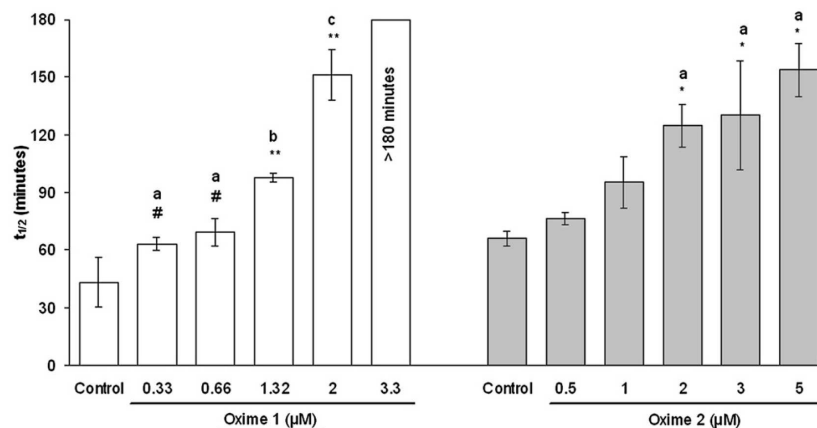


Fig. 5. Oxidation $t_{1/2}$ values for Trp fluorescence. LDL (50 μg /mL) was oxidized in the presence of 5 μM Cu^{2+} , and different concentrations of oximes 1 or 2. The values are expressed as mean \pm S.D. of three independent experiments. Means with different letters (a,b,c) differ very significantly ($p < 0.05$) compared to different oxime concentrations. ">180 min" indicate a lag phase higher than the time assay. # $p < 0.05$ compared to control. # $p < 0.01$ compared to control. ** $p < 0.001$ compared to control.

CD production. Our results demonstrated that serum components could not inhibit or impair the oximes effects.

Nevertheless, both oximes were able to decrease the propagation rate in serum oxidation at low concentrations. This difference, mainly regarding oxime 2, may be due to the fact that human serum albumin and uric acid in the presence of high Cu^{2+} concentrations provides a peroxidase-like activity (Proudfoot et al., 1997) and lipid peroxides formed during the lag phase may become degraded. This fact, combined to the oxime activity, contributed to decrease the rate of lipid peroxidation in serum oxidation.

In conclusion, our results demonstrated for the first time that oximes exhibited a protective role during in vitro Cu^{2+} -induced LDL and serum oxidation. Additionally, oxime 1 showed to be more effective than oxime 2 in all parameters analyzed here. This antioxidant activity may contribute to prevent LDL oxidation in vivo and thus the atherogenesis. In view of this, we could speculate that oximes may be studied as potential antiatherogenic compound besides their well described role as antidote for organophosphate

Table 3

Lag phase and maximum oxidation rate for conjugated diene formation in serum

		Lag phase (min)	Maximum oxidation rate (E234 nm/min)
[Oxime 1]	Control	0	0.005±0.00023
	0.33 µM	11±2.04	0.005±0.00085
	0.5 µM	25.67±10.97 * a	0.005±0.00042
	0.66 µM	47.40±5.7 ** b	0.004±0.00022 #
	1 µM	94.57±11.45 ** c	0.004±0.000173 #
	1.32 µM	134.52±3.4 ** d	0.003±0.000176 #
[Oxime 2]	Control	12.40±1.74	0.005±0.00025
	0.5 µM	15.70±0.67	0.004±0.00056 # a
	0.75 µM	27.14±6.74 * a	0.004±0.00023 # a
	1 µM	29.79±3.61 * a	0.005±0.00007 # a
	1.5 µM	50.37±1.99 ** b	0.004±0.0001 * b
	2 µM	67.44±8.03 ** c	0.003±0.00027 ** c

Serum was oxidized in the presence of 30 µM Cu^{2+} , and different concentrations of oximes 1 or 2. The values are expressed as mean±S.D. of three independent experiments. Means with different letters (a,b,c,d) differ significantly ($p<0.05$) compared to different oxime concentrations at the same Cu^{2+} concentration. ND: Not determined.

$p<0.05$ compared to control.

* $p<0.01$ compared to control.

