

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES
INFLAMATÓRIOS, OXIDATIVOS E VASCULARES
EM PACIENTES COM HIPERCOLESTEROLEMIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Renata da Silva Pereira

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES
INFLAMATÓRIOS, OXIDATIVOS E VASCULARES EM
PACIENTES COM HIPERCOLESTEROLEMIA**

por

Renata da Silva Pereira

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Orientador: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS,
OXIDATIVOS E VASCULARES EM PACIENTES COM
HIPERCOLESTEROLEMIA**

elaborada por
Renata da Silva Pereira

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Rafael Noal Moresco, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Paula Rossini Augusti, Dr. (UNIPAMPA)

Ricardo Brandão, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 21 de março de 2011.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, a Deus por estar presente em todos os momentos da vida, ter me concedido uma família perfeita, me colocado no caminho certo e estar rodeada de pessoas especiais.

A minha mãe, minha fiel amiga, a quem tem um orgulho imenso, por sempre estar ao meu lado me dando força, carinho, amor, colo, meu amor eterno.

Ao meu pai, meu conselheiro, quem me apóia nas minhas decisões, meu singelo amor.

A minha irmã Juliana, por ser minha companheira, amiga, me ajudar na execução deste trabalho, me transmitir segurança, pessoa na qual eu amo muito.

Ao meu irmão Ricardo, meu amigão, meu companheiro, meu confidente, meu amor para sempre.

Ao meu irmão Kauan, pelo seu carinho e amor.

Ao meu noivo, Flávio, por estar sempre junto a mim, me dar apoio, incentivo, me entender. Te amo muito!!

A minha vózinha amada, que tenho certeza que está muito feliz por mais esta minha conquista. Saudades imensas.

Ao meu orientador, professor Dr. Rafael Moresco, a quem eu tenho uma imensa admiração pela sua competência, inteligência e capacidade, além de um grande orientador, um amigo. Muito obrigado pelos ensinamentos, conselhos, sou muito grata e nunca esquecerei.

Ao professor Dr Roberto Santos, que me deu a oportunidade de trabalhar com pesquisa, que além de um excelente professor, um amigo verdadeiro.

Aos meus colegas de Laboratório e amigos, Helena, Etiane, Sandra, Sílvia, Cris, Bruna, Guilherme, Daiane, Thiago, Zé, Rafael, Manu, Carine, pelo companheirismo, amizade e carinho.

À Prof. Dra Paula Augusti e ao Prof. Dr Ricardo Brandão, por aceitarem avaliar esse trabalho.

À Marta, pessoa amável, muito especial, que recrutou todos os pacientes, sem ela, este trabalho não existiria, meu muito obrigado de coração mesmo.

Aos pacientes que gentilmente aceitaram gentilmente participar deste estudo.

Ao Prof. Dr José Edson, pela oportunidade e amizade.

Aos meus colegas, Carlos Hugo e Rafael, pela ajuda, apoio e amizade.

Ao Paulo, secretário do Programa de Pós-Graduação, por estar sempre disposto, pelo apoio e auxílio.

A Prof. Dra Clarice Rolim, pelo seu esforço e luta no crescimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM.

A todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas que proporcionaram a minha formação.

À todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS, OXIDATIVOS E VASCULARES EM PACIENTES COM HIPERCOLESTEROLEMIA

AUTORA: RENATA DA SILVA PEREIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 21 de março de 2011

A hipercolesterolemia é um fator determinante para o desenvolvimento da aterosclerose, que é considerada a principal causa de doenças cardiovasculares. No Brasil, assim como na maior parte dos países desenvolvidos, as doenças cardiovasculares representam a principal causa de morbimortalidade. Vários mecanismos estão envolvidos no desenvolvimento da placa de ateroma, assim o objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre a hipercolesterolemia e biomarcadores inflamatórios, oxidativos e vasculares, bem como desenvolver e validar um método analítico automatizado para a mensuração de nitrito, um metabólito do óxido nítrico (NO), em amostras de plasma. Na fase 1 deste estudo, foi desenvolvido e validado um método analítico automatizado para dosagem de nitrito plasmático. Este método foi preciso, linear ($r^2=0,9998$, $P<0,001$), simples, de baixo custo e aplicável a rotina laboratorial. Na fase 2, foram avaliados marcadores inflamatórios, oxidativos e vasculares. Os grupos estudados foram: grupo hipercolesterolêmicos (LDL-C ≥ 160 mg/dL) e normocolesterolêmicos (LDL-C ≤ 130 mg/dL). Os resultados demonstraram que níveis de colesterol total, LDL-C, HDL-C, triglicérides, apolipoproteína A, apolipoproteína B, produtos protéicos da oxidação avançada (AOPP), interleucina-6 (IL-6) e D-dímero foram significativamente maiores nos pacientes hipercolesterolêmicos, enquanto os níveis de grupamento tiol (-SH) e nitrito/nitrato (NO_x) foram inferiores neste grupo. Foram ainda observadas correlações significativas para o LDL-C e IL-6 ($r = 0,693$, $P < 0,001$), LDL-C e de NO_x ($r = -0,314$, $P < 0,05$) e LDL-C e -SH ($r = -0,327$, $P < 0,05$). Dessa forma, a hipercolesterolemia promove o aumento do estresse oxidativo, inflamação e fibrinólise durante a aterosclerose.

Palavras-chaves: Hipercolesterolemia; aterosclerose; inflamação; estresse oxidativo; fibrinólise; método automatizado e óxido nítrico.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post Graduate Course on Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EVALUATION OF INFLAMMATORY, OXIDATIVE, AND VASCULAR BIOMARKERS IN PATIENTS WITH HIPERCHOLESTEROLEMIA

AUTHOR: RENATA DA SILVA PEREIRA

ADVISOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO

DATE AND PLACE: MARCH 21ST, 2011, SANTA MARIA

Hypercholesterolemia is a determining factor for the development of atherosclerosis, which is considered the main cause of cardiovascular diseases. In Brazil, as in most developed countries, cardiovascular diseases are the leading cause of death. Several mechanisms are involved in the development of atheromatous plaque thus the purpose of this study was to evaluate the association between hypercholesterolemia and inflammatory, vascular, and oxidative biomarkers as well as to develop and validate an analytical method for the automated measurement of nitrite, a metabolite of the oxide oxide (NO) in plasma samples. In the first phase of this study an analytical method for automated measurement of plasma nitrite was developed and validated. This method was precise ($r^2=0,9998$, $P<0,001$), linear, simple, inexpensive, and applicable to routine monitoring. In phase 2, inflammatory, vascular and oxidative markers were assessed. The groups were: group with hypercholesterolemia (LDL-C ≥ 160 mg / dl) and normocholesterolemic group (LDL-C ≤ 130 mg / dL). Results showed that levels of total cholesterol, LDL-C, HDL-C, triglycerides, apolipoprotein A, apolipoprotein B, advanced oxidation protein products (AOPP), interleukin-6 (IL-6) and D-dimer were significantly higher in hypercholesterolemic patients, while levels of thiol grouping (-SH) and nitrate / nitrite (NO_x) were lower in this group. There were also significant correlations for LDL-C and IL-6 ($r = 0.693$, $P < 0.0001$), LDL-C and NO_x ($r = -0.314$, $P < 0.05$) and LDL-C and - SH ($r = -0.327$, $P < 0.05$). Thus, hypercholesterolemia promotes increased oxidative stress, inflammation, and fibrinolysis in atherosclerosis.

Key words: Hypercholesterolemia; atherosclerosis; inflammation; oxidative stress; fibrinolysis; automated method; nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação esquemática da composição de diferentes classes de lipoproteínas.....	16
FIGURA 2 - Estrutura de uma lipoproteína de baixa densidade (LDL)	17
FIGURA 3 - Formação da placa de ateroma.....	20
FIGURA 4 - Processo de oxidação da LDL e formação das células espumosas	24
FIGURA 5 – Principais contribuições deste estudo.....	53

ARTIGO I

FIGURE 1 - Linear regression of technique for measurement of plasma nitrite by the Griess method on Cobas Mira analyzer ($r^2=0.9998$, $P<0.001$). The solutions of sodium nitrite (2.5–80 $\mu\text{mol/L}$) were used as standard	33
---	----

MANUSCRITO I

FIGURE 1 - The values of AOPP (A), IMA (B), and –SH group (C) in control and hypercholesterolemia groups. * $P<0.05$	48
FIGURE 2 - The values of IL-6 (A), NO _x (B), and D-dimer (C) in control and hypercholesterolemia groups. * $P<0.05$, ** $P<0.001$	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Classificação das dislipidemias primárias	15
--	----

MANUSCRITO I

TABLE 1 – Baseline characteristics of study patients.....	47
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AOPP: *Advanced oxidation protein products* (Produtos protéicos de oxidação avançada)

Apo-A: *Apolipoprotein A* (Apolipoproteína A)

Apo-B: *Apolipoprotein B* (Apolipoproteína B)

CAT: Catalase

CG-MS: *Gas chromatography-mass spectrometry* (Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa)

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CT: Colesterol total

EROs: Espécies reativas de oxigênio

GSH-Px: Glutathione peroxidase

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HDL-C: Lipoproteína de alta densidade ligada ao colesterol

IAM: Infarto agudo do miocárdio

ICAM-1: Molécula de adesão intercelular-1

IDL: lipoproteína de densidade intermediária

IL-1: *Interleukin-1* (Interleucina-1)

IL-6: *Interleukin-6* (Interleucina-6)

IL-8: *Interleukin-8* (Interleucina-8)

IMA: Ischemia-modified albumin (Albumina modificada pela isquemia)

LCAT: Lecitina-colesterol acil transferase

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LDL-C: lipoproteína de baixa densidade ligada ao colesterol

MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos-1

MDA: malondialdeído

NCEP: *National Cholesterol Education Program* (Programa Nacional dos Estados Unidos de Educação do Colesterol)

NO: *Nitric oxide* (Óxido nítrico)

NO_x: Nitrite/Nitrate (Nitrito/nitrato)

NOS: NO sintetase

OMS: Organização Mundial de Saúde

PCR: Proteína C-reativa

SCA: Síndrome coronariana aguda

-SH: Grupamento tiol

SOD: *Superoxide dismutase* (Superóxido dismutase)

TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

VCAM-1: Molécula de adesão celular vascular-1

VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Dislipidemias	14
2.2 Hipercolesterolemia.....	18
2.3 Aterosclerose	19
2.3.1 Aterosclerose e inflamação.....	20
2.3.2 Aterosclerose e estresse oxidativo.....	21
2.3.3 Aterosclerose e fibrinólise	25
2.3.4 Aterosclerose e NO.....	25
2.3.4.1 Métodos de dosagem de NO.....	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
4 RESULTADOS	30
4.1 Artigo científico e manuscrito	31
4.1.1 Artigo I.....	31
4.1.2 Manuscrito I.....	35
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÕES.....	54
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO A- Carta de Aprovação do Comitê de Ética-UFSM.....	70

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, assim como na maior parte dos países desenvolvidos, as doenças cardiovasculares representam a principal causa de morbimortalidade (CORONELLI et al., 2003). A cardiopatia isquêmica destaca-se entre as doenças que acometem o sistema cardiovascular devido a sua alta prevalência e a seu impacto sobre a mortalidade na população em geral. É responsável por 34% de todas as causas de mortalidade, com números semelhantes em toda a América. No Brasil representa 300 mil óbitos por ano ou 820 por dia (SARMENTO et al., 1998). Segundo o Ministério da Saúde (2006), o Rio Grande do Sul é o estado que apresenta maior índice de mortalidade específica causada por doenças isquêmicas do coração (74,02 óbitos por 100.000 habitantes). Estima-se que em 2030, 23,6 milhões de pessoas morram de doenças cardiovasculares (WHO, 2009).

A hipercolesterolemia é um problema comum de saúde com prevalência crescente em muitos países (GHANDEHARI et al., 2008). Segundo o Programa Nacional dos Estados Unidos de Educação do Colesterol (NCEP), esta patologia é um dos mais importantes fatores de risco de doenças vasculares. Aproximadamente 50% dos adultos possuem concentrações do colesterol total consideradas “limítrofe e de alto risco” (ARNETT et al., 2005).

Manifestações de disfunção endotelial estão associadas à hipercolesterolemia, o que representa um dos principais fatores de risco da aterosclerose (LIBBY, 2002). A disfunção endotelial tem importante papel na formação da placa e no curso clínico da aterosclerose (CHEQUER et al., 2006). A aterosclerose é uma condição inflamatória crônica associada a um excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs), ativação de células endoteliais e o acúmulo de leucócitos nas paredes das artérias (KOTUR-STEVLJEVIC et al., 2007). O aumento do conhecimento da patofisiologia na formação da placa aterosclerótica e o melhor entendimento do processo dinâmico têm levado ao estudo de inúmeros marcadores de inflamação. Um estudo recente demonstrou o papel da inflamação na doença aterosclerótica, sendo relacionado com a formação da placa e com a sua instabilização (PEARSON et al., 2003).

Considerando que o Brasil, bem como outros países em desenvolvimento, apresentam elevadas taxas específicas de mortalidade por doenças cardíacas e sabendo que a aterosclerose e a hipercolesterolemia são relevantes causas que contribuem para o desenvolvimento dessa patologia, é de suma importância a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nessa

doença, bem como o perfil de novos biomarcadores laboratoriais e o desenvolvimento de novos métodos para a avaliação deste processo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Dislipidemias

Dislipidemias são alterações metabólicas lipídicas decorrentes de distúrbios em qualquer fase do metabolismo lipídico, que ocasionam repercussão nos níveis séricos das lipoproteínas (JONES et al., 2009). É um grupo de doenças multifatoriais causadas por uma interação entre fatores genéticos e ambientais, o último incluindo uma dieta rica em gordura e alto teor calórico e sedentarismo (ORDOVAS, 2006; YAMADA et al., 2007). É um fator de risco independente e modificável para doença cardiovascular, juntamente com pressão arterial elevada, tabagismo e sedentarismo (PACCAUD et al., 2000). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a dislipidemia esteja associada com mais de metade da causa global de doenças isquêmicas do coração (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

As dislipidemias são classificadas em primárias ou sem causa aparente que podem ser classificadas genotipicamente ou fenotipicamente através de análises bioquímicas. Na classificação genotípica, as dislipidemias se dividem em monogênicas, causadas por mutações em um só gene, e poligênicas, causadas por associações de múltiplas mutações que isoladamente não seriam de grande repercussão. A classificação fenotípica ou bioquímica considera os valores de colesterol total (CT), lipoproteína de baixa densidade ligada ao colesterol (LDL-C), triglicérides e lipoproteína de alta densidade ligada ao colesterol (HDL-C). Compreendem quatro tipos principais bem definidos:

A hipercolesterolemia isolada do LDL-C ≥ 160 mg/dL, hipertrigliceridemia isolada, elevação isolada dos triglicérides ≥ 150 mg/dL, hiperlipidemia mista valores aumentados de ambos LDL-C ≥ 160 mg/dL e triglicérides ≥ 150 mg/dL e HDL-C baixo: redução do HDL-C (homens <40 mg/dL e mulheres <50 mg/dL) isolada ou em associação com aumento de LDL-C ou de triglicérides (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007). A classificação das dislipidemias primárias está apresentada na tabela 1.

Tabela 1 - Classificação das dislipidemias primárias adaptado de Frederickson com modificações

Tipo	Fenótipo	Lipoproteína (s) elevada (s)	Principais apolipoproteínas implicadas	Aterogenicidade
I	Hipertrigliceridemia	Quilomicrons	A, B-48, C e E	-
IIa	Hipercolesterolemia	LDL	B-100	+ / +++
IIb	Hiperlipidemia mista	LDL/VLDL (HDL baixa)	B-100, C e E (apo A - I- baixa)	+++
III	Hiperlipidemia mista	Remanescentes (β -VLDL - HDL baixa)	B-100 e E (apo A - I- baixa)	+++
IV	Hipertrigliceridemia	VLDL	B-100, C e E	+
V	Hipertrigliceridemia	Quilomicrons/VLDL	A, B, C e E	+

Fonte: YESHURUN et al, 1995.

