

**GABRIELA CRISTINA TONINI**

**EFEITOS DA IMUNIZAÇÃO COM  
LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE  
OXIDADA NA ATEROSCLEROSE  
EXPERIMENTAL MURINA E NO MODELO  
DE DOENÇA RENAL CRÔNICA**

Trabalho apresentado Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

---

---

**GABRIELA CRISTINA TONINI**

**EFEITOS DA IMUNIZAÇÃO COM  
LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE  
OXIDADA NA ATEROSCLEROSE  
EXPERIMENTAL MURINA E NO MODELO  
DE DOENÇA RENAL CRÔNICA**

Trabalho apresentado Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Magnus Ake Gidlund

São Paulo  
2010

---

---

---

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Tonini, Gabriela Cristina.

Efeitos da imunização com lipoproteína de baixa densidade oxidada na aterosclerose experimental murina e no modelo de doença renal crônica / Gabriela Cristina Tonini. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Magnus Ake Gidlund.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Aterosclerose.

Versão do título para o inglês: Effect of immunization with oxidized low-density lipoprotein in experimental atherosclerosis model and chronic kidney disease model.

Descritores: 1. Imunização 2. Arteriosclerose 3. Nefropatias 4. Lipoproteínas LDL  
5. Peptídeos I. Gidlund, Magnus Ake II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0102/2010

---

---

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a):                      Gabriela Cristina Tonini.

Título da Tese:                      Efeitos da imunização com lipoproteína de baixa densidade oxidada na aterosclerose experimental murina e no modelo de doença renal crônica .

Orientador(a):                      Magnus Ake Gidlund.

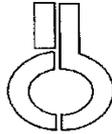
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**                       **Reprovado(a)**

Examinador(a):      Assinatura: .....  
                                 Nome: .....  
                                 Instituição: .....

Presidente:              Assinatura: .....  
                                 Nome: .....  
                                 Instituição: .....

---



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05608-000 São Paulo, SP – Brasil  
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438  
e-mail: cep@icb.usp.br

---

## **CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **028** nas fls. **30** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Gabriela Cristina Tonini, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Influência da imunização de camundongos knockout com oxldl e peptídeos sintéticos da apoB no desenvolvimento da aterosclerose**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Douglas Gomes Sevilha Castro e o pesquisador Magnus Ake Gidlund** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **15.03.2006**.

São Paulo, 15 de março de 2006.

Prof. Dra. Marília C.L. Seelaender  
Coordenadora -CEEA - ICB/USP

Prof. Dra. Patrícia Castelucci  
Secretária Suplente CEEA - ICB/USP

---

---

---

À minha mãe por todo seu amor e  
dedicação. Sem você seria impossível  
ter chegado até aqui!

Às minhas irmãs, pelos inúmeros  
momentos que tiveram que ter paciência  
ao longo de tantos anos de estudo.

Para Rafa, Gugu e Mama, que vocês  
possam acreditar na cura desta doença.

---

---

---

---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à minha mãe por todo o seu amor, por ter dedicado a sua vida a suas filhas e por ser o meu “porto seguro”.

A minha irmã Paula pelo apoio e incentivo, mesmo que silenciosos.

À minha irmã Monique e ao meu cunhado Marcos que me deram os meus três maiores tesouros.

Aos meus três maiores tesouros, Rafa, Gugu e Mama pelos risos, que me alegram mesmo que estejam só na lembrança.

Ao Magnus Ake Gidlund que me acolheu quando eu era apenas uma estudante de graduação e me adotou como uma filha no laboratório.

Ao meu eterno chefinho Daniel F. J. Ketelhuth que me ajudou e me guiou nos primeiros passos dentro do Mundo da Ateroscleorse e da Imunologia.

Àqueles que pertencem ou já pertenceram ao laboratório de Imunofisopatologia: Maristella, Andrea, Francisco, Eduardo, Flávia, Tânia, Kátia, Gabriela Borracha... pelo convívio e colaborações, não só as intelectuais.

À Silvana Aparecida da Silva, por todo seu apoio e dedicação, nãa medindo esforços para ajudar, no que fosse preciso, para que todos os experimentos fossem realizados da melhor maneira.