** $p<0.001$ compared to control.

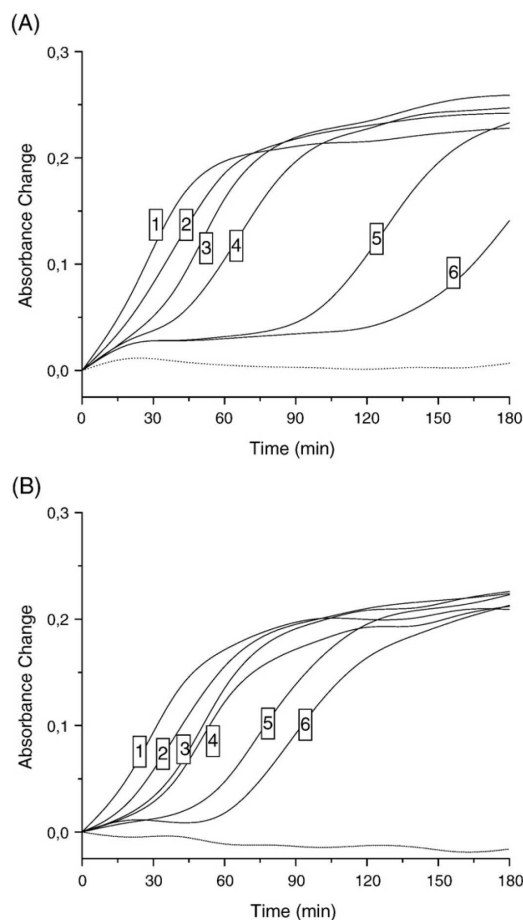


Fig. 6. Effects of oxime concentrations on conjugated diene formation during serum oxidation. Serum (diluted 100-fold) in PBS 10 mM (pH7.4) was incubated at 37 °C for 180 min in the presence of 30 µM Cu^{2+} . (A) shows oxime 1 effects where incubation medium did not contain oxime (1) or contained 0.33 µM (2), 0.5 µM (3), 0.66 µM (4), 1 µM (5) or 1.32 µM (6). (B) shows the oxime 2 effects where the incubation medium did not contain oxime (1) or contained 0.5 µM (2), 0.75 µM (3), 1 µM (4), 1.5 µM (5) or 2 µM (6). Conjugated diene formation was measured by determining the absorbance at 245 nm every 20 min.

poisoning. However, further studies are needed to clarify the antioxidant properties against other models of free radical generators and the molecular mechanism in which oximes prevent LDL oxidation caused by Cu^{2+} .

Acknowledgements

Work supported by the FINEP research grant "Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)" # 01.06.0842-00. J.B.T.R and F.A. A.S. received a fellowship from CNPq/UFSM. Additional supports were given by FAPERGS and CAPES.

References

- Alul, R.H., Wood, M., Longo, J., Marcotte, A.L., Campione, A.L., Moore, M.K., Lynch, S.M., 2003. Vitamin C protects low-density lipoprotein from homocysteine-mediated oxidation. *Free Radical Biology and Medicine* 34, 881–891.
- Aviram, M., Hardak, E., Vaya, J., Mahmood, S., Milo, S., Hoffman, A., Billicke, S., Draganov, D., Rosenblat, M., 2000. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation* 101, 2510–2517.
- Bem, A.F., Farina, M., Portella, R.L., Nogueira, C.W., Dinis, T.C.P., Laranjinha, J.A.N., Almeida, L.M., Rocha, J.B., 2008. Diphenyl diselenide, a simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 201, 92–100.
- Berrougui, H., Cloutier, M., Isabelle, M., Khalil, A., 2006. Phenolic-extract from argan oil (*Argania spinosa* L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 184, 389–396.
- Carpenter, K.L., Taylor, S.E., van der Veen, C., Williamson, B.K., Ballantine, J.A., Mitchinson, M.J., 1995. Lipids and oxidized lipids in human atherosclerotic lesions at different stages of development. *Biochimica et Biophysica Acta* 1256, 141–150.
- Cathcart, M.K., Morel, D.W., Chisolm, G.M., 1985. Monocytes and neutrophils oxidize low density lipoprotein making it cytotoxic. *Journal of Leukocyte Biology* 38, 341–350.
- Cynshi, O., Kawabe, Y., Suzuki, T., Takashima, Y., Kaise, H., Nakamura, M., Ohba, Y., Kato, Y., Tamura, K., Hayasaka, A., Higashida, A., Sakaguchi, H., Takeya, M., Takahashi, K., Inoue, K., Noguchi, N., Niki, E., Kodama, T., 1998. Antiatherogenic effects of the antioxidant BO-653 in three different animal models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 10123–10128.
- Dabbagh, A., Frei, B., 1995. Human suction blister interstitial fluid prevents metal ion-dependent oxidation of low density lipoprotein by macrophages and in cell-free systems. *The Journal of Clinical Investigation* 96, 1958–1966.
- Daugherty, A., Dunn, J.L., Rateri, D.L., Heinecke, J.W., 1994. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *The Journal of Clinical Investigation* 94, 437–444.
- De Rijke, Y.B., Verwey, H.F., Vogelezang, C.J., Van Der Velde, E.A., Princen, H.M., Van Der Laarse, A., Brusckhe, A.V., Van Berkel, T.J., 1995. Enhanced susceptibility of low density lipoproteins to oxidation in coronary bypass patients with progression of atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 243, 137–149.