A prevalência de dislipidemias varia de acordo com as características étnicas, socioeconômicas e culturais de distintos grupos populacionais (BERTOLAMI et al., 1993; SOUTO et al., 2000; SOUZA et al., 2003). No Brasil, estudos confiáveis para determinar a real prevalência de dislipidemias em um grupo de indivíduos estaticamente representativo de uma sociedade geograficamente delimitada, são escassos (DUNCAN et al., 1988; LESSA et al., 1997; SOUTO et al., 2000; SOUZA et al., 2003). A maioria dos estudos incluem grupos restritos limitados a certa faixa etária (FIGUEIRA et al., 1987; MENDONÇA et al., 1997; MOURA et al., 2000; SELIK et al., 2001; SOUZA et al., 2003), pacientes ambulatoriais (LUZ et al., 1990; REIS et al., 1999; SOUZA et al., 2003), indivíduos com doença arterial coronariana já estabelecida (LADEIA et al., 1994), entre outras.

O perfil lipídico é definido pelas determinações bioquímicas do CT, HDL-C, triglicérides e LDL-C após jejum de 12 a 14 horas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007). O colesterol é encontrado em praticamente todas as células e líquidos orgânicos. Ele é um álcool sólido que contém 27 átomos de carbono e possui o esqueleto tetracíclico do ciclopentano peridrofenantreno (NELSON, 2006). É o ponto de partida de muitas vias metabólicas, que incluem a síntese de vitamina D, dos hormônios esteróides e do metabolismo dos ácidos biliares. Como componente estrutural importante das membranas celulares, influencia na sua fluidez e no estado de ativação de enzimas ligadas a

membranas (QIN et al., 2006). Os lipídios sintetizados no fígado e intestino são transportados no plasma nos complexos macromoleculares conhecidos como lipoproteínas. As lipoproteínas têm propriedades físicas e químicas diferentes porque contêm diferentes proporções de lipídios e proteínas (BURTIS et al., 2008). As lipoproteínas são responsáveis pelo transporte dos lipídios no plasma e são compostas por lipídios e proteínas, as chamadas apolipoproteínas. As quatro maiores classes de lipoproteínas plasmáticas são: quilomícron, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL). Existem duas menores classes de lipoproteínas que são lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e lipoproteína (a) (SCATERZINI et al., 2003). A LDL normalmente transporta 70% do total de colesterol plasmático. Quando as concentrações de LDL-C estão elevadas ocorre um aumento do risco de aterosclerose (ARMSTRONG et al., 2006). O HDL transporta 20-30% do colesterol total. Algumas evidências indicam que o HDL-C protege contra o desenvolvimento de aterosclerose, sendo que baixos níveis de HDL-C, muitas vezes, refletem a presença de outros fatores aterogênicos (NCEP III, 2002). (Figura 1).

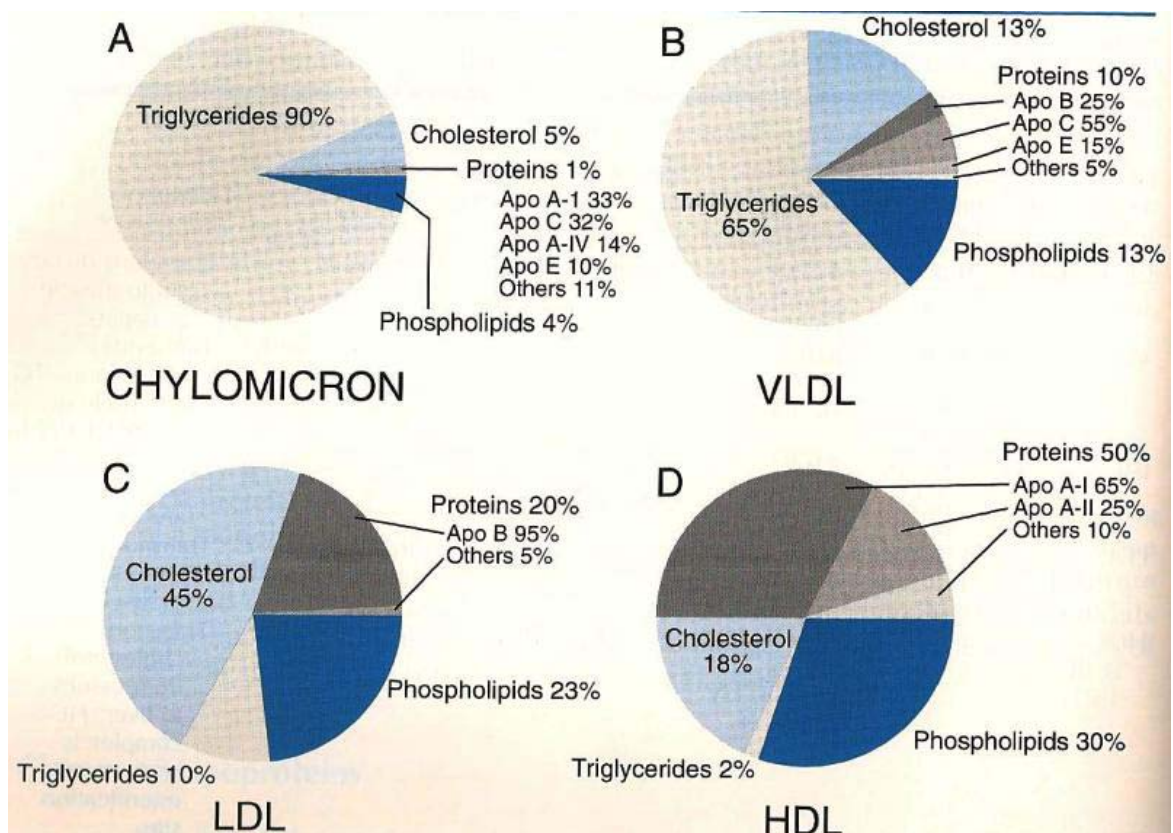


Figura 1 – Representação esquemática da composição de diferentes classes de lipoproteínas. Reproduzido de (KAPLAN et al., 1995).

A apolipoproteína A (Apo-A) é uma proteína sintetizada principalmente no fígado e em menor extensão no intestino delgado (SORCI-THOMAS et al., 1989). É a principal proteína encontrada nas moléculas de HDL-C e é o cofator obrigatório da enzima lecitina-colesterol acil transferase (LCAT) e, assim, participa na regulação do transporte reverso do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado (PLUMP et al., 1997). A apolipoproteína B (Apo-B) é o principal componente protéico das lipoproteínas aterogênicas (VLDL, LDL e IDL). Cada partícula de LDL ou VLDL contém uma molécula de Apo-B e, com isto, o nível plasmático de Apo-B equivale ao total de partículas aterogênicas (LAMARCHE et al., 1996). A estrutura da lipoproteína LDL está demonstrada na figura 2.

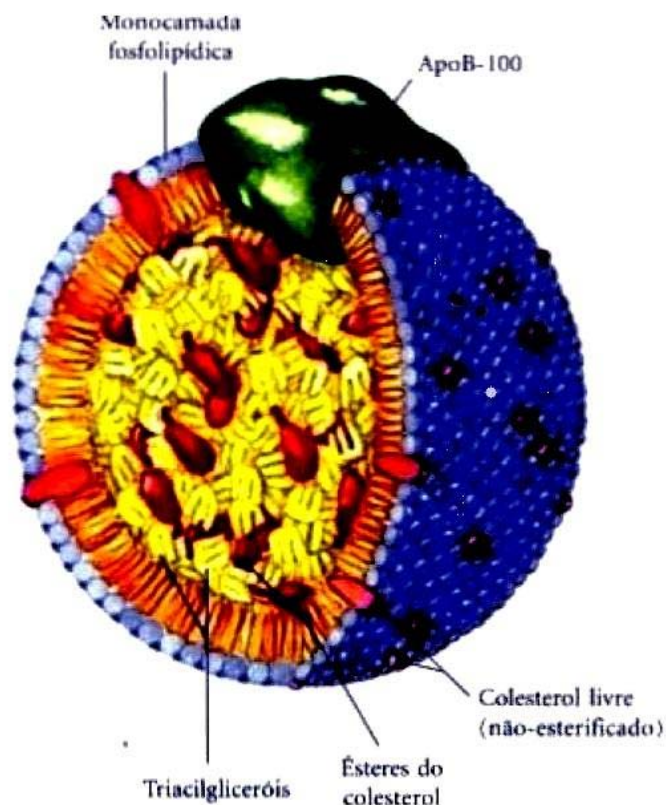


Figura 2 - Estrutura de uma lipoproteína de baixa densidade (LDL). Reproduzido de NELSON et al., 2006.

Os triglicérides constituem 95% da gordura de armazenamento no tecido e são a forma predominante de ésteres de glicerol encontrados no plasma (BURTIS et al., 2008). É a forma de armazenamento energético mais importante no organismo, constituindo depósitos no tecido adiposo e muscular (HOKANSON e AUSTIN, 1996). Os triglicérides também contribuem

para aterogenicidade, pois são os constituintes principais dos quilomícrons e das VLDL. As VLDL contribuem para o acúmulo de lipídios nos macrófagos humanos, promovendo a formação das “células espumosas” (MOORE e FREEMAN, 2006).

O acúmulo de lipoproteínas ricas em colesterol como a LDL no compartimento plasmático resulta em hipercolesterolemia. Este acúmulo pode ocorrer por doenças monogênicas, em particular, por defeito no gene do receptor de LDL ou no gene da Apo-B100. Centenas de mutações do receptor de LDL foram detectadas em portadores de hipercolesterolemia familiar, algumas causando redução de sua expressão na membrana, outras, deformações na sua estrutura e função. Mutação no gene que codifica a Apo-B100 pode também causar hipercolesterolemia através da deficiência no acoplamento da LDL ao receptor celular (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

2.2 Hipercolesterolemia

A hipercolesterolemia é amplamente aceita como um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral, doença arterial periférica, doença arterial congênita e falência cardíaca (BHATT et al., 2006). Esta patologia produz inúmeras alterações funcionais na parede vascular e leva ao desenvolvimento da aterosclerose, que é a principal causa de morbidade e mortalidade da população mundial (OUBIÑA et al., 2003). É definida como uma concentração plasmática de LDL-C igual ou superior a 160 mg/dL (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007). Essa desordem pode ser genética ou secundária a outras patologias ou, ainda, de etiologia incerta, provavelmente refletindo uma interação entre a dieta e fatores poligênicos indefinidos. A base fisiopatológica parece ser a combinação de produção excessiva e catabolismo defeituoso do colesterol (EMMANUEL, 2009). Na hipercolesterolemia familiar, os níveis de colesterol sanguíneos são extremamente elevados, e os indivíduos atingidos, desenvolvem, já na infância, aterosclerose severa (NELSON, 2006).

A hipercolesterolemia familiar é uma doença autossômica co-dominante causada por mutações no gene que codifica o receptor da LDL (CAMPAGNA et al., 2008). A disfunção endotelial é uma consequência comum de hipercolesterolemia e tem sido geralmente caracterizada por um comprometimento do endotélio. É fator crucial na patogênese da aterosclerose e é caracterizada por aumento da expressão de moléculas de adesão aos

leucócitos, maior permeabilidade do endotélio ao LDL-C e diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) (O'CONNEL et al., 2001).

2.3 Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença multifatorial, lenta e progressiva resultante de uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas (HACKAM et al., 2003). O acúmulo de lipídios, células inflamatórias e elementos fibrosos, que se depositam na parede das artérias é o responsável pela formação de placas ou estrias gordurosas, e que geralmente ocasionam a obstrução das mesmas (LIBBY, 2002). As lesões ateroscleróticas ocorrem principalmente nas grandes e médias artérias e podem levar à isquemia do coração, cérebro e extremidades, resultando em infarto (ROSS, 1999).

Classicamente, os fatores de desenvolvimento da aterosclerose são: elevados níveis de CT, LDL-C, LDL oxidado, triglicérides e baixos níveis de HDL-C (FORRESTER et al., 2005). O LDL-C permanece na circulação por vários dias e nestes períodos pode adentrar a parede vascular (MAYR et al., 2005). O acúmulo de lipídios nos macrófagos e nas células musculares lisas é o aspecto central da aterogênese. A oxidação do LDL é induzida pelos radicais livres produzidos pelos macrófagos, células endoteliais ou células musculares lisas (HEINECKE, 1998). Ocorre uma mudança oxidativa do LDL e a absorção das partículas de lipoproteínas modificadas pelos macrófagos que, por sua vez, se transformam em células carregadas, ricas em colesterol (LUSIS, 2000).

A primeira fase da aterogênese inclui a formação das estrias gordurosas, que consistem principalmente de macrófagos cheios de colesterol, a maioria do colesterol é derivado do LDL-C. A segunda etapa consiste em placas fibrosas e a terceira etapa é representada pelo desenvolvimento de placas instáveis que são passíveis a ruptura e formação de trombose luminal. A ruptura da placa é responsável pela maioria das síndromes coronarianas agudas (SCA). Evidências recentes indicam que o LDL-C contribui para a instabilidade da placa, bem como, inversamente, a redução do LDL-C estabiliza a placa e a probabilidade de SCA (LIBBY, 2000). A formação da placa de ateroma está apresentada na figura 3.

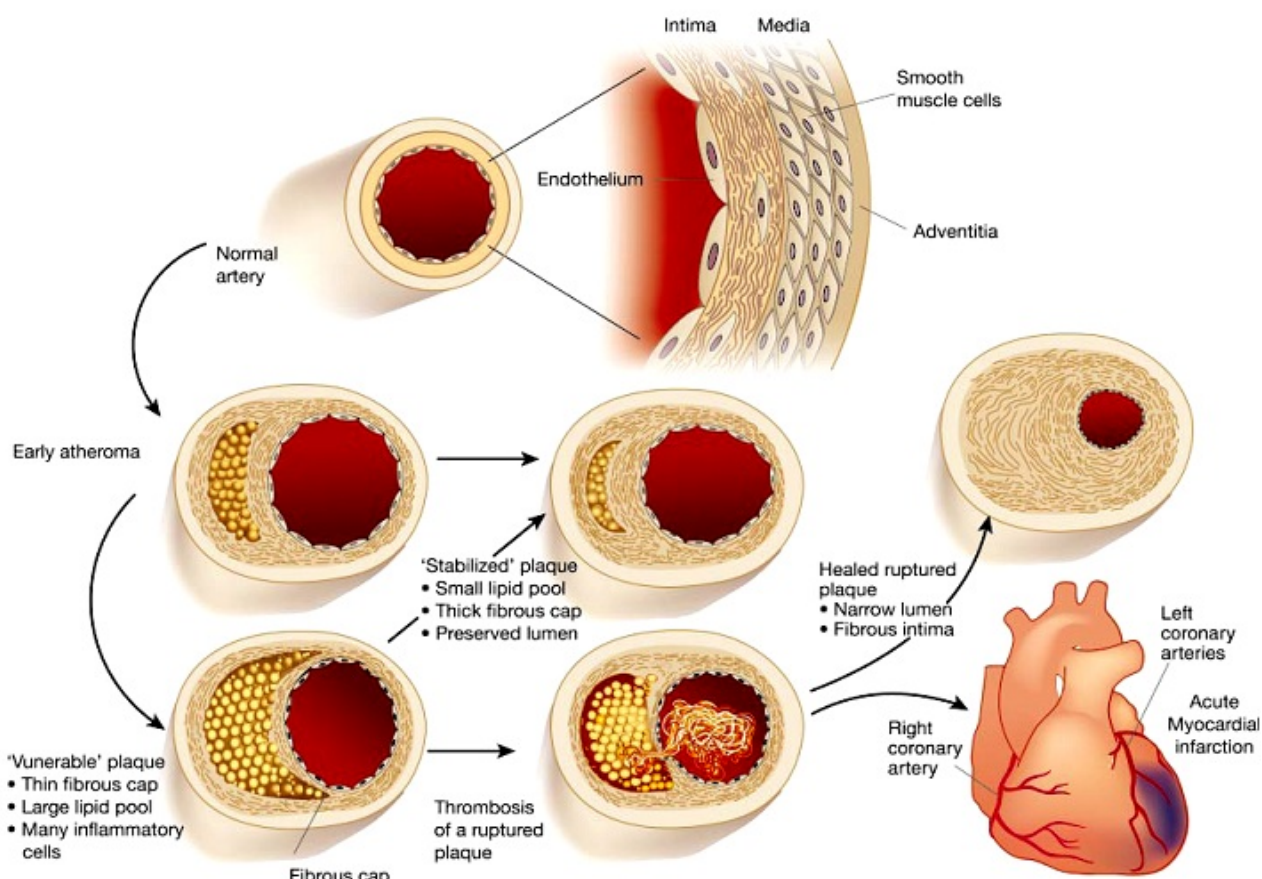


Figura 3 – Formação da placa de ateroma. Reproduzido de LIBBY (2000).