A Alda e Célia pela companhia e colaborações.

Ao prof. Niels Olsen Saraiva Câmara que disponibilizou seu laboratório e seus alunos para a realização dos experimentos de isquemia renal. Aos alunos do prof. Niels, Vanessa, Tarcio e Reinaldo pela colaboração nesses experimentos.

Aos professores José Alexandre Barbuto, Sonia Jancar Negro, Vera Lucia Garcia Calich, Momtchilo Russo e Lourdes Isaac, que sempre deixaram seus laboratórios a minha disposição.

Aos colegas de departamento, Rafael Assumpção Larocca e José Antonio Tavares de Albuquerque pela ajuda na coleta de sangue dos doadores.

---

---

---

---

À profa. Helena Coutinho Franco de Oliveira, que forneceu os animais apoE<sup>-/-</sup> e permitiu que a avaliação das lesões ateroscleróticas fossem realizadas em seu laboratório.

Ao Gabriel de Gabriel e Dorighello que realizou os experimentos de avaliação das lesões ateroscleróticas.

Aos funcionários do biotério, principalmente Dourival Ferreira Mascarenhas, Sílvia Maria Gomes Massironi, Rosália Regina De Luca pela dedicação e cuidado aos animais.

Às amigas Cláudia Akemi Kodaira Góes e Ana Valéria Santos de Lourenço pela oportunidade de trabalharmos juntas.

Aos meus amigos Carlos, Suzana e Carina por entenderem a minha dedicação a minha tese e a minha falta de dedicação as nossas amizades.

Ao Zé Henrique, por seu apoio, companheirismo, amizade e carinho nos últimos meses.

Ao Elia Ascer pela ajuda nos momentos finais desse trabalho.

Ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

E, agradeço, principalmente, a Deus por ter me dado minha vida e todas as oportunidades e dificuldades que nela aparecem.

---

---

---

Could I have survived myself, by myself? I don't know. That's the thing about a human about a human life - there's no control group, no way to ever know how any of us would have turned out if any variables had been changed.

***Elizabeth Gilbert, in Eat, Pray, Love***

*Será que teria sobrevivido a mim mesma sozinha? Não sei. É essa a característica da vida – não há grupo placebo, não há nenhuma maneira de saber como qualquer um de nós teria se comportado caso qualquer uma das variáveis houvesse mudado.*

---

---

Não estrague o seu dia.  
A sua irritação não solucionará problema algum...  
As suas contrariedades não alteram a natureza das coisas...  
Os seus desapontamentos não fazem o trabalho  
que só o tempo conseguirá realizar...  
O seu mau humor não modifica a vida...  
A sua dor não impedirá que o sol brilhe amanhã  
sobre os bons e os maus...  
A sua tristeza não iluminará os caminhos...  
O seu desânimo não edificará a ninguém...  
As suas lágrimas não substituem o suor que  
você deve verter em benefício da sua própria felicidade...  
As suas reclamações, ainda mesmo afetivas, jamais  
acrescentarão nos outros um só grama de simpatia por você...  
Não estrague o seu dia...  
Aprenda, com a Sabedoria Divina,  
a desculpar infinitamente,  
construindo e reconstruindo sempre para o Infinito Bem.

**André Luiz por Chico Xavier**

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,  
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim"

**Chico Xavier**

---

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abs – Absorbância

AG – ácidos graxos

AR – absorbância relativa

apoB – apolipoproteína B

apoE – apolipoproteína E

apoE<sup>-/-</sup> – animais *knockout* para a apolipoproteína E

C – colesterol

CE – colesterol esterificado

CL – colesterol livre

CT – colesterol total

CuSO<sub>4</sub> – sulfato de cobre

DMSO – dimetil sulfóxido

DTH – *delayed-type hypersensitivity* (hipersensibilidade tardia)

EDTA – ácido etilendiamino tetracético

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio imunoenzimático)

FIA – Adjuvante de Freund incompleto

HDL – *high density lipoprotein* (lipoproteína de alta densidade)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – ácido sulfúrico