- Durrington, P.N., Mackness, B., Mackness, M.I., 2001. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21, 473–480.
- Esterbauer, H., 1993. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *The American Journal of Clinical Nutrition* 57, 779S–785S.
- Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H., Rotheneder, M., 1989. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radical Research Communications* 6, 67–75.
- Esterbauer, H., Gebick, J., Puhl, H., Jürgens, G., 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine* 13, 341–390.
- Frei, B., Gaziano, J.M., 1993. Content of antioxidants, preformed lipid hydroperoxides, and cholesterol as predictors of the susceptibility of human low density lipoprotein to metal ion dependent and -independent oxidation. *Journal of Lipid Research* 34, 2135–2145.
- Gieseg, S.P., Esterbauer, H., 1994. Low density lipoprotein is saturable by pro-oxidant copper. *FEBS Letters* 343, 188–194.
- Giessauf, A., Steiner, E., Esterbauer, H., 1995. Early destruction of tryptophan residues of apolipoprotein B is a vitamin E-independent process during copper-mediated oxidation of LDL. *Biochimica et Biophysica Acta* 1256, 221–232.
- Girotti, A.W., 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research* 39, 1529–1542.
- Gotoh, N., Noguchi, N., Suchiyaj, T., Morita, K., Sakai, H., Shimasaki, H., Niki, E., 1996. Inhibition of oxidation of LDL by vitamin E and related compounds. *Free Radical Research* 24, 123–134.
- Gray, A.P., 1984. Design and structure-activity relationships of antidotes to organophosphorus anticholinesterase agents. *Drug Metabolism Reviews* 15, 557–589.
- Halliwel, B., 1995. Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Annals of the Rheumatic Diseases* 54, 505–510.
- Hansson, G.K., 2001. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21, 1876–1890.
- Hazell, L.J., Arnold, L., Flowers, D., Waeg, G., Malle, E., Stocker, R., 1996. Presence of hypochlorite-modified proteins in human atherosclerotic lesions. *The Journal of Clinical Investigation* 97, 1535–1544.
- Heinecke, J.W., Baker, H., Rosen, H., Chait, A., 1986. Superoxide mediated modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells. *The Journal of Clinical Investigation* 77, 757–762.
- Heinecke, J.W., Kawamura, M., Suzuki, L., Chait, A., 1993. Oxidation of low density lipoprotein by thiols: superoxide dependent and independent mechanisms. *Journal of Lipid Research* 34, 2051–2061.
- Hiramatsu, K., Rosen, H., Heinecke, J.W., Wolfbauer, G., Chait, A., 1987. Superoxide initiates oxidation of low density lipoprotein by human monocytes. *Arteriosclerosis* 7, 55–60.
- Jialal, I., Devaraj, S., 1996. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clinical Chemistry* 42, 498–506.
- Karten, B., Beisiegel, U., Gercken, G., Kontush, A., 1997. Mechanisms of lipid peroxidation in human blood plasma: a kinetic approach. *Chemistry and Physics of Lipids* 88, 83–96.
- Kawamura, M., Heinecke, J.W., Chait, A., 1994. Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide-dependent pathway. *The Journal of Clinical Investigation* 94, 771–778.
- Kawamura, M., Heinecke, J.W., Chait, A., 2000. Increased uptake of alpha-hydroxy aldehyde-modified low density lipoprotein by macrophage scavenger receptors. *Journal of Lipid Research* 41, 1054–1059.
- Kontush, A., Hubner, C., Finckh, B., Kohlshutter, A., Beisiegel, U., 1994. Low density lipoprotein oxidizability by copper correlates to its initial ubiquinol 10 and polyunsaturated fatty acid content. *FEBS Letters* 341, 69–73.
- Lapenna, D., de Gioia, S., Ciofani, G., Bruno, C., Porreca, E., Pierdomenico, S.D., Cucurullo, F., 1998. Antioxidant properties of ticlopidine on human low density lipoprotein oxidation. *FEBS Letters* 436, 357–360.
- Lass, A., Witting, P., Stocker, R., Esterbauer, H., 1996. Inhibition of copper- and peroxyl radical-induced LDL lipid oxidation by ebelsen: antioxidant actions in addition to hydroperoxide-reducing activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1303, 111–118.
- Libby, P., 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868–874.
- López-Alarcón, C., Speisky, H., Lissi, E., 2007. Antioxidant effect of 5-amino salicylic acid on copper-mediated LDL oxidation. *Biological Research* 40, 155–162.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.
- Mackness, M., Durrington, P., Mackness, B., 2004. Paraoxonase 1 activity, concentration and genotype in cardiovascular disease. *Current Opinion in Lipidology* 15, 399–404.
- Maggi, E., Belazzi, R., Falaschi, F., Frattoni, A., Perani, C., Finardi, G., Gazo, A., Nai, M., Romanini, D., Bellomo, G., 1994. Enhanced LDL oxidation in uremic patients: An additional mechanism for accelerated atherosclerosis? *Kidney International* 45, 876–883.
- Menache, R., Kenda, L., Shaked, P., Schwartzman, S., Lewinski, U., 1982. The prognostic value of serum acetylcholinesterase in myocardial infarction. Theoretical and clinical considerations. *Research in Experimental Medicine (Berl.)* 181, 181–187.
- Nandi, A.K., Chaudhuri, S., Mazumdar, S.K., 1984. Structure of 3-hydroxyimino-2-butanone thiosemicarbazone, a tridentate N-S ligand, C5H10N4OS. *Acta Crystallographica C* 40, 1193–1196.
- O'Leary, V.J., Darley-Usmar, V.M., Russell, L.J., Stone, D., 1992. Pro-oxidant effects of lipoxygenase-derived peroxides on the copper-initiated oxidation of low density lipoprotein. *The Biochemical Journal* 282, 631–634.
- Ohkawa, H., Ohishi, H., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95, 351–358.