2.3.1 Aterosclerose e inflamação

A inflamação está integralmente associada com todas as fases de início, crescimento e complicações da placa aterosclerótica (ROSS, 1999). A patogênese da aterosclerose se caracteriza como um fenômeno complexo que envolve células, elementos do tecido conjuntivo, lipídios e lipídios remanescentes, sendo que o processo inflamatório apresenta um importante papel nesta patologia (HANSSON, 2005). A lesão aterosclerótica envolve vários tipos de células e uma variedade de citocinas (ZHAO et al., 2005). Um regulador chave da resposta inflamatória é a interleucina-6 (IL-6), que estimula a síntese de proteínas de fase aguda como a proteína C-reativa (PCR) e o fibrinogênio (LOWE et al., 2004).

As citocinas e quimiocinas envolvidas principalmente nas primeiras fases da resposta inflamatória, que culmina com aterosclerose, são a interleucina-1 (IL-1), a IL-6, o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-8 (IL-8), entre outros (RAINES et al., 1989). A

IL-6 tem como principais funções a quimiotaxia e mitogênese para as células musculares lisas (IKEDA et al., 1992). A IL-6 está envolvida na patogênese da SCA e prevê futuros infartos em homens saudáveis bem como a mortalidade total em pacientes idosos. As concentrações plasmáticas de IL-6 refletem a intensidade da vulnerabilidade da placa à ruptura (FUTTERMAN et al., 2002). A PCR é sintetizada pelo fígado, após um estímulo como lesão tecidual, inflamação e/ou infecção. Sua produção também ocorre nas lesões ateroscleróticas por células musculares lisas e macrófagos, rins, neurônios, alvéolos pulmonares e tecido adiposo (RIDKER, 2005). É um marcador inflamatório que está fortemente associado às doenças cardiovasculares (RIDKER et al., 1997). No entanto, as concentrações séricas de PCR podem ser influenciadas por outros fatores, como medicações, reposição hormonal, tabagismo e causas infecciosas (VILLACORTA et al., 2007).

2.3.2 Aterosclerose e estresse oxidativo

O estresse oxidativo consiste no dano das estruturas biológicas por EROs devido à sua excessiva geração e à deficiência dos mecanismos de defesa antioxidante (VASSALLE et al., 2008). A diminuição dos sistemas de defesa antioxidante ou o aumento da geração de espécies oxidantes, radicalares ou não, pode resultar em lesões oxidativas em macromoléculas e diversas estruturas celulares que, se não forem reparadas, alterarão a funcionalidade de células, tecidos e órgãos (DHALA et al., 2000). O estresse oxidativo tem seus danos minimizados pelo sistema de defesa antioxidante enzimático e/ou não enzimático (HALLIWELL, 2000).

Entre as principais enzimas responsáveis pela defesa antioxidante enzimática do organismo destacam-se: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GSHPx), que constituem a primeira linha de defesa endógena de neutralização das EROs. Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do radical superóxido e de peróxidos de hidrogênio evitando assim, a formação do radical hidroxil (BOVERIS e CADENAS, 1997). Além das defesas antioxidantes enzimáticas, possuem grande relevância os antioxidantes não enzimáticos. Deste grupo destacamos o papel dos grupamentos tióis (-SH) e das vitaminas C e E (VALKO et al., 2007). Os tióis não-protéicos têm uma importante função na defesa contra EROs (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; MASELLA et al., 2005) e desempenham ainda um papel importante na prevenção *in vivo* da

aterosclerose (UELAND et al., 1996). A vitamina C ou ascorbato é um nutriente hidrossolúvel encontrado primariamente em frutas e vegetais (MAYNE, 2003) e exerce ação protetora sobre componentes hidrossolúveis do organismo (BENZIE e STRAIN, 1999). A vitamina C interage com as EROs na fase aquosa do plasma antes que eles possam agir oxidativamente sobre lipídios e lipoproteínas (ROSS e MOLDEUS,1991; NORDBERG e ARNER, 2001). A vitamina E ou α -tocoferol pertence ao grupo dos antioxidantes fenólicos, sendo que dentre eles o α -tocoferol tem sido considerado o mais biologicamente ativo e o principal antioxidante lipossolúvel nas membranas celulares (MACHLIN e BENDICH, 1987; MAYNE, 2003).

Um estudo realizado por Pirinccioglu et al. (2010) demonstrou que os níveis de malondialdeído (MDA), marcador de peroxidação lipídica foram significativamente elevados em pacientes com hipercolesterolemia familiar. Outro estudo realizado em pacientes hipercolesterolêmicos (DUARTE et al., 2010), demonstrou que os pacientes com hipercolesterolemia apresentaram níveis aumentados de CAT, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), vitamina E, enquanto os níveis de SOD e -SH foram menores nestes pacientes.

O estresse oxidativo também pode modificar a região N-terminal da albumina e produzir um aumento na concentração de albumina modificada pela isquemia (IMA), que é considerado um novo marcador de isquemia (BAR-OR et al., 2000). E mais recentemente, de estresse oxidativo (PIVA et al., 2011). De acordo com SINHA et al. (2004), a IMA tem se mostrado um sensível marcador bioquímico, especialmente para o diagnóstico de isquemia do miocárdio. Em condições fisiológicas, o N-terminal da albumina liga se a metais de transição, tais como: cobalto, cobre e níquel. Durante a isquemia, várias mudanças ocorrem no N-terminal da albumina modificada, possivelmente causada por radicais livres, que reduzem a sua capacidade de ligar os metais de transição (PANTAZOPOULOS et al., 2009).

A região N-terminal da albumina, o principal sítio de ligação aos metais de transição, passa por uma diminuição na sua capacidade de ligação na presença de processo isquêmico (CHAN et al., 1995; BAR-OR et al., 2001; MORROW et al., 2003; GIDENNE et al., 2004; APPLE et al., 2005). O ensaio colorimétrico que detecta a ligação da albumina ao cobalto através da IMA foi descrito por BAR-OR et al. (2000).

Atualmente, a IMA é considerada um biomarcador de estresse oxidativo relacionado à isquemia e reperfusão em diferentes condições clínicas, tais como: doença renal crônica (CICHOTA et al., 2008), hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2009), isquemia do músculo esquelético (FALKENSAMMER et al., 2007), isquemia intestinal (POLK et al., 2008),

diabetes tipo 2 (KAEFER et al., 2010), síndrome metabólica (GOTTLIEB et al., 2010), obesidade (PIVA et al., 2011), entre outras.

O estresse oxidativo está associado com a origem de um grande número de radicais livres que podem danificar células e tecidos. Os radicais livres são átomos ou grupos de átomos com um elétron desemparelhado em seu orbital mais externo. Eles exibem alta reatividade e durante um curto espaço de tempo são capazes de ligar-se a lipoproteínas, ácidos nucleicos, proteínas e enzimas (SKVARILLOVÁ et al., 2005). Modificações oxidativas das proteínas ocorrem durante o envelhecimento e em determinadas condições patológicas. Oxidação protéica serve como um útil marcador para avaliar estresse oxidativo *in vivo* (SCHACTER, 2000).

A oxidação do LDL é induzida pelos radicais livres produzidos pelos macrófagos, células endoteliais ou células musculares lisas (HEINECKE, 1998). O oxLDL induz as células endoteliais a expressar a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), permitindo que os monócitos e linfócitos T possam se aderir às células endoteliais, através de seus receptores de proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (SCALIA et al., 1998). Ocorre a migração dos monócitos do sangue periférico para o espaço subendotelial. Quando o LDL é oxidado, transforma-se em um auto-antígeno. Os receptores scavenger (SRA-I, SRA-II, LRP e CD 36) localizados na superfície dos macrófagos reconhecem o oxLDL e este é internalizado pelos macrófagos, formando as células espumosas (KOUNNAS et al., 1992). Essas células são características das estrias gordurosas presentes nas lesões ateroscleróticas, que podem progredir até a ruptura, precipitando eventos clínicos como ataque cardíaco e derrames (STOCKER e KEANEY, 2004). O processo de oxidação da LDL até a formação das estrias gordurosas pode ser visualizado na figura 4.

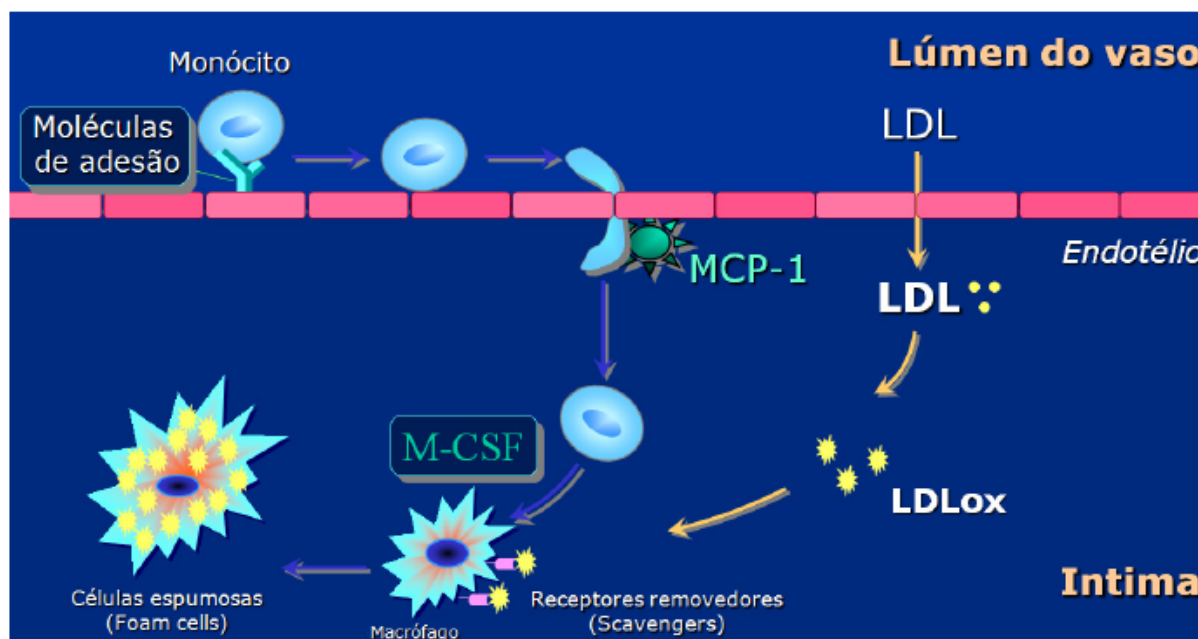


Figura 4 - Processo de oxidação da LDL e formação das células espumosas. Adaptado de STEINBERG et al., 1989. LDLox = LDL oxidada; M-CSF=fator estimulador das colônias de monócitos; MCP-1= proteína quimiotática para monócitos.

Em 1996, um novo biomarcador de estresse oxidativo, conhecido como produtos protéicos de oxidação avançada (AOPP) foi detectado no plasma de pacientes urêmicos crônicos. Os níveis de AOPP são uma medida de proteínas altamente oxidadas, especialmente albumina (WITKO-SARSAT et al., 1996). AOPP são formadas durante o estresse oxidativo por reação de proteínas plasmáticas com oxidantes clorados e são marcadores de dano protéico (WITKO-SARSAT et al., 1998; LIU et al., 2006). São consideradas mediadores pró-inflamatórios que prejudicam o metabolismo da HDL-C e, por isso, pode ter um papel chave no desenvolvimento das doenças cardiovasculares (MARSCHKE et al., 2009). De acordo com LIU et al. (2006), AOPP podem acelerar a formação de LDL oxidada através do aumento do estresse oxidativo, e está relacionada a acidentes cardiovasculares ateroscleróticos (DRÜKE et al., 2002; DESCAMPS-LATSCHA et al., 2005). WITKO-SARSAT et al. (2003) demonstraram que os níveis de AOPP não só refletem a gravidade das EROs, mas também agem como mediadores da inflamação, através do desencadeamento da ativação de monócitos.

2.3.3 Aterosclerose e fibrinólise

O sistema de coagulação do sangue é composto por elementos básicos, tais como: adesividade, ativação e agregação plaquetária, formação de fibrina e a fibrinólise. Esses elementos interagem uns com os outros e com a parede do vaso sanguíneo (SPRONK et al., 2004). Uma placa aterosclerótica rompida pode formar um trombo que é capaz de desencadear a maioria dos eventos cardiovasculares isquêmicos (THOMPSON et al., 1995). O endotélio vascular é importante na manutenção normal das condições fisiológicas e da parede do vaso sanguíneo (KHARBANDA et al., 2001). O desequilíbrio na interação das células do sangue para o endotélio irá induzir comprometimento da função endotelial e desenvolvimento de trombogênese, que está associada com concentrações elevadas de colesterol, particularmente de LDL-C. O processo que leva à trombose coronariana inclui danos no revestimento das artérias, e níveis anormais de certos fatores de coagulação como o fibrinogênio, podendo contribuir para a formação de trombos. Se estes fatores de hipercoagulabilidade são a causa ou o efeito de aterosclerose e trombose, estas são ainda temas que estão em debate (SAGASTAGOITIA et al., 2007).

Durante a formação do trombo, a plasmina degrada polímeros de fibrina com ligações cruzadas, resultando na formação de uma série de produtos solúveis de fibrina com diferentes pesos moleculares. O menor e melhor caracterizado destes produtos é o D-dímero (ROWE et al., 1998; KEARON et al., 2001; MORESCO et al., 2005). De acordo com KOENIG et al., (2001), os níveis de D-dímero elevados estão fortemente associados com a presença de doença arterial coronariana em pacientes com angina estável, pois há contribuição da fibrina intravascular para arterotrombogênese. O D-dímero tem sido utilizado convencionalmente para o diagnóstico de trombose venosa e embolia pulmonar (FUTTERMAN et al., 2002).

2.3.4 Aterosclerose e o óxido nítrico

O endotélio funciona como uma barreira de permeabilidade seletiva entre o sangue e tecidos, tendo funções sensoriais e podendo gerar moléculas efetoras que regulam trombose e inflamação vascular (LUSIS, 2000). A disfunção endotelial é uma consequência comum de

hipercolesterolemia e não envolve apenas mudanças na regulação endotelial de alterações vasculares, mas também no músculo vascular liso, adesão a leucócitos, plaquetas e atividade fibrinolítica (OUBIÑA et al., 2003). Além disso, estas alterações podem contribuir de forma crucial para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose e suas complicações (PLUTZKY, 2001).