HSP – *heat shock protein* (proteína do choque séptico)

IDL – *intermediate density lipoprotein* (lipoproteína de densidade intermediária)

I/R – isquemia e reperfusão renal

IgG – imunoglobulina G

---

---

---

IgG<sub>1</sub> – imunoglobulina G subclasse 1

IgG<sub>2a</sub> – imunoglobulina G subclasse 2a

IgM – imunoglobulina M

i.p.- intraperitoneal

KBr – brometo de potássio

LDL – *low density lipoprotein* (lipoproteína de baixa densidade)

LP – lipoproteína

LDLr<sup>-/-</sup> – animais *knock-out* para o receptor de LDL

MDA – malondialdeído

mLDL – lipoproteína de baixa densidade modificada

OMS / WHO – Organização Mundial de Saúde / World Health Organization

oxLDL – lipoproteína de baixa densidade oxidada

PAF - fator ativador de plaqueta

PBS – *phosphate buffer saline* (solução salina de fosfatos tamponada)

pepD – peptídeo sintético derivado da apoB

PL – fosfolípidos

PR – protein

SHAM – animal submetido a procedimento cirúrgico sem a realização de I/R

TG – triacilgliceróis

VLDL – *very low density lipoprotein* (lipoproteína de baixíssima densidade)

---

---

---

## RESUMO

TONINI, G. C. **Efeitos da Imunização com Lipoproteína de Baixa Densidade Oxidada na Aterosclerose Experimental Murina e no Modelo de Doença Renal Crônica.** 2010. 105 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A aterosclerose, principal causa de doença cardiovascular, é uma afecção inflamatória crônica e progressiva. Sabe-se os anticorpos contra LDL oxidada (oxLDL) estão envolvidos no desenvolvimento da lesão aterosclerótica. Neste trabalho induzimos a produção desses anticorpos através da imunização de camundongos apoE<sup>-/-</sup> (*knock-out* para a apolipoproteína E) e C57Bl/6 com oxLDL. A fim de se avaliar o impacto dessa imunização avaliamos os perfis lipídico e de anticorpos anti-oxLDL e anti-pepD, sendo que o pepD é um peptídeo derivado da apolipoproteína B. Animais apoE<sup>-/-</sup> possuem maiores níveis de lípidos sorológicos que animais C57Bl/6, exceto de HDL. A imunização com oxLDL não altera o perfil lipídico desses animais. Todavia, os anticorpos anti-oxLDL das classes IgM e IgG e da subclasse de IgG<sub>1</sub> evidenciaram aumento, após a imunização com oxLDL. Anticorpos IgM anti-pepD aumentaram com a imunização em animais C57Bl/6 e não nos apoE<sup>-/-</sup>. Acreditamos que isso ocorra porque nos animais C57Bl/6 deva ocorrer uma resposta primária contra a oxLDL enquanto os apoE<sup>-/-</sup> já deviam ter sido estimulados por auto-antígenos. O adjuvante usado na imunização estimula a resposta Th2, e por isso ocorreu aumento de anticorpos IgG<sub>1</sub>, que por si pode apresentar um efeito ateroprotetor. A aterosclerose pode ocorrer com maior frequência, em indivíduos portadores de doenças renais crônicas. Para estudar essa interferência submetemos os animais a um modelo de isquemia e reperfusão renal (I/R). A I/R promoveu aumento da concentração de TG. O aumento de anticorpos IgG anti-oxLDL promovidos pela I/R sugere que o este procedimento desencadei um processo inflamatório que causa aumento a oxidação de LDL. Desta forma, concluímos que a I/R pode ser considerado um procedimento pró-aterosclerótico. A imunização com oxLDL não foi capaz de reverter os efeitos pro-aterogênicos causados pela I/R.