- Parthasarathy, S., Printz, D.J., Boyd, D., Joy, L., Steinberg, D., 1986. Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis* 6, 505–510.
- Parthasarathy, S., Quinn, M.T., Schwenke, D.C., Carew, T.E., Steinberg, D., 1989. Oxidative modification of beta-very low density lipoprotein. Potential role in monocyte recruitment and foam cell formation. *Arteriosclerosis* 9, 398–404.
- Proudfoot, J.M., Puddey, L.B., Beilin, L.J., Stocker, R., Croft, K.D., 1997. Unexpected dose response of copper concentration on lipoprotein oxidation in serum: discovery of a unique peroxidase-like activity of urate/albumin in the presence of high copper concentrations. *Free Radical Biology and Medicine* 23, 699–705.
- Puntel, G.O., Gubert, P., Peres, G.L., Bresolin, L., Rocha, J.B.T., Pereira, M.E., Carratu, V.S., 2008. Antioxidant properties of oxime 3-(phenylhydrazono) butan-2-one. *Archives of Toxicology* 82, 755–762.
- Reaven, P., Parthasarathy, S., Grasse, B.J., Miller, E., Alonazan, F., Mattson, F.H., Khoo, J.C., Steinberg, D., Witztum, J.L., 1991. Feasibility of using an oleate rich diet to reduce the susceptibility of LDL to oxidative modification in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 54, 701–706.
- Refsgaard, H.H.F., Tsai, L., Stadtman, E.R., 2000. Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 611–616.
- Regnström, J., Nilsson, J., Tornvall, P., Landau, C., Hamsten, A., 1992. Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet* 339, 1183–1186.
- Reyftmann, J.P., Santus, R., Mazière, J.C., Morlière, J.C., Salmon, S., Candide, C., Mazière, C., Haigle, J., 1990. Sensitivity of tryptophane and related compounds to oxidation induced by lipid autooxidation. Application to human low- and high-density lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1042, 159–167.
- Rice-Evans, C., Leake, D., Bruckdorfer, R., Diplock, A.T., 1996. Practical approaches to low density lipoprotein oxidation: whys, wherefores and pitfalls. *Free Radical Research* 25, 285–311.
- Schnitzer, E., Pinchuk, I., Bor, A., Fainaru, M., Samuni, A.M., Lichtenberg, D., 1998. Lipid oxidation in unfractionated serum and plasma. *Chemistry and Physics of Lipids* 92, 151–170.
- Schwartz, C.J., Valente, A.J., Sprague, E.A., Kelley, J.L., Nerem, R.M., 1991. The pathogenesis of atherosclerosis: an overview. *Clinical Cardiology* 14, 11–116.
- Silva, A.P., Farina, M., Franco, J.L., Dafre, A.L., Kassa, J., Kuca, K., 2008. Temporal effects of newly developed oximes (K027, K048) on malathion-induced acetylcholinesterase inhibition and lipid peroxidation in mouse prefrontal cortex. *Neurotoxicology* 29, 184–189.
- Silva, E.L., Tshida, T., Terao, J., 1998. Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent LDL lipid peroxidation by quercetin and quercetinmonoglucosides. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 349, 313–320.
- Spranger, T., Finckh, B., Fingerhut, R., Kohlschütter, A., Beisiegel, U., Kontush, A., 1998. How different constituents of human plasma and low density lipoprotein determine plasma oxidizability by copper. *Chemistry and Physics of Lipids* 91, 39–52.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., Witztum, J.L., 1989. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *The New England Journal of Medicine* 320, 915–924.
- Steinbrecher, U.P., Parthasarathy, S., Lee, D.C., Witztum, J.L., Steinberg, D., 1984. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 3883–3887.
- Suarna, C., Dean, R.T., May, J., Stocker, R., 1995. Human atherosclerotic plaque contains both oxidized lipids and relatively large amounts of α -tocopherol and ascorbate. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15, 1616–1624.
- Swain, J., Gutteridge, J.M., 1995. Prooxidant iron and copper, with ferroxidase and xanthine oxidase activities in human atherosclerotic material. *FEBS Letters* 368, 513–515.
- Tangirala, R.K., Casanada, F., Miller, E., Witztum, J.L., Steinberg, D., Palinski, W., 1995. Effect of the antioxidant N,N'-diphenyl 1,4-phenylenediamine (DPPD) on atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Journal of Lipid Research* 15, 1625–1630.
- Thomas, J.P., Kalyanaraman, B., Girotti, A.W., 1994. Involvement of preexisting lipid hydroperoxides in copper stimulated oxidation of low density lipoprotein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 315, 244–254.
- Walzem, R.L., Watkins, S., Frankel, E.N., Hansen, R.J., German, J.B., 1995. Older plasma lipoproteins are more susceptible to oxidation: linking mechanism for the lipid and oxidation theories of atherosclerotic cardiovascular disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7460–7464.
- Witting, P.K., Pettersson, K., Ostlund-Lindqvist, A.M., Westerlund, C., Eriksson, A.W., Stocker, R., 1999. Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low-density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13, 667–675.
- Witztum, J.L., Steinberg, D., 1991. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *The Journal of Clinical Investigation* 88, 1785–1792.
- Witztum, J.L., 1994. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 344, 793–795.
- Ylä-Herttuala, S., Palinski, W., Rosenfeld, M.E., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Butler, S., Witztum, J.L., Steinberber, D., 1989. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *The Journal of Clinical Investigation* 84, 1086–1095.
- Ziuzenkov, O., Sevanian, A., Abuja, P.M., Ramos, P., Esterbauer, H., 1998. Copper can promote oxidation of LDL by markedly different mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine* 24, 607–623.