Os fatores importantes da disfunção endotelial incluem a diminuição da biodisponibilidade do NO e o aumento da afinidade do endotélio a leucócitos que estão associados aos eventos iniciais do processo aterogênico (ANDERSON, 2003). O NO é produzido na célula endotelial vascular a partir do aminoácido L-arginina em um processo catalisado pela enzima NO sintetase (NOS) (GANZ et al., 2003). Além da sua ação vasodilatadora, o NO inibe a adesão e a agregação das plaquetas (KINLAY et al., 2001), impede a proliferação do músculo liso vascular (GIMBRONE, 1995), limita o recrutamento vascular de leucócitos (KINLAY et al., 2001) e inibe a produção do fator tecidual (YANG et al., 2000), que é um determinante crítico na geração do trombo. Enquanto o NO é a principal substância vasodilatadora liberada pelo endotélio, a endotelina 1 age contrariamente ao NO, tendo um efeito vasoconstritor, além de aumentar a atividade central e periférica do sistema nervoso simpático, de possuir ação natriurética e de estimular o sistema renina-angiotensina-aldosterona (LÜSCHER et al., 1993).

Defeitos na via do NO podem levar ao desenvolvimento de muitas patologias, como hipertensão arterial, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, desordem no sistema nervoso central, diabetes mellitus entre outras (TAHA, 2003). O NO pode tornar-se tóxico, onde a toxicidade se faz presente, particularmente, em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (YAMAGUCHI et al., 2006).

Embora o NO seja vasodilatador e inibidor da oxidação endotelial da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (MALO-RANTA et al., 1994), trata-se de um radical livre que reage com o ânion superóxido liberado por macrófagos, produzindo peróxido-nitrito, potente agente oxidante que determina peroxidação lipídica e ampla destruição tecidual (RADI et al., 1991). Além disso, ocorre também a inativação do NO e o impedimento de suas ações fisiológicas no endotélio vascular, ocorrendo uma diminuição dos níveis de NO, ocasionando uma aceleração da lesão aterosclerótica (ALEXANDER, 1995).

O NO produzido pelas células endoteliais desempenha um importante papel protetor na aterosclerose, inibindo a oxidação das moléculas de LDL colesterol e impedindo a agregação plaquetária (OEMAR et al., 1998). A formação de LDL oxidado promove eventos

celulares de recrutamento de leucócitos para a região vascular afetada, os quais irão produzir substâncias deletérias para as células endoteliais, reduzindo a produção de NO e/ou sua disponibilidade (ROSENSON, 2004). Em um estudo realizado por NAKASHIMA et al. (1996), os pacientes hipercolesterolêmicos apresentaram níveis de nitrito/nitrato (NO_x), dois metabólitos do NO, inversamente correlacionados aos níveis de CT, pois a hipercolesterolemia suprime a resposta vasodilatadora, que resulta na diminuição da liberação de óxido nítrico.

2.3.4.1 Métodos de dosagem do óxido nítrico

Existem vários testes disponíveis para a determinação direta dos níveis de NO que quantificam NO em amostras biológicas, mas todas são difíceis de implementar porque o NO tem uma meia-vida curta *in vivo*, sendo produzido em pequenas quantidades nas células e reagindo rapidamente com o oxigênio, metais, sulfidril dissulfeto e hemoglobina (GUEVARA et al., 1998). Conseqüentemente, a mensuração dos metabólitos do NO, os íons de NO_2^- e NO_3^- são mais freqüentemente utilizados para avaliar a produção de NO (ASL et al., 2008).

As técnicas utilizadas para medir os níveis de NO de determinação direta utilizam metodologias complexas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), fluorimetria, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS), quimiluminescência, ressonância magnética e detecção eletroquímica através de sensores intravasculares (BRYAN e GRISHAM, 2007). Os metabólitos do NO podem ser quantificados separadamente por determinação indireta, sendo a reação de Griess o ensaio mais utilizado em virtude de sua simplicidade, rapidez e custo-benefício (ASL et al., 2008).

A reação colorimétrica de Griess foi proposta em 1879, sendo uma técnica padrão para a determinação dos níveis do NO_2^- inorgânico (DUSSE et al., 2005). Esta é uma reação de diazotização, onde o NO_2^- reage com a sulfanilamida para produzir um íon diazônio, sendo então ligado ao N-(1-naftil)etilenodiamina, formando um cromóforo, onde este apresenta um pico de absorvância em 540nm (BRYAN e GRISHAM, 2007). Neste ensaio simples, um grande número de amostras pode ser processado em um curto espaço de tempo, tornando este teste adequado para a rotina de laboratórios clínicos (MOSHAGE et al., 1995). O método de Griess apresenta vantagens em comparação com outras metodologias, uma vez que é simples,

barato e não requer equipamentos caros (DUSSE et al., 2005). Os valores de NO_x obtidos pelo método de Griess são menos confiáveis do que os resultados obtidos por outros métodos. No entanto, este método é simples e aplicável a rotina diária (RICART-JANÉ et al., 2002). Além disso, os metabólitos medidos pelo método de Griess têm mostrado uma boa correlação com CG-MS (ASL et al., 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de alguns marcadores inflamatórios, oxidativos e vasculares em pacientes com hipercolesterolemia.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar um método analítico automatizado para a dosagem de nitrito, um metabólito do NO, em amostras de plasma.
- Determinar os níveis de CT, HDL-C, LDL-C, triglicérides, Apo-A e Apo-B nos pacientes do estudo.
- Investigar os níveis de IL-6 e NO_x nos pacientes com hipercolesterolemia e indivíduos saudáveis.
- Avaliar a ativação da fibrinólise através da mensuração dos níveis de D-dímero nos pacientes hipercolesterolêmicos e indivíduos saudáveis.
- Investigar o perfil dos marcadores AOPP, IMA e –SH para a avaliação do estresse oxidativo nos pacientes do estudo.

4 RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um artigo científico e um manuscrito, apresentados a seguir. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprio artigo e manuscrito. O artigo I está disposto na versão aceita pela revista *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. O manuscrito II está disposto na versão a ser submetida.

4.1 ARTIGO CIENTÍFICO E MANUSCRITO

4.1.1 Artigo I

**A simple, fast and inexpensive automated technique for measurement of
plasma nitrite**

Letter to the Editor

A simple, fast and inexpensive automated technique for measurement of plasma nitrite

**Renata da Silva Pereira^{1,2}, Sílvia Juliane Piva^{1,2},
Etiane Tatsch^{1,2}, Helena Kober¹, Patrícia Gomes³,
Jarbas Rodrigues de Oliveira⁴ and Rafael Noal
Moresco^{1,2,*}**

¹ Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

³ Curso de Farmácia, Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, RS, Brazil

⁴ Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Keywords: inflammation; nitrite; oxidative stress; technique.

Nitric oxide (NO) is derived from the endothelium and is a potent vasorelaxant that elicits its effects by activating soluble guanylate cyclase, thereby stimulating the formation of cyclic guanosine monophosphate (1). Moreover, it participates in highly active metabolic and regulatory functions, including control of hemostasis, fibrinolysis, platelet and leukocyte interactions with the arterial wall, presentation of histocompatibility antigens, regulation of vascular tone, and growth and homeostasis of blood pressure (2). NO reacts with oxygen species and biological molecules, such as dioxygen, superoxide anion and oxyhemoglobin to form a variety of products, including nitrite and nitrate. Nitrite and nitrate are the major stable metabolites of endogenous NO and are accessible for quantitative analysis. Determination of these inorganic NO metabolites in blood and urine are most suitable for assessing indirect quantification of NO production in vivo (3). The Griess method is recommended for nitrate and nitrite quantification because it is easier, quicker, cheaper, and more sensitive than other methods (4). It requires a

shorter time for measurement of nitrate in serum compared with high performance liquid chromatography (HPLC) (5). In addition, this method can be applied to ELISA microplate readers (4). Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) based methods are presently the most accurate quantitative methods for nitrate and nitrite in plasma and serum. However, other analytical methods, such as gas and liquid chromatography, capillary electrophoresis and chemiluminescence have also been applied. However, the simplicity, rapidity and low cost of the batch Griess assay encourage attempts to improve its dependability, especially for use on large population in clinical studies (3). In addition, GC-MS equipment is expensive and the technique is tedious and requires specialized laboratory personnel to run the equipment (6).

The extensive use of the Griess method stems from its simple application without requirement of expensive instrumentation and its suitability to routine analysis of large numbers of cell culture medium and human samples (7). Although there are various methods for determination of NO metabolites, the simplicity, rapidity, and cost-effectiveness of the Griess assay has made this method more popular than others (8). Thus, our aim was to describe an automated technique for measurement of plasma nitrite by the Griess method using the Cobas Mira (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) clinical chemistry analyzer. The chemicals used were as follows: sodium nitrite, sulphanilamide and N-(1-naphthyl)ethylenediamine (NED) were purchased from Sigma, and orthophosphoric acid was purchased from Vetec (Brazil). Solutions of sodium nitrite were prepared in distilled/deionized water at the following concentrations: 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0 and 80.0 $\mu\text{mol/L}$ for development of the calibration curve. Griess reagent was composed of a mixture of sulphanilamide 2%, NED 0.2% and orthophosphoric acid in distilled/deionized water. Sulfanilamide reacts with the nitrite in the sample to form a diazonium salt which reacts with the NED to produce a purple-azo-dye product with a peak absorbance at 540 nm (4). In addition, other wavelengths in the range 520–590 nm can be used because the absorbance readings show only slight differences in this range (3).

Nitrite was measured by the Griess method using the Cobas Mira automated analyzer as follows: 30 μL of sample was pipetted into the reaction cuvette and 150 μL of Griess reagent was added. Then, the sample/Griess reagent mixture was incubated for 300 s and read at 550 nm. All incubations were at 37°C and results were expressed in $\mu\text{mol/L}$. Imprecision was studied using two controls at concentrations of 25 and 50 $\mu\text{mol/L}$. The intra-assay (within-run) precision was

*Corresponding author: Rafael Noal Moresco, Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1216, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil
Phone: +55 55-32208941, Fax: +55 55-32208018,
E-mail: rnmoresco@yahoo.com.br
Previously published online August 13, 2010

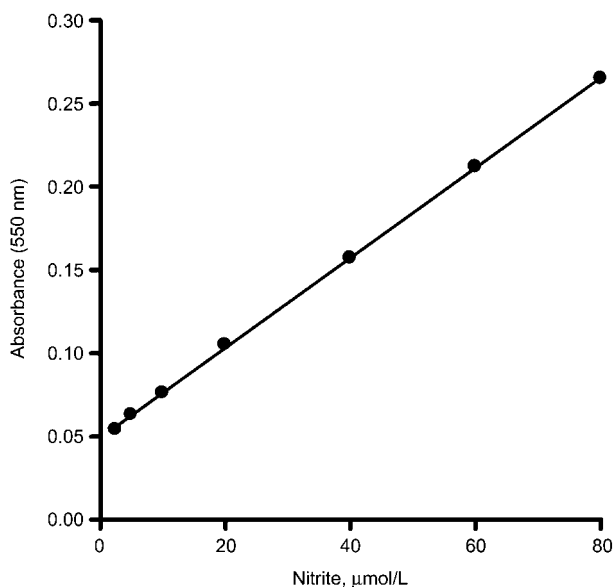


Figure 1 Linear regression for measurement of plasma nitrite by the Griess method with the Cobas Mira analyzer ($r^2=0.9998$, $p<0.001$). Solutions of sodium nitrite (2.5–80 $\mu\text{mol/L}$) were used as standard.

assessed with 10 replicate assays of each control in two analytical runs. Inter-assay (between-run) precision was assessed by analyzing duplicate assays for each of the two controls on four different days.

The automated technique for measurement of plasma nitrite by the Griess method using Cobas Mira analyzer was linear ($r^2=0.9998$, $p<0.001$), as shown in Figure 1. The regression equation was $y=0.0027x+0.049$. This method has a detection limit of 2.5 $\mu\text{mol/L}$, and was linear to at least 80 $\mu\text{mol/L}$. The intra-assay coefficients of variation (CVs) were 3.9% at 25 $\mu\text{mol/L}$ and 8.7% at 50 $\mu\text{mol/L}$. Inter-assay CVs were 6.9% at 25 $\mu\text{mol/L}$ and 4.4% at 50 $\mu\text{mol/L}$. Accuracy of the method was determined by addition of standard solutions of sodium nitrite (10.0, 20.0 and 40.0 $\mu\text{mol/L}$) to plasma samples. Nitrite concentrations were measured in triplicate. The mean recovery was 97.5%, showing that the method was accurate.

We measured nitrite concentrations in plasma obtained from 16 healthy volunteers (7 men and 9 women). The mean age of study participants was 42.3 ± 15.7 years. Blood samples were collected from subjects after an overnight fast into Vacutainer[®] (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with EDTA. Specimens were centrifuged at $2500\times g$ for 15 min. Plasma samples were deproteinized by adding 1/20th volume of zinc sulfate (300 g/L) to give a final concentration of 15 g/L. After centrifugation at $10,000\times g$ for 5 min at room temperature, samples were analyzed by the Griess assay using the Cobas Mira automated analyzer. This study protocol was approved by the Local Research Ethics Committee (registration number: 0198.0.243.000-09). Plasma nitrite in healthy subjects were 6.0 ± 2.1 $\mu\text{mol/L}$. Moshage et al. (9) reported a mean plasma nitrite concentration of 4.2 $\mu\text{mol/L}$ (range 1.3–13.0 $\mu\text{mol/L}$) for healthy volunteers.

Many factors influence formation, stability and the reaction fate of diazonium ions, intermediates and azo dyes in the Griess reaction. These factors are as follows: (a) relative concentration of sulfanilamide (SAN) and NED; (b) reactions of nitrite with the SAN and NED; (c) formation of more than one pigment; (d) oxidation of the diazonium ion intermediate and the azo dye; (e) reduction of the diazonium ion; (f) formation of semi stable nitroso-reductant intermediates; (g) pre-reaction of SAN with nitrite; and (h) pH values between 2.5–3.5 (10). One important mechanism to monitor the overall reliability of the Griess assays is the use of a quality control (QC) system. However, in practice the analysis of QC samples in parallel to study samples is very rare. Therefore, the establishment of QC systems and co-processing of QC samples for nitrite and nitrate in clinical studies is absolutely essential (10).

The nitrite values produced by the Griess method are less reliable than results given by other methods and many pre-analytical factors remain to be clarified. However, this method is easy and applicable to the daily routine. Nevertheless, NO metabolites measured by the Griess reaction have shown good correlation with GC-MS and HPLC methods (4). In conclusion, plasma nitrite measured by the Griess method can be applied easily to the Cobas Mira clinical chemistry analyzer and assay results are obtained in <6 min. Therefore, this simple, fast and inexpensive automated technique is applicable in daily routine laboratory practice for assessing and monitoring oxidative stress as well as inflammatory process in several clinical conditions.

Conflict of interest statement

Authors' conflict of interest disclosure: The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Research funding: None declared.

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

References

1. Fukuto JM, Hobbs AJ, Ignarro LJ. Conversion of nitroxyl (HNO) to nitric oxide (NO) in biological systems: the role of physiological oxidants and relevance to the biological activity of HNO. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;196:707–13.
2. Ignarro LJ, Napoli C. Novel features of nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, and atherosclerosis. *Curr Diab Rep* 2005; 5:17–23.
3. Romitelli F, Santini SA, Chierici E, Pitocco D, Tavazzi B, Amorini AM, et al. Comparison of nitrate/nitrite concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: the importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;851: 257–67.
4. Ricart-Jané D, Llobera M, López-Tejero MD. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite

- quantification by the Griess method. *Nitric Oxide* 2002;6:178–85.
5. Larsen TL, Nilsen V, Andersen DO, Francis G, Rustad P, Mansoor MA. Comparison of high-pressure liquid chromatography (HPLC) and Griess reagent-spectroscopic methods for the measurement of nitrate in serum from healthy individuals in the Nordic countries. *Clin Biochem* 2008;41:1474–81.
 6. Larsen TL, Nilsen V, Andersen DO, Mansoor MA. On the importance of the use of proper approaches for comparison of analytical methods for serum nitrate and evaluation of reference concentrations. *Clin Biochem* 2009;42:1197–9.
 7. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001;5:62–71.
 8. Asl AZ, Ghasemi A, Azizi F. Serum nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome. *Clin Biochem* 2008;41:1342–47.
 9. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PLM. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995;41:892–6.
 10. Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B* 2007;851:51–70.