---

---

---

**Palavras-chave:** Imunização. Aterosclerose. Lipoproteína LDL. Nefropatias. Peptídeo.

## ABSTRACT

TONINI, G. C. **Effect of Immunization With Oxidized Low Density Lipoprotein in Experimental Atherosclerosis Model and Chronic Kidney Disease Model.** 2010. 105 p. Ph. D. Thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Atherosclerosis, the main cause of cardiovascular disease, is a chronic and progressive inflammatory condition. It is known that the oxidized LDL (oxLDL) antibodies are involved in the development of the atherosclerotic lesion. In the present work we induced the formation of such antibodies through apoE<sup>-/-</sup> immunization with oxLDL (knock-out mice for apolipoprotein E). In order to evaluate the impact of this immunization we evaluate the lipids and antibody (anti-oxLDL and anti-pepD – pep D is a peptide derived from apolipoprotein B) profile. The apoE<sup>-/-</sup> animals used have higher seric levels of most lipids than C57Bl/6 animals, the exception being HDL. Despite male apoE<sup>-/-</sup> mice having higher seric concentration of triacylglycerols, total cholesterol and LDL, literature points out that they have smaller atherosclerotic lesions. The oxLDL immunization does not change apoE<sup>-/-</sup> animals lipid profile. However, there was evidence of increased anti-oxLDL antibodies of the IgM, IgG classes and IgG<sub>1</sub> sub-class after the oxLDL immunization. On its turn, anti-pepD IgM antibodies increased with immunization in C57Bl/6 animals only, and not in apoE<sup>-/-</sup>. We believe this happened not as a primary immune response against oxLDL in the apoE<sup>-/-</sup>, but rather from the atheroprotector effect caused by the increased IgG<sub>1</sub> subclass antibodies due to the Th2 answer stimulated by the adjuvant used in the immunization. Atherosclerosis has a higher incidence in individuals with chronic renal conditions. In order to study such interference, we submitted the animals to a renal ischemia and reperfusion model (I/R). The I/R procedure increased TG concentration, what can make atherosclerosis more severe. The increase in IgG anti-oxLDL antibody caused by I/R suggests that the inflammation process set by the procedure increases LDL oxidation. This way, we conclude that the I/R can be considered a pro-atherosclerotic procedure. The oxLDL immunization was not able to revert the atherogenic effect caused by I/R model.

**Key words:** Immunization. Atherosclerosis. LDL lipoprotein. Nephropathies. Peptide.

---

---

---

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 ATEROSCLEORSE .....	17
<b>1.1.1 Lipídios e Lipoproteínas</b> .....	19
<b>1.1.2 Lipoproteína de Baixa densidade (LDL) e Lipoproteína de Baixa densidade Oxidada (oxLDL)</b> .....	21
<b>1.1.3 Aterogênese</b> .....	23
<b>1.1.4 Modelos Animais Usados no Estudo da Aterosclerose</b> .....	26
1.1.4.1 <i>Apolipoproteína E</i> .....	27
<b>1.1.5 Anticorpos e Aterosclerose</b> .....	27
1.1.5.1 <i>Anticorpos Naturais</i> .....	28
<b>1.1.6 Imunização e Aterosclerose</b> .....	29
1.1.6.1 <i>Adjuvantes na imunização contra Aterosclerose</i> .....	29
<b>1.1.7 Aterosclerose e Doença Renal</b> .....	30
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	32
2.1 OBJETIVO GERAL .....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	34
3.1 ANIMAIS .....	35
3.2 GRUPOS .....	35
3.3 IMUNIZAÇÕES .....	38
<b>3.3.1 Primeira Imunização</b> .....	38
<b>3.3.2 Reforços</b> .....	38
3.4 ANTÍGENO UTILIZADO NA IMUNIZAÇÃO E EM IMUNOENSAIOS: oxLDL ....	39
3.5 PROTOCOLO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO RENAL .....	39
3.6 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E COLETA DE SANGUE .....	40
3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	40
<b>3.7.1 Triacilgliceróis (TG)</b> .....	40
<b>3.7.2 Colesterol Total (CT)</b> .....	41
<b>3.7.3 HDL</b> .....	42