3. DISCUSSÃO

A oxidação da LDL é um dos mecanismos característicos que marcam o começo da aterogênese (Parthasarathy, Santanam *et al.*, 1999; Chisolm e Steinberg, 2000). Assim, um suprimento da LDL com antioxidantes poderia proteger a sua oxidação e inibir o desenvolvimento da aterosclerose.

A formação de dienos conjugados e o decréscimo da fluorescência do triptofano catalisados por Cu^{2+} têm sido usados como reações sensíveis e relevantes para testar a susceptibilidade da LDL à oxidação (Giessauf, Steiner *et al.*, 1995; Patel e Darley-Usmar, 1999). Estes sistemas permitem também avaliar a capacidade antioxidante de diferentes compostos. Considerando isto, investigou-se o efeito das oximas 3-(fenil hidrazona) butano-2-ona e butano-2,3-dionatiosemicarbazona *in vitro* na proteção contra a oxidação de LDL humana isolada. Nossos resultados demonstram que ambas as oximas testadas reduziram a oxidação da LDL causada por Cu^{2+} . As oximas induziram um aumento da fase lag na formação dos dienos conjugados, a qual informa a resistência da LDL à oxidação, tanto para a oxidação da LDL isolada quanto a do soro. Vários estudos mostram que indivíduos que apresentam reduzida fase lag têm um risco maior de desenvolver aterosclerose (Regnstrom, Nilsson *et al.*, 1992; Maggi, Bellazzi *et al.*, 1994; De Rijke, Verwey *et al.*, 1995). Diversos compostos que são efetivos em aumentar a fase lag da oxidação da LDL mostraram também reduzir o processo aterogênico em modelos de animais (Kim, Kim *et al.*, 2003; Deepa e Varalakshmi, 2005; Shakuto, Oshima *et al.*, 2005).

Outro aspecto muito importante deste estudo foi evidenciado pela capacidade das oximas em prevenir a perda da fluorescência do triptofano induzida pela oxidação das LDLs pelo Cu^{2+} . Este resultado indica que além dos efeitos benéficos relacionados à oxidação dos componentes lipídicos da LDL, estes compostos também previnem a oxidação das moléculas protéicas da LDL, como a Apo B100, contribuindo com um mecanismo adicional na inibição do processo aterogênico. A destruição do triptofano é um evento inicial na oxidação da LDL mediada pelo Cu^{2+} e tem uma importante função na iniciação da oxidação dos lipídios da LDL (Giessauf, Steiner *et al.*, 1995). Nossos resultados mostraram que ambas as oximas foram capazes de aumentar o $t_{1/2}$ da destruição do triptofano, sendo que a oxima 1 mostrou-se mais potente que a oxima 2, assim como nos resultados da formação de dienos conjugados.

A oxidação lipídica gera hidroperóxidos de lipídios, os quais podem se decompor em aldeídos como malondialdeído e 4-hidroxinonenal. Esses aldeídos podem reagir com o grupamento amino dos resíduos de lisina da apo B100 e modificar suas funções, tais como o reconhecimento da LDL pelos receptores celulares e desregular sua captação pelas células (Kawamura, Heinecke *et al.*, 1994; Kawamura, Heinecke *et al.*, 2000; Refsgaard, Tsai *et al.*, 2000). No nosso estudo foi verificado que as oximas inibiram de forma significativa a produção de TBARS.

Considerando que a oxidação da LDL *in vivo* ocorre no espaço intersticial da parede arterial, sugere-se que a oxidação da LDL no plasma total reflete melhor esse processo (Spranger, Finckh *et al.*, 1998). Assim, examinamos a capacidade antioxidante das oximas em proteger a oxidação da LDL em soro humano. Os resultados mostraram que as oximas causaram um aumento significativo na fase lag, sendo que a oxima 1 apresentou melhor efeito que a oxima 2. As oximas apresentaram maior potência em prevenir a formação de dienos conjugados em soro do que na LDL isolada. Este fato pode estar relacionado à alta concentração de antioxidantes presentes no soro. De acordo com tais constatações, foi mostrado que a suplementação do plasma com albumina, urato e bilirrubina diminui sua susceptibilidade a oxidação, medida através dos dienos conjugados (Karten, Beisiegel *et al.*, 1997). Esses resultados também indicam que a atividade das oximas não foi alterada por componentes presentes no soro.

O efeito protetor contra a oxidação da LDL pode ocorrer por diferentes mecanismos, tais como: (A) scavenger de radicais peroxil, os quais interrompem a reação de peroxidação em cadeia, (B) quelante de íons Cu^{2+} , formando complexos que inibem a capacidade do íon catalisar a oxidação, (C) inibição da ligação do Cu^{2+} na apolipoproteína e da conseqüente modificação dos aminoácidos ali presentes (Berrougui, Cloutier *et al.*, 2006). Neste sentido, nossos resultados mostraram que a oxima 1 foi capaz de reduzir a velocidade de propagação da oxidação da LDL nas maiores concentrações testadas (2 μM e 3,3 μM). Esse efeito não foi observado para a oxima 2. Assim, é possível a provável formação de um complexo entre a oxima 1 (butana-2,3-dionatiosemicarbazona) e o Cu^{2+} , pois isso evitaria que o Cu^{2+} ligasse na LDL, um pré-requisito para a iniciação do processo da oxidação em cadeia. Essa competição levaria a um decréscimo na velocidade de propagação da oxidação (Ziouzenkova, Sevanian *et al.*, 1998; López-Alarcón, Speisky *et al.*, 2007).

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação podemos inferir que:

- As oximas 3-(fenil hidrazona) butano-2-ona e butano-2,3-dionatiosemicarbazona foram eficazes em prevenir as modificações oxidativas da LDL in vitro mediadas por Cu^{2+} de uma maneira concentração dependente;
- Ambas as oximas foram capazes de prevenir tanto a peroxidação lipídica como a oxidação da apoproteína da LDL humana isolada;
- A prevenção da formação de dienos conjugados pelas oximas ocorreu de forma semelhante em LDL isolada e em soro, sugerindo que os componentes do soro não interferem na atividade das oximas contra a oxidação;
- Com base nos resultados obtidos com a velocidade de oxidação da LDL, presume-se que a atividade protetora da oxima butano-2,3-dionatiosemicarbazona pode estar relacionada à sua provável interação com os íons Cu^{2+} e que a da oxima 3-(fenil hidrazona) butano-2-ona apenas com a prevenção da formação de peróxidos de lipídios na fase inicial da oxidação.