4.1.2 Manuscrito I

Advanced oxidation protein products as a marker of oxidative stress in patients with hypercholesterolemia

Renata S. Pereira^{a,b}, Silvia J. Piva^{a,b}, Etiane Tatsch^{a,b}, Helena Kober^a, Daiane Brezolin^a, Guilherme V. Bochi^{a,c}, Thiago Duarte^a, Marta M. M. F. Duarte^d, Ivana B. M. Da Cruz^c, José E. P. Da Silva^{a,b}, Rafael N. Moresco^{a,b,c,*}

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

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^cPrograma de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^dDepartamento de Ciências da Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, RS, Brazil

***Corresponding Author:** Rafael Noal Moresco

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1402, Camobi, 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil.

Tel.: +55 55 32208941; Fax: +55 55 32208018

E-mail: rnmoresco@yahoo.com.br

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the levels of advanced oxidation protein products (AOPP) in patients with hypercholesterolemia. We also investigated the association between hypercholesterolemia and inflammatory, fibrinolytic and other oxidative stress biomarkers.

Design and methods: Fasting glucose, total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, acid uric, total protein, albumin, Apo A, Apo B, AOPP, ischemia-modified albumin (IMA), total plasma thiols (-SH group), nitrate/nitrite (NO_x), interleukin-6 (IL-6) and D-dimer levels were assessed in 38 patients with hypercholesterolemia and 20 healthy controls.

Results: Total cholesterol, triglycerides, LDL cholesterol, Apo A, Apo B, AOPP, IMA, IL-6 and D-dimer levels were significantly higher in subjects with hypercholesterolemia, while NO_x and plasma -SH group levels were lower in hypercholesterolemic subjects.

Conclusions: AOPP levels are increased in patients with hypercholesterolemia, and AOPP may prove to be an early marker for assessment of protein oxidation.

Keywords: hypercholesterolemia; atherosclerosis; oxidative stress; inflammation; fibrinolysis.

1. Introduction

Hypercholesterolemia is a common health problem with increased prevalence in many countries [1]. It is widely accepted as one of the major risk factors for the development of ischemic heart diseases, including angina and myocardial infarction. Although the risks imposed by hypercholesterolemia seem to be manifold, most attention has been devoted to its role in atherosclerosis [2]. Atherosclerosis is an inflammatory disease associated with endothelial cell activation, oxidative stress, and the accumulation of leukocytes in the walls of arteries [3].

Oxidative stress is associated with the damage of biological structures by reactive oxygen species (ROS) excessive generation and by the deficiency of antioxidant defense mechanisms [4]. Overproduction of free radicals may also produce chemical modification of human serum albumin, resulting in an increased ischemia-modified albumin (IMA). Currently, IMA is regarded as a biomarker of oxidative stress related to ischemia-reperfusion in different clinical conditions associated with oxidative stress, such as myocardial ischemia [5], chronic kidney disease [6], type 2 diabetes mellitus [7,8], metabolic syndrome [9] and hypercholesterolemia [10].

In 1996, a novel oxidative stress biomarker, referred to as advanced oxidation protein products (AOPP), was detected in the plasma of chronic uremic patients. AOPP levels are a measure of highly oxidized proteins, especially albumin [11]. AOPP has been highly correlated to carotid intima media thickness and may even be related to atherosclerotic cardiovascular events [12,13]. Thus, considering the interplay of different mechanisms related to atheroma plaque development and the importance of oxidative stress for atherosclerosis development, the aim of this study was to evaluate the levels of AOPP in patients with hypercholesterolemia. Furthermore, we investigated the association between hypercholesterolemia and inflammatory, fibrinolytic and other oxidative stress biomarkers.

2. Materials and methods

2.1. Study population

This study included 58 volunteers enrolled in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. Subjects were divided into two groups according to serum LDL cholesterol levels, as follows: control group, with 20 healthy subjects presenting LDL cholesterol levels ≤ 3.37 mmol/L (130 mg/dL) and hypercholesterolemia group with 38 subjects presenting LDL cholesterol levels ≥ 4.15 mmol/L (160 mg/dL). Hypercholesterolemia was defined as LDL cholesterol ≥ 4.15 mmol/L [14]. Patients presenting diabetes mellitus, pregnancy, inflammatory processes, and familial hypercholesterolemia as well as subjects on statins therapy were excluded from this study. This protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (number 0198.0.243.000-09).

2.2. Clinical measurements

Anthropometric measurements with emphasis to clinical markers of adiposity were obtained. Body mass index (BMI) was calculated by dividing the weight (kg) with height (m^2). Waist circumference (cm) was measured in average distance between the last rib and iliac crest, around the navel. All patients answered to a clinical and epidemiological assessment evaluating the practice of physical exercises, smoking, and hypertension, treatment with statins and/or other drugs.

2.3. Biochemical determinations

Blood samples were collected from all subjects after an overnight fast by venous puncture technique into Vacutainer[®] (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with sodium fluoride plus EDTA, EDTA, citrate or no anticoagulants. Specimens were routinely centrifuged at $2500 \times g$ for 15 min at 4°C. Blood collected with sodium fluoride plus EDTA was used for measurement of plasma fasting glucose. Plasma EDTA was used to measure AOPP, while the serum was used to assess the levels of total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, uric acid, total proteins, albumin, Apo A, Apo B, IMA, IL-6, and nitrate/nitrite (NO_x). Blood collected with sodium citrate was used for measurement of plasma D-dimer. Fasting glucose, total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, uric acid, creatinine, total

proteins, albumin, Apo A and Apo B were performed by use of standard methods on Cobas MIRA[®] automated analyzer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). LDL cholesterol was estimated with the Friedewald equation [15]. D-dimer levels were measured by immunoturbidimetric method on Cobas INTEGRA 400[®] (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Serum IMA was measured on Cobas MIRA[®] automated analyzer by colorimetric assay based on biochemical properties of albumin to bind exogenous cobalt as previously described [8]. AOPP was measured on Cobas MIRA[®] automated analyzer as previously described [16]. Total plasma thiols (-SH group) were assayed according the method previously described by Ellman [17]. IL-6 was measured by capture ELISA according to the manufacturer instructions (eBIOSCIENCE, San Diego, USA). Serum NO_x was measured on Cobas MIRA[®] by a method previously described and validated by Tatsch et al. [18].

2.4. Statistical analysis

Differences in baseline clinical characteristics were investigated by Student's *t* test for continuous variables and Fisher's exact test for categorical variables. Pearson correlation was assessed to investigate the association between LDL and other biomarkers. Statistical significance was assumed at $P < 0.05$. Data were analyzed using GraphPad Prism version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

Baseline characteristics of the study subjects are shown in Table 1. Total cholesterol, triglycerides, LDL cholesterol, Apo A, and Apo B were significantly higher in subjects with hypercholesterolemia. IMA and AOPP levels were higher in hypercholesterolemia group, while plasma -SH group levels were lower in this group, as shown in Figure 1. D-dimer and IL-6 levels were higher in hypercholesterolemia group, while NO_x levels were lower in this group (Figure 2).

Please add the **Table 1** here

Please add the **Figure 1** here

Please add the **Figure 2** here

4. Discussion

The incidence of atherosclerosis increases with hypercholesterolemia, and we described in this study an increase of oxidative stress, inflammation and fibrinolysis in hypercholesterolemic subjects. Although the increase of oxidative stress in hypercholesterolemia has already been reported, to our knowledge, this study provides at first time the increase of AOPP, a novel biomarker of protein oxidation, in hypercholesterolemic subjects. AOPP represent an excellent novel marker of oxidative stress and their roles in the development of cardiovascular disease might be of great importance [19].

Oxidative stress plays a key role in the pathogenesis and development of atherosclerosis [4] and their products have a potential use as disease progression markers and consequently it has been the focus of current biomedical research. Increased oxidative stress by products and/or a reduced antioxidant activity are the main causes of atherosclerosis and endothelial dysfunctions [20]. In this study, we observed a significant increase of IMA levels in hypercholesterolemic subjects, as previously reported by our team [10]. Atherosclerosis is accompanied by oxidative stress, which consists of the damage of biological structures by ROS due to their excessive generation and impaired efficiency of antioxidant defense mechanisms. The increase of IMA levels in patients with hypercholesterolemia could be attributed to the increase of oxidative stress because ROS may chemically modify the N-terminal region of human serum albumin, resulting in IMA formation [10,21,22]. We also observed a decrease of plasma –SH group in hypercholesterolemic subjects, such as a significant inverse correlation between plasma –SH group and LDL cholesterol. Oxidation of plasma –SH group is quantitatively the major manifestation of oxidative protein damage [23].

The attack of ROS modifies amino acid, lysine, arginine, proline, and histidine residues generating carbonyl moieties and action of chloraminated oxidants, mainly hypochlorous acid and chloramines, produced by myeloperoxidase in activated neutrophils. This attack forms dityrosine containing cross-linked protein products known as AOPP, which is identified as an early marker for oxidative stress and is used as a measure of protein damage [11,24]. We reported in this study higher levels of AOPP in hypercholesterolemic subjects. AOPP is formed during oxidative stress by the reaction of plasma protein with chlorinated oxidants [11,25], and it was suggested as a measure of highly oxidized proteins, especially albumin [16]. *In vivo*, plasma concentration of AOPP closely correlate with levels of

dityrosine, a hallmark of oxidized protein, and pentosidine, a marker of protein glycooxidation tightly related to oxidative stress [11]. Some studies have reported the increase of AOPP in other diseases as type 2 diabetes [26], uremia [11] and polycystic ovary syndrome [27]. Although enhanced oxidative stress in uremia has been demonstrated and linked to clinical complications such as atherosclerosis, little is known about the underlying mechanisms [28]. Recently, evidence has been provided that AOPP are proinflammatory mediators that directly impair HDL metabolism and might therefore be potential key players in the development of cardiovascular disease. Marsche et al. [19] show that in vitro-generated AOPP-albumin binds with high affinity to the HDL scavenger receptor class B type I (SR-BI). Already an equimolar concentration of AOPP-albumin to HDL blocked HDL association to SR-BI and effectively inhibited SR-BI-mediated cholesterol ester uptake. Interestingly, albumin extensively modified by advanced glycation end products (AGE-albumin), which is an established SR-BI ligand known to accumulate in renal disease, only weakly interfered with HDL binding to SR-BI. Thus, depressed plasma clearance of HDL-cholesterol may contribute to the abnormal composition of HDL and the high cardiovascular risk observed in patients with chronic renal failure [19].

Accumulating evidences suggest that inflammatory processes, in part, mediate the development and progression of atherosclerosis. The IL-6 plays an important role in mediating inflammation and is a central stimulus for the acute-phase response [29]. The levels of IL-6 were higher in the hypercholesterolemic subjects, which agrees with previous studies [10,29,30]. IL-6 and CRP herald systemic inflammation is associated with atherothrombosis [29]. During thrombus formation, plasmin degrades cross-linked fibrin polymers, resulting in the formation of a number of soluble cross-linked fibrin degradation products of various molecular weights. The smallest and best characterized of these products is D-dimer [31,32].

We reported in this study higher levels of D-dimer in hypercholesterolemic subjects. D-dimer levels may reflect atherosclerosis severity because D-dimer is a marker of ongoing fibrin formation and degradation, and its concentration is dependent on the amount of fibrin associated with arteriosclerotic thrombi [33]. Increased levels of D-dimer and inflammatory markers may be associated with functional impairment because they are sensitive measures of the burden of lower extremity and systemic atherosclerosis [33-35]. Inflammatory markers may also be measures of the extent of atherosclerotic activity [35-37]. In addition, D-dimer has been shown to induce the synthesis and release of inflammatory cytokines IL-6 and IL-1 β [38].

The hypercholesterolemic subjects in our study have showed lower levels of NO_x. Alterations of NO synthesis or in its physiological activity can play a central role in the endothelial dysfunction [39-41]. NO plays a protective role by suppressing abnormal proliferation of vascular smooth muscle cells following various pathological situations including atherosclerosis. NO appears to exert an anti-atherogenic effect by inhibition of fatty streak formation in animal model [42]. It participates in highly active metabolic and regulatory functions including control of hemostasis, fibrinolysis, platelet and leukocyte interactions with the arterial wall, presentation of histocompatibility antigens, regulation of vascular tone and growth, and homeostasis of blood pressure [43].

In summary, our study supports the idea that atherosclerosis is a complex disorder with disturbances in oxidative stress, inflammation and fibrinolysis. We conclude that AOPP levels are increased in patients with hypercholesterolemia, and AOPP may prove to be an early marker of oxidative stress for assessment of protein damage in hypercholesterolemic subjects. However, further studies are required to investigate this association in a larger population.

Acknowledgements

This study was supported in part by a grant from FIPE Jr/UFSM (Brazil). The authors thank FAPERGS for providing a fellowship.

Conflicts of interest statement

None of the authors have conflicts of interest to declare.

References

- [1] Ghandehari H, Kamal-Bahl S, Wong ND. Prevalence and extent of dyslipidemia and recommended lipid levels in US adults with and without cardiovascular comorbidities: the National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *Am Heart J* 2008;156:112-9.

- [2] Taylor A, Granger DN. Hypercholesterolemia promotes P-Selectin-dependent platelet-endothelial cell adhesion in postcapillary venules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:675-80.
- [3] Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 2000;247:349-58.
- [4] Vassalle C, Pratali L, Boni C, Mercuri A, Ndreu R. An oxidative stress score as a combined measure of the pro-oxidant and anti-oxidant counterparts in patients with coronary artery disease. *Clin Biochem* 2008;41:1162-7.
- [5] Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia: a preliminary report. *J Emerg Med* 2000;19:311-5.
- [6] Cichota LC, Moresco RN, Duarte MM, Da Silva JE. Evaluation of ischemia-modified albumin in anemia associated to chronic kidney disease. *J Clin Lab Anal* 2008;22:1-5.
- [7] Piwowar A, Knapik-Kordecka M, Warwas M. Ischemia-modified albumin level in type 2 diabetes mellitus: preliminary report. *Dis Markers* 2008;24:311-7.
- [8] Kaefer M, Piva SJ, De Carvalho JA, et al. Association between ischemia modified albumin, inflammation and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2010;43:450-4.
- [9] Gottlieb MG, Da Cruz IB, Duarte MM, et al. Associations among metabolic syndrome, ischemia, inflammatory, oxidatives, and lipids biomarkers. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:586-91.
- [10] Duarte MM, Rocha JB, Moresco RN, et al. Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. *Clin Biochem* 2009;42:666-71.
- [11] Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996;49:1304-13.
- [12] Drüeke T, Witko-Sarsat V, Massy Z, et al. Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease. *Circulation* 2002;106:2212-7.
- [13] Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, et al. Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2005;45:39-47.
- [14] Skilton MR, Moulin P, Sérusclat A, Nony P, Bonnet F. A comparison of the NCEP-ATPIII, IDF and AHA/NHLBI metabolic syndrome definitions with relation to early carotid atherosclerosis in subjects with hypercholesterolemia or at risk of CVD: evidence for sex-specific differences. *Atherosclerosis* 2007;190:416-22.