---

---

---

<b>3.7.4 LDL e VLDL</b> .....	42
<b>3.8 DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA oxLDL</b> .....	42
<b>3.9 DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA pepD</b> .....	43
<b>3.10 AVALIAÇÃO DA LESÃO ATEROSCLERÓTICA</b> .....	44
<b>3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	45
<b>4 RESULTADOS</b> .....	46
<b>4.1 INFLUÊNCIA DO ADJUVANTE DE FREUND INCOMPLETO E DA oxLDL EM ANIMAIS C57Bl/6 E apoE<sup>-/-</sup></b> .....	47
<b>4.1.1 Perfil Lipídico</b> .....	47
<b>4.1.2 Perfil de Anticorpos anti-oxLDL</b> .....	53
<b>4.1.3 Perfil de anticorpos anti-pepD</b> .....	58
<b>4.1.4 Lesão aterosclerótica</b> .....	63
<b>4.2 INFLUÊNCIA DA ISQUEMIA E REPERFUSÃO RENAL UNILATERAL (I/R) EM ANIMAIS C57Bl/6 E EM ANIMAIS apoE<sup>-/-</sup> IMUNIZADOS OU NÃO COM oxLDL</b> .....	66
<b>4.2.1 Perfil Lipídico</b> .....	67
<b>4.2.2 Perfil de Anticorpos anti-oxLDL</b> .....	74
<b>4.2.3 Perfil de anticorpos anti-pepD</b> .....	79
<b>4.2.4 Lesão aterosclerótica</b> .....	84
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	86
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	91
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	93

---

---

# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1.1 ATEROSCLEROSE

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) as doenças cardiovasculares são as principais causas de morte no mundo. Aproximadamente 17,1 milhões de pessoas morreram devido doenças cardiovasculares em 2004, representando 29% de todas as mortes globais. Ao longo dos últimos anos a mortalidade por causas cardiovasculares em países desenvolvidos tem diminuído, ao passo que em países em desenvolvimento houve rápida elevação (BARRETO et al., 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). De acordo com as projeções da OMS, esta tendência tende a persistir, agravando ainda mais o quadro de morbi-mortalidade nos países em desenvolvimento. No Brasil, aproximadamente 27% dos óbitos são de causa cardiovascular perfazendo um coeficiente de mortalidade seis a sete vezes superiores aos observados para as doenças infecciosas e parasitárias nos grandes centros urbanos. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Estima-se que em 2030, 23,6 milhões de pessoas morrerão de doenças cardiovasculares no mundo (WHO, 2010).

O ônus econômico dessas doenças tem crescido exponencialmente nas últimas décadas. Dados previdenciários indicam que no Brasil ocorre aproximadamente um milhão de internações por doenças cardiocirculatórias por ano, com profundas repercussões na força de trabalho e com conseqüente custo social. Em 2000, as doenças cardiovasculares foram responsáveis pela principal alocação de recursos públicos em hospitalizações no Brasil, sendo a terceira causa de permanência hospitalar prolongada. No período de 1991 a 2000, os custos hospitalares atribuídos às doenças cardiovasculares tiveram uma alta de 176% (SANTOS, 2001).

A OMS (WHO, 2006) relaciona mais de 300 fatores de risco associados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, entre os quais destacam-se: gênero (incidência aumentada em homens); idade (homens acima de 45 anos e mulheres

---

---

pós-menopausa); história familiar de evento aterosclerótico prematuro<sup>1</sup> (cardiopatia coronariana, acidente vascular cerebral, doença arterial periférica) em familiares de primeiro grau; dislipidemias, principalmente nos casos em que há altas concentrações plasmáticas de colesterol total (CT) e de lipoproteína de baixa densidade (*low density lipoprotein* – LDL) e baixas concentrações de lipoproteína de alta densidade (*high density lipoprotein* – HDL); tabagismo; hipertensão arterial ( $\geq 140 \times 90$  mmHg ou pacientes sob tratamento anti-hipertensivo); diabetes melito; sedentarismo; e, obesidade (índice de massa corpórea acima de 30) (HACKAM; ANAND, 2003; FRUCHART et al., 2004). Naghavi et al. (2003) afirmaram que a presença concomitante dos diversos fatores de risco acelera drasticamente a aterogênese.