5. PERSPECTIVAS

Baseado nos resultados apresentados nessa dissertação faz-se necessário:

- Analisar a habilidade das oximas 3-(fenil hidrazona) butano-2-ona e butana-2,3-dionatiosemicarbazona em prevenir modificações oxidativas na LDL mediadas por outros agentes oxidantes, tais como AAPH, Fe^{2+} e H_2O_2 e peroxinitrito;
- Investigar as oximas quanto à capacidade de quelar metais;
- Investigar os efeitos antioxidantes das oximas sobre as modificações oxidativas na LDL e em artérias *in vivo*;
- Analisar a possível atividade antiaterogênica das oximas 3-(fenil hidrazona) butano-2-ona e butana-2,3-dionatiosemicarbazona em modelos animais de aterosclerose;
- Comparar diferentes oximas sintetizadas recentemente quanto a sua estrutura molecular e sua atividade na prevenção das modificações oxidativas da LDL.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arena, J. M. Poisoning: Toxicology, Symptoms, Treatments. USA: Charles C. Thomas, v.4^a ed. 1979

Baynes, J. W. e S. R. Thorpe. Glycoxidation and lipoxidation in atherogenesis. Free Radic Biol Med, v.28, n.12, Jun 15, p.1708-16. 2000.

Berliner, J. A., M. Navab, *et al.* Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. Circulation, v.91, n.9, May 1, p.2488-96. 1995.

Berrougui, H., M. Cloutier, *et al.* Phenolic-extract from argan oil (*Argania spinosa* L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. Atherosclerosis v.184, p.389-396. 2006.

Bocan, T. M., S. B. Mueller, *et al.* Antiatherosclerotic effects of antioxidants are lesion-specific when evaluated in hypercholesterolemic New Zealand white rabbits. Exp Mol Pathol, v.57, n.1, Aug, p.70-83. 1992.

Bruckdorfer, K. R. Antioxidants and CVD. Proc Nutr Soc, v.67, n.2, May, p.214-22. 2008.

Carew, T. E., D. C. Schwenke, *et al.* Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect: evidence that antioxidants in vivo can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the progression of atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. Proc Natl Acad Sci U S A, v.84, n.21, Nov, p.7725-9. 1987.

Chisolm, G. M. e M. S. Penn. Oxidized lipoproteins and atherosclerosis. In: V. Fuster, R. Ross, *et al* (Ed.). Atherosclerosis and Coronary Artery Disease: Lippincott-Raven 1996. Oxidized lipoproteins and atherosclerosis, p.129-149

Chisolm, G. M. e D. Steinberg. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. Free Radic Biol Med, v.28, n.12, Jun 15, p.1815-26. 2000.

Costa, R. P. e M. M. S. Meale. Terapia nutricional oral em cardiologia. In: D. L. Waitzberg (Ed.). Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. São Paulo: Atheneu, v.1, 2002. Terapia nutricional oral em cardiologia, p.525-542

Covas, M. I., K. Nyyssonen, *et al.* The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. Ann Intern Med, v.145, n.5, Sep 5, p.333-41. 2006.

Da Silva, A. P., M. Farina, *et al.* Temporal effects of newly developed oximes (K027, K048) on malathion-induced acetylcholinesterase inhibition and lipid peroxidation in mouse prefrontal cortex. Neurotoxicology, v.29, n.1, Jan, p.184-9. 2008.

De Rijke, Y. B., H. F. Verwey, *et al.* Enhanced susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in coronary bypass patients with progression of atherosclerosis. Clin Chim Acta, v.243, n.2, Dec 29, p.137-49. 1995.

Deepa, P. R. e P. Varalakshmi. Atheroprotective effect of exogenous heparin-derivative treatment on the aortic disturbances and lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic diet fed rats. Clin Chim Acta, v.355, n.1-2, May, p.119-30. 2005.

Ehara, S., M. Ueda, *et al.* Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. Circulation, v.103, n.15, Apr 17, p.1955-60. 2001.

Esterbauer, H., M. Dieber-Rotheneder, *et al.* Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. Chem Res Toxicol, v.3, n.2, Mar-Apr, p.77-92. 1990.

Esterbauer, H., J. Gebicki, *et al.* The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. Free Radic Biol Med, v.13, n.4, Oct, p.341-90. 1992.

Esterbauer, H., G. Wag, *et al.* Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. Br Med Bull, v.49, n.3, Jul, p.566-76. 1993.

Fogelman, A. M., I. Shechter, *et al.* Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A, v.77, n.4, Apr, p.2214-8. 1980.

Fruebis, J., D. Steinberg, *et al.* A comparison of the antiatherogenic effects of probucol and of a structural analogue of probucol in low density lipoprotein receptor-deficient rabbits. J Clin Invest, v.94, n.1, Jul, p.392-8. 1994.

Giessauf, A., E. Steiner, *et al.* Early destruction of tryptophan residues of apolipoprotein B is a vitamin E-independent process during copper-mediated oxidation of LDL. Biochim Biophys Acta, v.1256, n.2, May 17, p.221-32. 1995.

Goldstein, J. L., Y. K. Ho, *et al.* Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. Proc Natl Acad Sci U S A, v.76, n.1, Jan, p.333-7. 1979.

Gorinstein, S., M. Zemser, *et al.* Comparative content of total polyphenols and dietary fiber in tropical fruits and persimmon. J Nutr Biochem, v.10, n.6, Jun, p.367-71. 1999.

Heinecke, J. W., H. Rosen, *et al.* Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. J Clin Invest, v.74, n.5, Nov, p.1890-4. 1984.