- [15] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
- [16] Selmeçi L, Seres L, Antal M, Lukács J, Regöly-Méreaia A, Acsády G. Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple, fast and inexpensive automated technique. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:294-7.
- [17] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-7.
- [18] Tatsch E, Bochi GV, Pereira RS, et al. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clin Biochem* 2011;44:348-50.
- [19] Marsche G, Frank S, Hrzenjak A, et al. Plasma-advanced oxidation protein products are potent high-density lipoprotein receptor antagonists in vivo. *Circ Res* 2009;104:750-7.
- [20] Redón J, Oliva MR, Tormos C, et al. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension* 2003;41:1096-101.
- [21] Roy D, Quiles J, Gaze DC, Collinson P, Kaski JC, Baxter GF. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischaemia modified albumin. *Heart* 2006;92:113-4.
- [22] Roy D, Kaski JC. Ischemia-modified albumin: the importance of oxidative stress. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:2375-6.
- [23] Aydin S, Uzun H, Sozer V, Altug T. Effects of atorvastatin therapy on protein oxidation and oxidative DNA damage in hypercholesterolemic rabbits. *Pharmacol Res* 2009;59:242-7.
- [24] Pandey KB, Mishra N, Rizvi SI. Protein oxidation biomarkers in plasma of type 2 diabetic patients. *Clin Biochem* 2010;43:508-11.
- [25] Kelly CJ, Speirs A, Gould GW, Petrie JR, Lyall H, Connell JM. Altered vascular function in young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:742-6.
- [26] Piwowar A, Kordecka MK, Warwas M. AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77:188-92.
- [27] Kaya C, Erkan AF, Cengiz SD, Dündar I, Demirel OE, Bilgihan A. Advanced oxidation protein products are increased in women with polycystic ovary syndrome: relationship with traditional and nontraditional cardiovascular risk factors in patients with polycyst ovary syndrome. *Fertil Steril* 2009;92:1372-7.

- [28] Liu SX, Hou FF, Guo ZJ, et al. Advanced oxidation protein products accelerate atherosclerosis through promoting oxidative stress and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1156-62.
- [29] Bermudez EA, Rifai N, Buring J, Manson JE, Ridker PM. Interrelationships among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1668-73.
- [30] Porreca E, Di Febbo C, Di Castelnuovo A, et al. Association of factor VII levels with inflammatory parameters in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 2002;165:159-66.
- [31] Kearon C, Ginsberg JS, Douketis J, et al. Management of suspected deep venous thrombosis in outpatients by using clinical assessment and D-dimer testing. *Ann Intern Med* 2001;135:108-11.
- [32] Moresco RN, Vargas LCR, Halla-Junior R, Silla LMR. Lack of association between cardiac troponin T and D-Dimer in the evaluation of myocardial damage. *J Clin Lab Anal* 2005;19:282-4.
- [33] Lee AJ, Fowkes FG, Lowe GD, Rumley A. Fibrin D-dimer, haemostatic factors and peripheral arterial disease. *Thromb Haemost* 1995;74:828-32.
- [34] Herren T, Stricker H, Haeberli A, Do DD, Straub PW. Fibrin formation and degradation in patients with arteriosclerotic disease. *Circulation* 1994;90:2679-86.
- [35] McDermott MM, Greenland P, Green D, et al. D-dimer, inflammatory markers, and lower extremity functioning in patients with and without peripheral arterial disease. *Circulation* 2003;107:3191-8.
- [36] Alexander RW. Inflammation and coronary artery disease. *N Engl J Med* 1994; 18:331:468-9.
- [37] Rajavashisth TB, Xu XP, Jovinge S, et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators. *Circulation* 1999;99:3103-9.
- [38] Rao KM, Pieper CS, Currie MS, Cohen HJ. Variability of plasma IL-6 and crosslinked fibrin dimers over time in community dwelling elderly subjects. *Am J Clin Pathol* 1994;102:802-5.
- [39] Harrison DG. Endothelial control of vasomotion and nitric oxide production: a potential target for risk factor management. *Cardiol Clin* 1996;14:1-15.
- [40] Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997;100:2153-7.

- [41] Siekmeier R, Grammer T, März W. Roles of oxidants, nitric oxide, and asymmetric dimethylarginine in endothelial function. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2008;13:279-97.
- [42] Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 1998;141:1-15.
- [43] Napoli C, Nigris F, Williaws-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric oxide* 2006;15: 265-79.

Table 1. Baseline characteristics of study patients

	Control	Hypercholesterolemia	P value
n	20	38	
Age (years)	47.8 ± 2.4	52.9 ± 2.3	0.172
Male (%)	55.0	47.4	0.783
Hypertension (%)	0.0	7.9	0.544
Smokers (%)	10.0	7.9	1.000
BMI (Kg/m ²)	24.8 ± 0.8	25.9 ± 0.6	0.289
Waist circumference (cm)	86.3 ± 11.1	87.6 ± 14.9	0.730
Fasting glucose (mmol/L)	4.5 ± 2.5	4.5 ± 2.4	0.946
Total cholesterol (mmol/L)	4.3 ± 0.1	7.4 ± 0.2**	<0.001
LDL cholesterol (mmol/L)	2.7 ± 0.1	5.5 ± 0.1**	<0.001
HDL cholesterol (mmol/L)	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.570
Triglycerides (mmol/L)	1.3 ± 0.1	2.1 ± 0.2*	0.002
Uric acid (mmol/L)	0.28 ± 0.02	0.30 ± 0.01	0.593
Creatinine (μmol/L)	91.3 ± 5.6	82.7 ± 3.4	0.173
Total proteins (g/L)	66.9 ± 2.9	63.2 ± 1.2	0.166
Serum albumin (g/L)	35.9 ± 1.2	36.8 ± 1.1	0.593
Apo A (g/L)	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1*	0.001
Apo B (g/L)	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1**	<0.001

Data are expressed as mean and SEM or percentages.

Figure 1

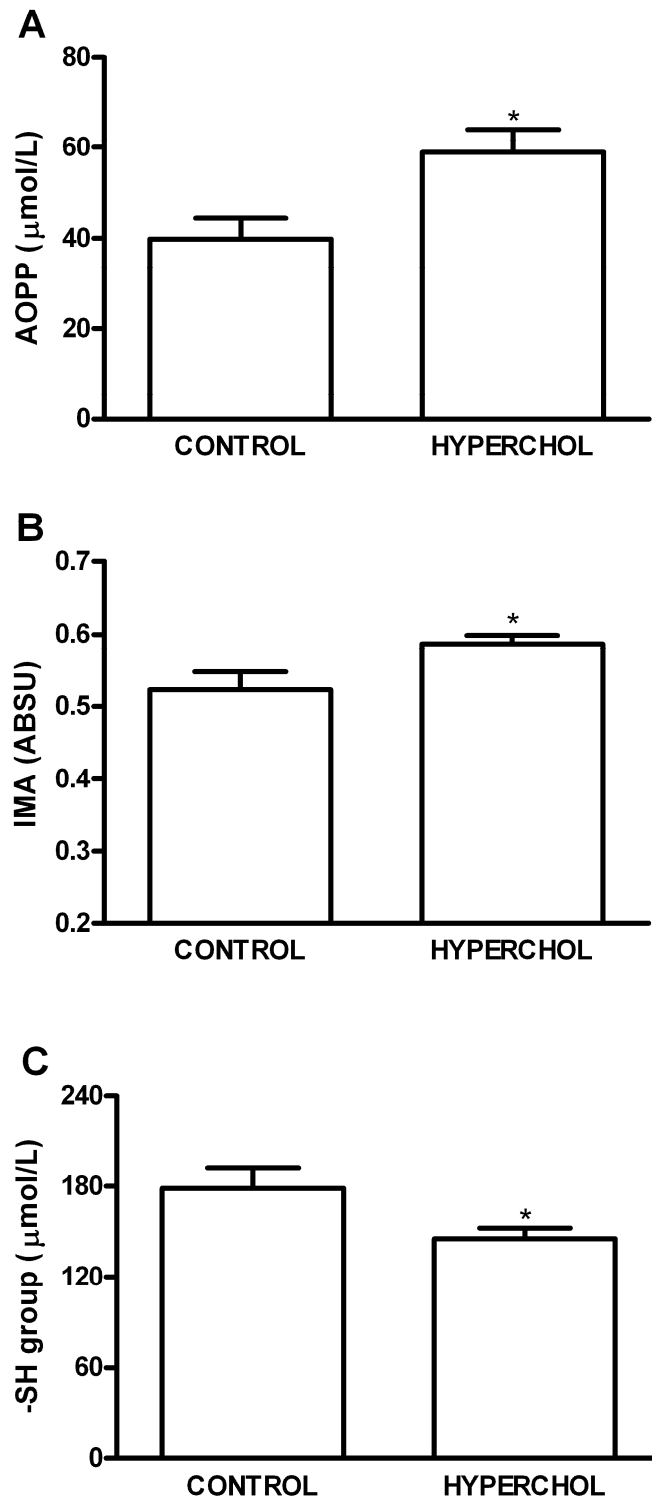


Figure 1. The values of AOPP (A), IMA (B), and -SH group (C) in control and hypercholesterolemia groups. Data are shown as means \pm standards errors. *P<0.05.

Figure 2

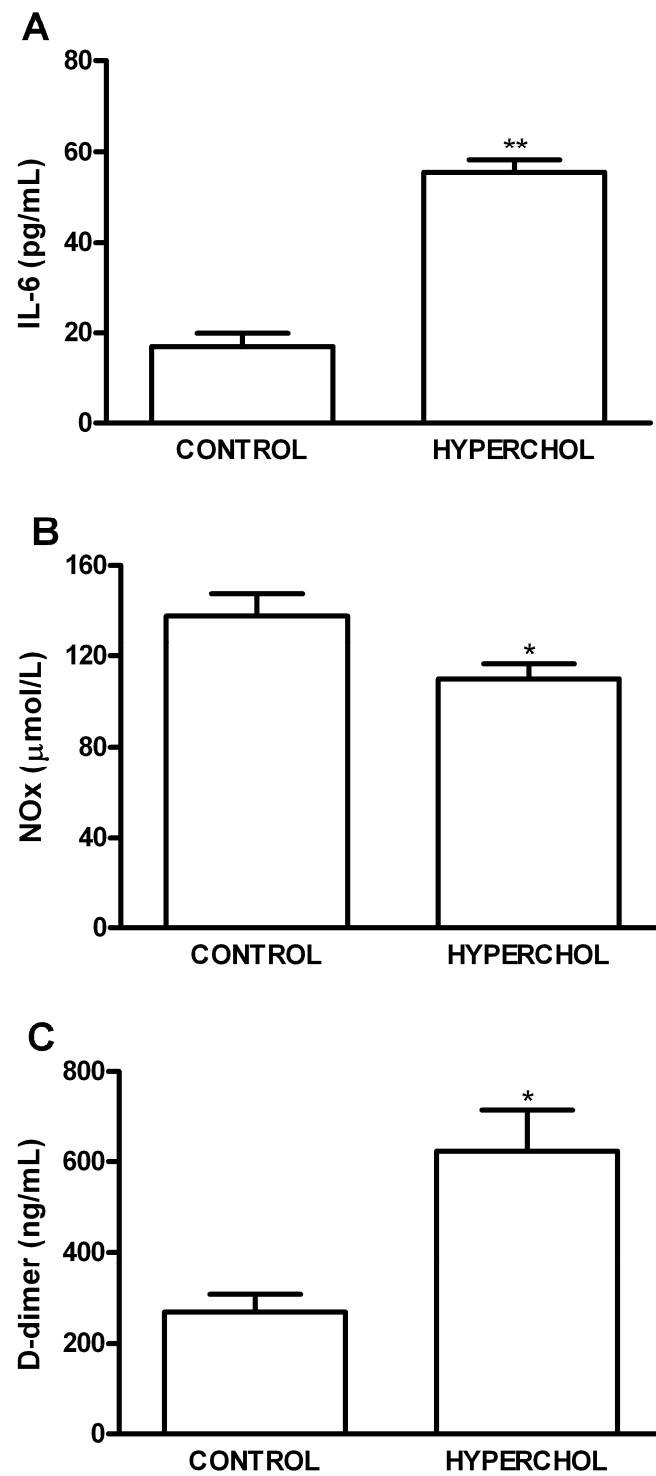


Figure 2. The values of IL-6 (A), NO_x (B), and D-dimer (C) in control and hypercholesterolemia groups. Data are shown as means ± standards errors *P<0.05, **P<0.001.

5 DISCUSSÃO

No manuscrito I foi descrito e validado um método analítico automatizado capaz de detectar os níveis de nitrito no plasma, um metabólito do NO, pela técnica de Griess. Este método foi adaptado ao sistema automatizado Cobas Mira[®] e apresentou-se linear, preciso, simples, pouco dispendioso, rápido e aplicável na prática diária no laboratório para avaliar o estresse oxidativo, disfunção endotelial, bem como o processo inflamatório em várias condições clínicas. O NO reage com EROs e moléculas biológicas, tais como oxigênio molecular, superóxido e hemoglobina para formar uma variedade de produtos, incluindo o nitrito e o nitrato. Nitrito e nitrato são os principais metabólitos estáveis do NO endógeno e são acessíveis para a análise quantitativa. A determinação dessas substâncias inorgânicas, dos metabólitos do NO, no sangue e na urina acabou por ser o método mais adequado para avaliar a quantificação indireta da produção de NO *in vivo* (ROMITELLI et al., 2007). O método de Griess é recomendado para quantificação de nitrato e nitrito, pois é mais fácil, mais rápido, mais barato e mais sensível do que outros métodos (RICART-JANÉ et al., 2002).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) é atualmente o método mais preciso para a quantificação de nitrato e nitrito no plasma e no soro, mas outros métodos analíticos (cromatografia líquida, eletroforese capilar e quimiluminescência) também são aplicados. No entanto, a simplicidade, rapidez e baixo custo do método de Griess estimulam a tentativa de melhorar a sua confiabilidade, especialmente em grandes populações de estudos clínicos (ROMITELLI et al., 2007). Além disso, o equipamento de CG-MS é caro, a técnica é fastidiosa e requer pessoal de laboratório especializado para operar o equipamento (LARSEN et al., 2009). O uso extensivo do método de Griess decorre de sua aplicação simples, sem necessidade de instrumentos caros e a sua adequação às análises de rotina para o processamento de um grande número de amostras (MIRANDA et al., 2001). Os valores de nitrito fornecidos pelo método de Griess são menos confiáveis do que os resultados obtidos por outros métodos, muitos fatores pré-analíticos devem ainda serem esclarecidos, mas esse método é fácil e ainda aplicável no cotidiano. Entretanto, os metabólitos medidos pela reação de Griess têm mostrado uma boa correlação com o CG-MS e CLAE (RICART-JANÉ et al., 2002). Assim, níveis de nitrito plasmáticos medido pelo método de Griess podem ser facilmente aplicados ao analisador de química clínica Cobas Mira[®] e os resultados do ensaio são obtidos em menos de seis minutos. Portanto, esta técnica simples, rápida, barata e

automatizada é aplicável na prática diária no laboratório clínico para avaliar o estresse oxidativo, bem como o processo inflamatório em várias condições clínicas.

No manuscrito II, os níveis de colesterol total, triglicérides, LDL-C, Apo-A, Apo-B, IMA, AOPP, IL-6 e D-dímero foram significativamente maiores nos pacientes hipercolesterolêmicos, enquanto os níveis de NO_x e de -SH foram inferiores neste grupo. Foram observadas correlações significativas entre os níveis de LDL-C e IL-6, NO_x e -SH.

Neste estudo, foi observado um aumento do estresse oxidativo, da inflamação e da fibrinólise em indivíduos hipercolesterolêmicos. O aumento do estresse oxidativo e da inflamação já foi relatado em outros estudos, porém, ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que demonstra o aumento da AOPP, um biomarcador de oxidação protéica, em indivíduos hipercolesterolêmicos. AOPP representa um excelente marcador de estresse oxidativo e seu papel no desenvolvimento de doença cardiovascular é de grande importância (MARSCHE et al., 2009). O estresse oxidativo desempenha um papel essencial na patogênese e no desenvolvimento da aterosclerose (VASSALE et al., 2008) e seus produtos têm um uso potencial como marcadores de progressão da doença, e conseqüentemente, tem sido o foco da investigação médica atual. Aumento do estresse oxidativo por produtos e/ou por atividade antioxidante reduzida são as principais causas de aterosclerose e disfunção endotelial (REDÓN et al., 2003).

O ataque das EROs modifica aminoácidos, lisina, arginina, prolina e ação de oxidantes cloraminados, principalmente o ácido hipocloroso e cloraminas, produzidos por mieloperoxidase em neutrófilos ativados. Estas formas de ataque, ditirosina, que são produtos contendo proteína conhecida como AOPP, que é identificada como um marcador precoce de estresse oxidativo e é usado como uma medida de dano a proteínas (WITKO-SARSAT et al., 1996; PANDEY et al., 2010). Os níveis de AOPP foram significativamente mais elevados em indivíduos hipercolesterolêmicos. AOPP é formada durante o estresse oxidativo, através da reação de proteínas plasmáticas com oxidantes clorados (WITKO-SARSAT et al., 1996; KELLY et al., 2002) e é sugerida como uma medida de proteínas altamente oxidadas, especialmente a albumina (SELMENCI et al., 2005).

In vivo, a concentração plasmática de AOPP está estreitamente correlacionada com os níveis de ditirosina, uma indicação de proteínas oxidadas, e pentosidina, um marcador de proteína glicoxidada intimamente relacionadas ao estresse oxidativo (WITKO-SARSAT et al., 1996). Alguns estudos tem relado o aumento da AOPP em outras doenças como diabetes tipo 2 (PIWOWAR et al., 2007), uremia (WITKO-SARSAT et al., 1996) e síndrome do ovário policístico (KAYA et al., 2009). Embora, o estresse oxidativo na uremia tenha sido

demonstrado e ligado a complicações clínicas, tais como aterosclerose, pouco se sabe sobre os mecanismos subjacentes (LIU et al., 2006). Recentemente, foi comprovado que AOPP são mediadores pró-inflamatórios que prejudicam diretamente o metabolismo da HDL e pode, portanto ter potencial chave no desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Além disso, foi demonstrado um aumento significativo dos níveis de IMA em indivíduos hipercolesterolêmicos, conforme relatado anteriormente em outro estudo conduzido por nosso grupo (DUARTE et al., 2009). A aterosclerose é acompanhada pelo estresse oxidativo, que consiste na lesão de estruturas biológicas por EROs, devido à sua geração excessiva e eficiência diminuída dos mecanismos de defesa antioxidante. O aumento dos níveis de IMA em pacientes com hipercolesterolemia pode ser atribuído ao aumento do estresse oxidativo devido as EROs que podem modificar quimicamente a região N-terminal da albumina no soro humano, resultando na formação da IMA (DUARTE et al., 2009; ROY et al., 2006; ROY et al., 2007). Observou-se também uma diminuição dos níveis plasmáticos de -SH em indivíduos hipercolesterolêmicos, com uma significativa correlação inversa entre -SH e LDL-C. A oxidação do grupo -SH plasmático é quantitativamente a principal manifestação do dano oxidativo de proteínas (AYDIN et al., 2009).

Evidências sugerem que processos inflamatórios medeiam o desenvolvimento e a progressão da aterosclerose. A IL-6 desempenha um papel importante na mediação da inflamação e é um estímulo central para resposta de fase aguda (BERMUDEZ et al., 2002). Os níveis de IL-6 foram mais elevados nos pacientes com hipercolesterolemia, em concordância, com estudos anteriores (DUARTE et al., 2009, BERMUDEZ et al., 2002, PORRECA et al., 2002). IL-6 e PCR anunciam inflamação sistêmica e estão associados com aterotrombose (BERMUDEZ et al., 2002). Durante a formação do trombo, a plasmina degrada polímeros de fibrina com ligações cruzadas, resultando na formação de uma série de produtos solúveis de fibrina com ligações cruzadas de degradação de vários pesos moleculares. O menor e melhor caracterizado destes produtos é o D-dímero (KEARON et al., 2001; MORESCO et al., 2005). Foi relatado níveis de D-dímero mais elevados em pacientes com hipercolesterolemia. Os níveis de D-dímero podem refletir a gravidade da aterosclerose, pois D-dímero é um marcador da formação de fibrina e da degradação em curso, e a sua concentração depende da quantidade de fibrina associada com trombos ateroscleróticos (LEE et al., 1995). Níveis elevados de D-dímero e marcadores inflamatórios podem estar associados ao comprometimento funcional vascular, porque são marcadores sensíveis de aterosclerose sistêmica (LEE et al., 1995; McDERMOTT et al., 2003).

Marcadores inflamatórios podem refletir a extensão da atividade da aterosclerose (ALEXANDER et al., 1994, RAJAVASHIST et al., 1999, MCDERMOTT et al., 2003). Além disso, o D-dímero induz a síntese e liberação das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-1 (RAO et al., 1994). Os indivíduos hipercolesterolêmicos, em nosso estudo, mostraram níveis mais baixos de NO_x. Alterações da síntese de NO ou da sua atividade fisiológica pode desempenhar um papel central na disfunção endotelial (HARRISON, 1996, HARRISON, 1997; SIEKMEIER et al., 2008). O NO desempenha um papel protetor pela proliferação anormal de células musculares lisas vasculares após diversas situações patológicas, incluindo aterosclerose. O NO parece exercer um efeito anti-aterogênico pela inibição da formação de estrias gordurosas em modelo animal (HEINECKE et al., 1998), participa das funções metabólicas e reguladoras, incluindo controle da hemostasia, a fibrinólise, plaquetas e leucócitos interações com a parede arterial, apresentação de antígenos de histocompatibilidade, regulação do tônus vascular e crescimento, e na homeostase da pressão arterial (NAPOLI et al., 2006). Dessa forma, o manuscrito II demonstrou que a hipercolesterolemia promove o aumento da inflamação, do estresse oxidativo e da fibrinólise durante a aterosclerose. Em resumo, as principais contribuições deste estudo estão apresentadas na Figura 5.

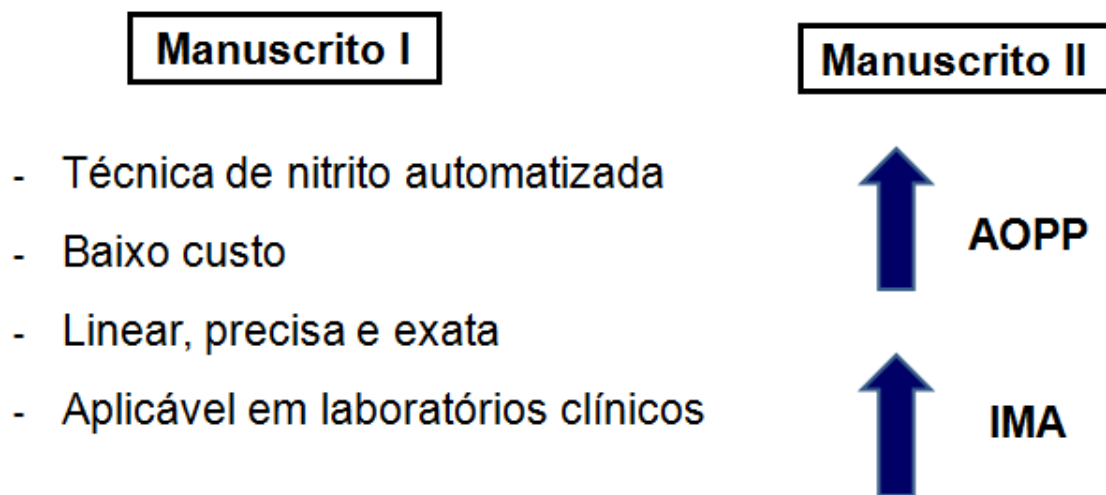


Figura 5: Principais contribuições deste estudo

6 CONCLUSÕES

- Foi desenvolvido e validado um método analítico automatizado para a mensuração dos níveis plasmáticos de nitrito, sendo este adaptado ao analisador Cobas Mira[®].
- Os níveis de CT, LDL-C, HDL-C, triglicérides, Apo-A e Apo-B foram superiores nos pacientes com hipercolesterolemia.
- Os níveis de IL-6 foram maiores nos pacientes hipercolesterolêmicos, o que reflete o processo inflamatório associado à hipercolesterolemia, enquanto os níveis de NO_x foram inferiores nestes pacientes em relação aos pacientes saudáveis, indicando uma menor biodisponibilidade do NO na hipercolesterolemia.
- Os níveis de D-dímero foram mais elevados nos pacientes com hipercolesterolemia, demonstrando que existe um aumento da fibrinólise nesta patologia.
- Os níveis de AOPP e IMA foram mais elevados nos pacientes hipercolesterolêmicos, e estes também apresentaram níveis menores de -SH, o que permite comprovar o aumento do estresse oxidativo na hipercolesterolemia.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, R.W. Inflammation and coronary artery disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 18, n. 331, p. 468-469, 1994.

ALEXANDER, R. W. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. **Hypertension**, v. 25, p. 155-161, 1995.

ANDERSON, T.J. Nitric oxide, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelial dysfunction. **Heart Failure Reviews**, v. 8, n. 1, p. 71-86, 2003.

APPLE, F. S. et al. Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 810-824, 2005.

ARMSTRONG, E.J.; MORROW, D.A.; SABATINE, M.S. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes: Part IV: Matrix metalloproteinases and biomarkers of platelet activation. **Circulation**, v. 113, n. 9, p. e383-e385, 2006.

ARNETT, D. et al. Twenty-year trends in serum cholesterol, hypercholesterolemia, and cholesterol medication use: the Minnesota Heart Survey, 1980-1982 to 2000-2002. **Circulation**, v. 112, p. 3884-3891, 2005.

ASL, A. Z.; GHASEMI, A.; AZIZI, F. Serum nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 1342-1347, 2008.

AYDIN, S. et al. Effects of atorvastatin therapy on protein oxidation and oxidative DNA damage in hypercholesterolemic rabbits. **Pharmacological Research**, v. 59, p. 242-247, 2009.

BAR-OR, D.; LAU, E.; WINKLER, J. V. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia: a preliminary report. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 19, n. 4, p. 311-315, 2000.

BAR-OR, D. et al. Reduced albumin-cobalt binding with transient myocardial ischemia after elective percutaneous transluminal coronary angioplasty: a preliminary comparison to creatine-kinase-MB, myoglobin, and troponin I. **American Heart Journal**, v. 141, n. 6, p. 985-991, 2001.

BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **The American Journal of Physiology**, v. 271, p. 424-437, 1996.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. Effect of vitamin C supplementation on plasma vitamin C and E levels. **Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 8, p. 207-210, 1999.

BERMUDEZ, E.A. et al. Interrelationships among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 22, p. 1668-1673, 2002.

BERTOLAMI, M.C. et al. Perfil lipídico de funcionários de indústria metalúrgica e sua relação com outros fatores de risco. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 60, p. 293-299, 1993.

BHATT, D.L. et al. International prevalence, recognition, and treatment of cardiovascular risk factors in outpatients with atherothrombosis. **Journal of the American Medical Association**, v. 295, p. 180-189, 2006.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCH, L.; MASSARO, D. **Oxygen, gene expression and cellular function**. Marcel Decker: New York, v. 105, p. 1-25, 1997.

BRYAN, N. S.; GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical & Biology Medicine**, v. 43, p. 645-657, 2007.

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; BRUNS, D.E. **Tietz Fundamentos de Química Clínica**, 6ª edição. Rio de Janeiro, ed: Elsevier, 2008.

CAMPAGNA, F. et al. Detection of familial hypercholesterolemia in a cohort of children with hypercholesterolemia: Results of a family and DNA-based screening. **Atherosclerosis**, v. 196, p. 356-364, 2008.

CHAN, B. et al. Site-specific N-terminal auto degradation of human serum albumin. **European Journal of Biochemistry**, v. 227, n. 1-2, p. 524-528, 1995.

CICHOTA, L. C. et al. Evaluation of ischemia-modified albumin in anemia associated to chronic kidney disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 22, n. 1, p. 1-5, 2008.

CHEQUER, G. et al. Espessamento médio-intimal da carótida e função endotelial na doença arterial coronariana. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 2, p. 84-90, 2006.

CORONELLI, C.L.; MOURA, E.C. Hipercolesterolemia em escolares e seus fatores de risco. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 1, p. 24-31, 2003.

DESCAMPS-LATSCHA, B. et al. Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 45, p. 39-47, 2005.

DHALLA, N.S., TEMSAH, R.M., NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **Journal of Hypertension**, v. 18, p. 655-673, 2000.

DRÜEKE, T. et al. Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease. **Circulation**, v. 106, p. 2212-2217, 2002.

DUARTE, M.M.F. et al. Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. **Clinical Biochemistry**, v. 42, p. 666-671, 2009.

DUARTE, M.M.F. et al. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. **Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 13-14, p. 1118-1123, 2010.

DUNCAN, B.B. et al. Níveis séricos de colesterol em amostra representativa da população adulta de Porto Alegre. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 51, p. 385-390, 1988.

DUSSE, L. M. et al. Does plasma nitrite determination by the Griess reaction reflect nitric oxide synthesis? **Clinica Chimica Acta**, v. 362, p. 195-197, 2005.

EMMANUEL, L. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 29, p. 1412-1418, 2009.

FALKENSAMMER, J. et al. Serum levels of ischemia-modified albumin in healthy volunteers after exercise-induced calf-muscle ischemia. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 45, n. 4, p. 535-540, 2007.

FIGUEIRA, J.L. et al. Perfil lipídico em indivíduos idosos normais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 48, p. 77-81, 1987.

FORRESTER, J.S., MAKKAR, R.; SHAH, P.K. Increasing high-density lipoprotein cholesterol in dyslipidemia by cholesteryl ester transfer protein inhibition. **Circulation**, v. 111, p. 1847-1854, 2005.

FUTTERMAN, L. G.; LEMBERG, L. Novel markers in the acute coronary syndrome: BNP, IL-6, PAPP-A. **American Journal of Critical Care**, v. 11, n. 2, p. 168-172, 2002.

GANZ, P.; VITA, J.A. Testing vasomotor function. Nitric oxide, a multipotent molecule. **Circulation**, v. 108, p. 2049-53, 2003.

GHANDEHARI, H.; KAMAL-BAHL, S.; WONG, N.D. Prevalence and extent of dyslipidemia and recommended lipid levels in US adults with and without cardiovascular comorbidities: the National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. **American Heart Journal**, v.156, n. 1, p.112-119, 2008.

GIDENNE, S. et al. Analytical performance of the Albumin Cobalt Binding (ACB) test on the Cobas MIRA Plus analyzer. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 42, n. 4, p. 455-461, 2004.

GIMBRONE JR.; M.A. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. **The American Journal of Cardiology**, v.75, p. 67-70, 1995.

GOTTLIEB, M.G.V. et al. Associations among metabolic syndrome, ischemia, inflammatory, oxidatives, and lipids biomarkers. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, p. 586-591, 2010.

GUEVARA, I. et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. **Clinica Chimica Acta**, v. 274, p. 177-188, 1998.

HACKAM, G.D.; ANAND, S.S. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. **JAMA**, v. 290, p. 932-940, 2003.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v. 355, p. 1179-1180, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3. ed. **NY: Oxford University Press**, p. 936, 1999.

HANSSON, G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **The New England Journal Medicine**, v. 352, p. 1685-1695, 2005.

HARRISON, D.G. Endothelial control of vasomotion and nitric oxide production: a potential target for risk factor management. **Cardiology Clinics**, v. 14, p. 1-15, 1996.

HARRISON, D.G. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, p. 2153-2157, 1997.

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

HOKANSON, J.E.; AUSTIN, M.A. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta analysis of population-based prospective studies. **Journal of Cardiovascular Risk**, v. 3, p. 213-219, 1996.