Henriksen, T., E. M. Mahoney, *et al.* Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. Proc Natl Acad Sci U S A, v.78, n.10, Oct, p.6499-503. 1981.

_____. Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. Arteriosclerosis, v.3, n.2, Mar-Apr, p.149-59. 1983.

Hessler, J. R., D. W. Morel, *et al.* Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity. Arteriosclerosis, v.3, n.3, May-Jun, p.215-22. 1983.

Hessler, J. R., A. L. Robertson, Jr., *et al.* LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. Atherosclerosis, v.32, n.3, Mar, p.213-29. 1979.

Holvoet, P., N. S. Jenny, *et al.* The relationship between oxidized LDL and other cardiovascular risk factors and subclinical CVD in different ethnic groups: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). Atherosclerosis, v.194, n.1, Sep, p.245-52. 2007.

Holvoet, P., S. B. Kritchevsky, *et al.* The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in well-functioning elderly people in the health, aging, and body composition cohort. Diabetes, v.53, n.4, Apr, p.1068-73. 2004.

Holvoet, P., A. Mertens, *et al.* Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.21, n.5, May, p.844-8. 2001.

Holvoet, P., J. Vanhaecke, *et al.* Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. Circulation, v.98, n.15, Oct 13, p.1487-94. 1998.

Hu, F. B. e W. C. Willett. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. JAMA, v.288, n.20, Nov 27, p.2569-78. 2002.

Itabe, H. Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified. Biol Pharm Bull, v.26, n.1, Jan, p.1-9. 2003.

Jessup, W. e D. S. Leake. Cell-mediated oxidation of lipoproteins. In: C. Rice-Evans e K. R. Bruckdorfer (Ed.). Oxidative Stress, Lipoproteins and Cardiovascular Dysfunction: Portland Press, 1995. Cell-mediated oxidation of lipoproteins

Karten, B., U. Beisiegel, *et al.* Mechanisms of lipid peroxidation in human blood plasma: a kinetic approach. Chemistry and Physics of Lipids v.88, p.83-96. 1997.

Kawamura, M., J. W. Heinecke, *et al.* Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide-dependent pathway. The Journal of Clinical Investigation v.94, p.771-778. 1994.

_____. Increased uptake of alpha-hydroxy aldehyde-modified low density lipoprotein by macrophage scavenger receptors. Journal of Lipid Research, v.41, p.1054-1059. 2000.

Keaney, J. F., Jr. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. Mol Aspects Med, v.21, n.4-5, Aug-Oct, p.99-166. 2000.

Keen, C. L., R. R. Holt, *et al.* Cocoa antioxidants and cardiovascular health. Am J Clin Nutr, v.81, n.1 Suppl, Jan, p.298S-303S. 2005.

Kim, B. J., Y. K. Kim, *et al.* A water-extract of the Korean traditional formulation Geiji-Bokryung-Hwan reduces atherosclerosis and hypercholesteremia in cholesterol-fed rabbits. Int Immunopharmacol, v.3, n.5, May, p.723-34. 2003.

Kita, T., Y. Nagano, *et al.* Probucol prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, an animal model for familial hypercholesterolemia. Proc Natl Acad Sci U S A, v.84, n.16, Aug, p.5928-31. 1987.

Krieger, M., S. Acton, *et al.* Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis. Structure, binding properties, and functions of macrophage scavenger receptors. J Biol Chem, v.268, n.7, Mar 5, p.4569-72. 1993.

López-Alarcón, C., H. Speisky, *et al.* Antioxidant effect of 5-amino salicylic acid on copper-mediated LDL oxidation. Biological Research v.40, p.155-162. 2007.

Lynch, S. M. e B. Frei. Antioxidants as anti-atherogens: Animal studies. In: B. Frei (Ed.). Natural Antioxidants in Human Health and Disease: Academic Press, 1994. Antioxidants as anti-atherogens: Animal studies

Maggi, E., R. Bellazzi, *et al.* Enhanced LDL oxidation in uremic patients: an additional mechanism for accelerated atherosclerosis? Kidney Int, v.45, n.3, Mar, p.876-83. 1994.

Mao, S. J., M. T. Yates, *et al.* Attenuation of atherosclerosis in a modified strain of hypercholesterolemic Watanabe rabbits with use of a probucol analogue (MDL 29,311) that does not lower serum cholesterol. Arterioscler Thromb, v.11, n.5, Sep-Oct, p.1266-75. 1991.

Marathe, G. K., K. A. Harrison, *et al.* Bioactive phospholipid oxidation products. Free Radic Biol Med, v.28, n.12, Jun 15, p.1762-70. 2000.

Mathers, C. D. C. B., K.M. Iburg, M. Inoue, D. Ma Fat, K. Shibuya, C. Stein, N. Tomijima, and H. Xu. Global Burden of Disease in 2002: data sources, methods and results.: <http://www.who.int/infobase> IRef: 199998 2003.

Meagher, E. A. e G. A. Fitzgerald. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. Free Radic Biol Med, v.28, n.12, Jun 15, p.1745-50. 2000.

Meisinger, C., J. Baumert, *et al.* Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. Circulation, v.112, n.5, Aug 2, p.651-7. 2005.

Morel, D. W., P. E. Dicorleto, *et al.* Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. Arteriosclerosis, v.4, n.4, Jul-Aug, p.357-64. 1984.

Morel, D. W., J. R. Hessler, *et al.* Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. J Lipid Res, v.24, n.8, Aug, p.1070-6. 1983.