IEKA, U. et al. Interleukin 6 gene transcripts are expressed in atherosclerotic lesions of genetically hyperlipidemic rabbits. **Atherosclerosis**, v. 92, n. 2-3, p. 213-218, 1992.

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

KAEFER, M. et al. Association between ischemia modified albumin, inflammation and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. **Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 4-5, p. 450-454, 2010.

KAPLAN, A. et al. **Clinical Chemistry: interpretation and techniques**, 4^o edição, ed: Philadelphia: Williams & Wilkins, 1995.

KAYA, C. et al. Advanced oxidation protein products are increased in women with polycystic ovary syndrome: relationship with traditional and nontraditional cardiovascular risk factors in patients with polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 92, p. 1372-1377, 2009.

KEARON, C. et al. Management of suspected deep venous thrombosis in outpatients by using clinical assessment and D-dimer testing. **Annals of Internal Medicine**, v. 135, p. 108-111, 2001.

KELLY, C.J. et al. Altered vascular function in young women with polycystic ovary syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, p. 742-746, 2002.

KHARBANDA, R.K.; DEANFIELD, J.E. Functions of the healthy endothelium. **Coronary Artery Disease**, v. 6, p. 485-491, 2001.

KINLAY, S.; LIBBY, P.; GANZ, P. Endothelial function and coronary artery disease. **Current Opinion in Lipidology**, v.12, n, 4, p. 383-398, 2001.

KOENIG, W. et al. Plasma fibrin D-dimer levels and risk of stable coronary artery disease: results of a large case-control study. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.21, p.1701-1705, 2001.

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

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

LADEIA, A.M.; GUIMARÃES, A.C.; LIMA, J.C. Perfil lipídico e doença arterial coronariana. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 63, p. 101-106, 1994.

LAMARCHE, B. et al. Apolipoprotein A-I and B levels and the risk of ischemic heart disease during a five year follow-up of men in the Quebec Cardiovascular Study. **Circulation**, v. 94, p. 273-278, 1996.

LARSEN, T.L. On the importance of the use of proper approaches for comparison of analytical methods for serum nitrate and evaluation of reference concentrations. **Clinical Biochemistry**, v. 42, p. 1197-1199, 2009.

LEE, A.J. et al. Fibrin D-dimer, haemostatic factors and peripheral arterial disease. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 74, p. 828-832, 1995.

LESSA, I. et al. Prevalência de dislipidemias em adultos da demanda laboratorial de Salvador, Brasil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 69, p. 395-400, 1997.

LIBBY, P. Changing concepts of atherogenesis. **Journal of Internal Medicine**, v. 247, p. 349-358, 2000.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 868-874, 2002.

LIU, S.X. et al. Advanced oxidation protein products accelerate atherosclerosis through promoting oxidative stress and inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 26, p. 1156-1162, 2006.

LOWE, G.D. et al. Interleukin-6, fibrin D-dimer, and coagulation factors VII and XIIa in prediction of coronary heart disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 24, p. 1529-1534, 2004.

LÜSCHER, T.F.; SEO, B.;BÜHLER, F.R. Potential role of endothelin in hypertension. **Hypertension**, v.21, p. 752-757, 1993.

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

LUZ, P.L. et al. Incidência de dislipidemia e sua relação com doença arterial coronária em populações brasileiras. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 54, p. 257-264, 1990.

MACHLIN, L.J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB Journal**, v. 1, p. 441-445, 1987.

MALO-RANTA, U. et al. Nitric oxide donor GEA 3162 inhibits endothelial cell-mediated oxidation of low density lipoprotein. **FEBS Letters**, v. 337, n. 2, p. 179-183, 1994.

MARSCHE, G. et al. Plasma-advanced oxidation protein products are potent high-density lipoprotein receptor antagonists in vivo. **Circulation Research**, v. 104, n. 6, p. 750-757, 2009.

MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 577-586, 2005.

MAYNE, S. T. Antioxidants nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 933-940, 2003.

MAYR, M. et al. Proteomic and metabolomic analyses of atherosclerotic vessels from apolipoprotein E-deficient mice reveal alterations in inflammation, oxidative stress, and energy metabolism. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 25, p. 2135-2142, 2005.

MCDERMOTT, M.M. et al. D-dimer, inflammatory markers, and lower extremity functioning in patients with and without peripheral arterial disease. **Circulation**, v. 107, p. 3191-3198, 2003.

MENDONÇA, S.C.L.; JORGE, P.T. Prevalência de dislipidemias em uma população com mais de 50 anos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.41, p. 183-187, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Indicadores e dados básicos 2008 – Taxa de Mortalidade Específica por Doenças do Aparelho Circulatório em 2006**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?idb2008/c08.def>> Acesso em: 18 set. 2010.

MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide**, v. 5, p. 62-71, 2001.

MOORE, K.J., FREEMAN, M.W. Scavenger Receptors in Atherosclerosis: Beyond Lipid Uptake. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 26, p. 1702-1711, 2006.

MORESCO, R.N. et al. Lack of association between cardiac troponin T and D-Dimer in the evaluation of myocardial damage. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 19, p. 282-284, 2005.

MORROW, D. A. et al. The search for a biomarker of cardiac ischemia. **Clinical Chemistry**, v.49, n. 4, p. 537-539, 2003.

MOSHAGE, H. et al. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 6, p. 892-896, 1995.

MOURA, E.C. et al. Perfil lipídico em escolares de Campinas, SP, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 5, p. 499-505, 2000.

NAKASHIMA, Y. et al. Simvastatin increases plasma NO_2^- and NO_3^- levels in patients with hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v. 127, n. 1, p. 43-47, 1996.

NAPOLI, C. et al. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. **Nitric oxide**, v. 15, p. 265-279, 2006.

NELSON, D.L.; COX, M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**, 4ª edição, ed: Sarvier, 2006.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

O'CONNELL, B.J.; GENEST, J.Jr. High-density lipoproteins and endothelial function. **Circulation**, v.104, p. 1978-1983, 2001.

OEMAR, B. S. et al. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. **Circulation**, v. 97, p. 2494-2498, 1998.

ORDOVAS, J.M. Nutrigenetics, plasma lipids, and cardiovascular risk. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 106, p. 1074-1081, 2006.

OUBIÑA, M.P. et al. Synergistic effect of angiotensin-converting enzyme (ACE) and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibition on inflammatory markers in atherosclerotic rabbits. **Clinical Science** (London), v. 105, n. 6, p. 655-662, 2003.

PACCAUD, F. et al. Dyslipidemia and abdominal obesity: an assessment in three general population. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 53, n. 4, p. 393-400, 2000.

PANDEY, K.B.; MISHRA, N.; RIZVI, S.I. Protein oxidation biomarkers in plasma of type 2 diabetic patients. **Clinical Biochemistry**, v. 43, p. 508-511, 2010.

PANTAZOPOULOS, I. et al. Ischemia modified albumin in the diagnosis of acute coronary syndromes. **Resuscitation**, v. 80, p. 306-310, 2009.

PEARSON, T.A. et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: Application to clinical and public health practice a statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association. **Circulation**, v. 107, p. 499-511, 2003.

PIRINCCIOGLU, A.G. et al. Malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl (PCO) levels as biomarkers of oxidative stress in subjects with familial hypercholesterolemia. **Clinical Biochemistry**, v. 43, p. 1220-1224, 2010.

PIVA, S. J. et al. Ischemia-modified albumin as an oxidative stress biomarker in obesity. **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 345-347, 2011.

PIWOWAR, A.; KORDECKA, M.K.; WARWAS, M. AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 77, p. 188-192, 2007..

PLUMP, A.S. et al. ApoA-1 knockout mice: characterization of HDL metabolism in homozygotes and identification of a post-RNA mechanism of apoA-1 up-regulation in heterozygotes. **Journal of Lipid Research**, v. 38, p. 1033-1047, 1997.

PLUTZKY, J. Inflammatory pathways in atherosclerosis and acute coronary syndromes. **The American Journal of Cardiology**, v. 18, n. 88, p. 10K-15K, 2001.

POLK, J. D. et al. Clinical utility of the cobalt-albumin binding assay in the diagnosis of intestinal ischemia. **The Journal of Trauma**, v. 64, n. 1, p. 42-45, 2008.

PORRECA, E. et al. Association of factor VII levels with inflammatory parameters in hypercholesterolemic patients. **Atherosclerosis**, v. 165, p. 159-166, 2002.

QIN, C. et al. Elevated plasma membrane cholesterol content alters macrophage signaling and function. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 26, p. 372-378, 2006.

RADI, R et al. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Archives of Biochemistry and Biophys**, v. 288, p. 481-487, 1991.

RAINES, E.W.; DOWE, S.K.; ROSS, R. Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cell is due to PDGF-AA. **Science**, v. 243, n. 4889, p. 393-396, 1989.

RAJAVASHISTH, T.B. et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators. **Circulation**, v. 99, p. 3103-3109, 1999.

RAO. K.M. et al. Variability of plasma IL-6 and crosslinked fibrin dimers over time in community dwelling elderly subjects. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 102, p. 802-805, 1994.

RÉDON, J. et al. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. **Hypertension**, v. 41, p. 1096-1101, 2003.

REIS, R.S.; BENSENOR, I.J.; LOTUFO, P.A. Avaliação laboratorial do indivíduo hipertenso: validade das principais diretrizes em hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 73, p. 201-205, 1999.

RICART-JANÉ, D.; LLOBERA, M.; LÓPEZ-TEJERO, M. D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the griess method. **Nitric Oxide**, v. 6, n. 2, p. 178-185, 2002.

RIDKER, P. M. et al. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, p. 973-979, 1997.

RIDKER, P.M. et al. Non-HDL cholesterol, apolipoproteins A-I and B-100, standard lipid measures, lipid ratios and CRP as risk factors for cardiovascular disease in womem. **Journal of American Medical Association**, v. 294, n. 3, p. 326-333, 2005.

ROMITELLI, F. et al. Comparison of nitrate/nitrite concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GCMS: the importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 851, p. 257-267, 2007.

ROSENSON, R. S. Statin in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. **Atherosclerosis**, v. 173, p. 1-12, 2004.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. **Antioxidant defense systems and oxidative stress**. In Vigo-Pelfrey C (ed): Membrane lipid oxidation. 1th ed. Boca Raton, CRC Press, p. 151-170, 1991.

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

ROWE, C.A. et al. Rapid detection of D-dimer using a fiber optic biosensor. **Thrombosis and Haemostais**, v. 79, p. 94-98, 1998.

ROY, D. et al. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischaemia modified albumin. **Heart**, v. 92, p. 113-114, 2006.

ROY, D.; KASKI, J.C. Ischemia-modified albumin: the importance of oxidative stress. **Journal of American College of Cardiology**, v. 49, p. 2375-2376, 2007.

SAGASTAGOITIA, J.D. et al. Association between inflammation, lipid and hemostatic factors in patients with stable angina. **Thrombosis Research**, v. 120, p. 53-59, 2007.

SARMENTO, L.R.; GUS, M. Terapia trombolítica no infarto agudo do miocárdio. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, v. 4, p. 38-42, 1998.

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

SCARTEZINI, M. et al. Metabolismos dos lípidos e lipoproteínas in: MARTINEZ, T.L. (Org). **Manual de condutas clínicas em dislipidemias**. Rio de Janeiro: MedLine, 1º edição, 2003.

SELIK, M. et al. Estudo do perfil lipídico de crianças e jovens até 19 anos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 37, n. 4, p. 247-251, 2001.

SELMECI, L. et al. Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple, fast and inexpensive automated technique. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 43, p. 294-297, 2005.

SHACTER E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. **Drug Metabolism Reviews**, v. 32, p. 307-326, 2000.

SIEKMEIER, R.; GRAMMER, T.; MÄRZ, W. Roles of oxidants, nitric oxide, and asymmetric dimethylarginine in endothelial function. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 13, p. 279-297, 2008.

SINHA, M.K. et al. Role of “ischemia modified albumin”, a new biochemical marker of myocardial ischaemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. **Emergency Medicine Journal**, v. 2, p. 29-34, 2004.

SKVARILOVÁ, M. et al. Increased level of advanced oxidation products (AOPP) as a marker of oxidative stress in patients with acute coronary syndrome. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia**, v. 149, n. 1, p. 83-87, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e Prevenção da aterosclerose do departamento de aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88(I), p. 1-19, 2007.

SORCI-THOMAS, M.G. et al. Differential effects of dietary fat on the tissue-specific expression of the apolipoprotein A-I gene: relationship to plasma concentration of high density lipoproteins. **Journal of Lipid Research**, v. 30, p. 1397-1403, 1989.

SOUTO, J.T.D. et al. Avaliação do perfil lipídico em uma amostra selecionada da população do norte e noroeste fluminense. **NewsLab**, v. 8, p. 96-106, 2000.

SOUZA, L.J. et al. Prevalência de dislipidemia e fatores de risco em Campos dos Goytacazes-RJ. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 81, n. 3, p. 249-256, 2003.

SPRONK, H.M.H.; VAN DER VOORT, D., CATE, H.T. Blood coagulation and the risk of atherothrombosis: a complex relationship. **Thrombosis Journal**, v. 2, n. 1, p. 2-12, 2004.

STEINBERG, D. et al. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **New England Journal of Medicine**, v. 320, p. 915-924, 1989.

STOCKER, R.; KEANEY, J.F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiological Reviews**, v.84, n.4, p.1381-1478, 2004.

TAHA, Z.H. Nitric oxide measurements in biological samples. **Talanta**, v. 61, p. 3-10, 2003.

Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) et al. **Circulation**, v.106, p. 3143-3421, 2002.

THOMPSON, S.G. et al. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris, European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Group. **The New England Journal Medicine**, v. 332, p. 635-641, 1995.

UELAND, P.M. et al. Reduced, oxidized and protein-bound forms of homocysteine and other amino thiols in plasma comprise the redox thiol status – a possible element of the extracellular antioxidant defense system. **The Journal of Nutrition**, v. 126, p. 1281S-1284S, 1996.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

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

VILLACORTA, H.; MASETTO, A.C.; MESQUITA, E.T. Proteína C-Reativa: Marcador inflamatório com valor prognóstico em pacientes com insuficiência cardíaca descompensada. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, p. 585-589, 2007.

WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney International**, v. 49, p. 1304-1313, 1996.

WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. **Journal of Immunology**, v. 161, n. 5, p. 2524-2532, 1998.

WITKO-SARSAT, V. et al. AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients. **Kidney International**, v. 64, p. 82-91, 2003.

WHO. **The World Health Report 2002**. Geneva: World Health Organization, 2002. .

World Health Organization (WHO). **Cardiovascular diseases (CVDs)**. Fact sheet n°317, september 2009. <http://www.who.int/entity/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>. Acessado em 24 de novembro de 2010.

YAMADA, Y. et al. Prediction of genetic risk for dyslipidemia. **Genomics**, v. 90, n. 5, p. 551-558, 2007.

YAMAGUCHI, Y. et al. Elevated circulating levels of markers of oxidative-nitrative stress and inflammation in a genetic rat model of metabolic syndrome. **Nitric oxide**, v. 15, p. 380-386, 2006.

YANG, Y.; LOSCALZO, J. Regulation of tissue factor expression in human microvascular endothelial cells by nitric oxide. **Circulation**, v. 101, p. 2144-2148, 2000.

YESHURUN, D.; GOTTO, A.M. Hyperlipidemia: perspectives in diagnosis and treatment. **Southern Medical Journal**, v. 88, p. 379-391, 1995.

ZHAO, Z. et al. Low-Density lipoprotein from apolipoprotein E-deficient mice induces macrophage lipid accumulation in a CD36 and scavenger receptor class A-dependent manner. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 25, p. 168-173, 2005.

ANEXO A – Carta de Aprovação do Comitê de Ética-UFSM