Muller, D. P. R. Vitamin e and other antioxidants in neurological function and disease. In: B. Frei (Ed.). Natural antioxidants in human health and disease. San Diego: Academic Press, 1994. Vitamin e and other antioxidants in neurological function and disease, p.535-565

Navab, M., A. M. Fogelman, *et al.* Pathogenesis of atherosclerosis. Am J Cardiol, v.76, n.9, Sep 28, p.18C-23C. 1995.

Nordin Fredrikson, G., B. Hedblad, *et al.* Plasma oxidized LDL: a predictor for acute myocardial infarction? J Intern Med, v.253, n.4, Apr, p.425-9. 2003.

Parthasarathy, S. e S. M. Rankin. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. Prog Lipid Res, v.31, n.2, p.127-43. 1992.

Parthasarathy, S., N. Santanam, *et al.* Oxidants and antioxidants in atherogenesis. An appraisal. J Lipid Res, v.40, n.12, Dec, p.2143-57. 1999.

Patel, R. P. e V. M. Darley-Usmar. Molecular mechanisms of the copper dependent oxidation of low-density lipoprotein. Free Radic Res, v.30, n.1, Jan, p.1-9. 1999.

Patterson, R. E., R. L. Eisner, *et al.* Comparison of cost-effectiveness and utility of exercise ECG, single photon emission computed tomography, positron emission tomography, and coronary angiography for diagnosis of coronary artery disease. Circulation, v.91, n.1, Jan 1, p.54-65. 1995.

Podrez, E. A., H. M. Abu-Soud, *et al.* Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. Free Radic Biol Med, v.28, n.12, Jun 15, p.1717-25. 2000.

Puntel, G. O., N. R. De Carvalho, *et al.* Butane-2,3-dionethiosemicarbazone: an oxime with antioxidant properties. Chem Biol Interact, v.177, n.2, Jan 27, p.153-60. 2009.

Puntel, G. O., P. Gubert, *et al.* Antioxidant properties of oxime 3-(phenylhydrazono) butan-2-one. Arch Toxicol, v.82, n.10, Oct, p.755-62. 2008.

Refsgaard, H. H. F., L. Tsai, *et al.* Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.97, p.611-616. 2000.

Regnstrom, J., J. Nilsson, *et al.* Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. Lancet, v.339, n.8803, May 16, p.1183-6. 1992.

Shaish, A., A. Daugherty, *et al.* Beta-carotene inhibits atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. J Clin Invest, v.96, n.4, Oct, p.2075-82. 1995.

Shakuto, S., K. Oshima, *et al.* Glimepiride exhibits prophylactic effect on atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. Atherosclerosis, v.182, n.2, Oct, p.209-17. 2005.

Shimada, K., H. Mokuno, *et al.* Circulating oxidized low-density lipoprotein is an independent predictor for cardiac event in patients with coronary artery disease. Atherosclerosis, v.174, n.2, Jun, p.343-7. 2004.

Sigurdardottir, V., B. Fagerberg, *et al.* Circulating oxidized low-density lipoprotein (LDL) is associated with risk factors of the metabolic syndrome and LDL size in clinically healthy 58-year-old men (AIR study). J Intern Med, v.252, n.5, Nov, p.440-7. 2002.

Spranger, T., B. Finckh, *et al.* How different constituents of human plasma and low density lipoprotein determine plasma oxidizability by copper. Chemistry and Physics of Lipids, v.91, p.39-52. 1998.

Steinberg, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. J Biol Chem, v.272, n.34, Aug 22, p.20963-6. 1997.

Steinbrecher, U. P., S. Parthasarathy, *et al.* Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. Proc Natl Acad Sci U S A, v.81, n.12, Jun, p.3883-7. 1984.

Stocker, R. e J. F. Keaney, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. Physiol Rev, v.84, n.4, Oct, p.1381-478. 2004.

Subbanagounder, G., A. D. Watson, *et al.* Bioactive products of phospholipid oxidation: isolation, identification, measurement and activities. Free Radic Biol Med, v.28, n.12, Jun 15, p.1751-61. 2000.

Suzuki, T., H. Kohno, *et al.* Diagnostic implications of circulating oxidized low density lipoprotein levels as a biochemical risk marker of coronary artery disease. Clin Biochem, v.35, n.5, Jul, p.347-53. 2002.

Toshima, S., A. Hasegawa, *et al.* Circulating oxidized low density lipoprotein levels. A biochemical risk marker for coronary heart disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.20, n.10, Oct, p.2243-7. 2000.

Tsimikas, S., E. S. Brilakis, *et al.* Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease. N Engl J Med, v.353, n.1, Jul 7, p.46-57. 2005.

Tsimikas, S. e J. Witztum. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis. In: J. Keaney e J.F. (Ed.). Oxidative Stress and Vascular Disease. Boston: Kluwer Academic, 2000. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis, p.49-74

Uchida, K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. Free Radic Biol Med, v.28, n.12, Jun 15, p.1685-96. 2000.

Willingham, A. K., C. Bolanosa, *et al.* The effects of high levels of vitamin E on the progression of atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. J Nutr Biochem v.4, n.11, p.651-654. 1993.

Witztum, J. L. e D. Steinberg. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. J Clin Invest, v.88, n.6, Dec, p.1785-92. 1991.

Worek, F., H. Thiermann, *et al.* Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. Biochem Pharmacol, v.68, n.11, Dec 1, p.2237-48. 2004.

Ziouzenkova, O., A. Sevanian, *et al.* Copper can promote oxidation of LDL by markedly different mechanisms. Free Radical Biology and Medicine, v.24, p.607-623. 1998.