A aterosclerose é a doença base das principais complicações cardiovasculares que afetam o homem na atualidade, tais como: infarto agudo do miocárdio, angina instável, acidentes vasculares cerebrais, vasculopatias periféricas e aneurismas, entre outras. Apesar de a aterosclerose ter início nos primeiros anos de vida suas complicações aparecem acentuadamente após a terceira década, devido a sua lenta evolução. As diversas manifestações clínicas ocorrem, na maioria dos casos, após a ruptura de placas ateroscleróticas (WITZUM; STEINBERG, 1991).

Um grande número de estudos epidemiológicos e de metabolismo tem estabelecido a relação entre altas concentrações séricas de CT e o aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, apontando as dislipidemias, principalmente a hiperlipidemia, como fatores de risco mais importantes. (ASCER et al., 2004). Entretanto, sabe-se que indivíduos com concentrações sorológicas de colesterol consideradas normais (CT <200mg/mL, LDL <130mg/mL, HDL >40mg/mL e triacilgliceróis <150mg/mL) podem desenvolver aterosclerose além de outras doenças cardiovasculares graves (RIDKER et al., 2008). Desta maneira, o foco de muitos grupos de pesquisa foi alterado para as lipoproteínas (LP) modificadas, principalmente para a LDL oxidada (oxLDL) (CHAPPEY et al., 1995) e para a resposta imune envolvida no processo aterosclerótico (FROSTEGARD et al., 1992). Anderson et al. (1987) demonstraram que indivíduos com altos níveis plasmáticos de LDL total e, particularmente, da forma oxidada (oxLDL) desenvolvem mais doenças coronarianas, sendo esta

---

<sup>1</sup> Considera-se prematuro o evento ocorrido em homens antes dos 55 anos e em mulheres antes dos 65 anos de idade

---

---

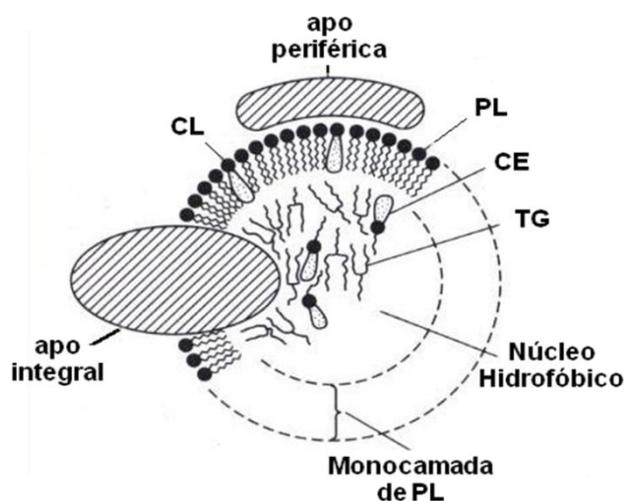
situação potencializada quando há redução das concentrações plasmáticas de HDL (JOHNSON et al., 1991). Em estudos sobre a resposta imune contra oxLDL, alguns pesquisadores mostram que anticorpos anti-oxLDL estão correlacionados com a modulação do processo aterosclerótico e com o risco de desenvolvimento de patologias secundárias a aterosclerose, onde pode ser evidenciada a presença de efeitos tanto pró-aterogênicos, quanto anti-aterogênicos.

### **1.1.1 Lipídios e Lipoproteínas**

Os lipídios são elementos químicos fundamentais para formação de todas as células, secreção de vitaminas, bile, hormônios esteróides e para produção e armazenamento de energia. Fisiologicamente, os principais são: os ácidos graxos (AG), triacilgliceróis (TG), fosfolípides (PL) e o colesterol (C). A principal característica dessas biomoléculas quimicamente heterogêneas é a insolubilidade em água. A solubilização dos lipídeos no meio aquoso depende de um arranjo molecular, denominado de lipoproteína (LP) (Figura 1), no qual os TG e C esterificado (CE) são envolvidos por PL e C livre (CL), e, também, da interação entre esses componentes com proteínas específicas, chamadas de apolipoproteínas (apo) (HOEG; BREWER, 1986). As apo não possuem função apenas estrutural. Elas contribuem para a regulação do metabolismo das LP: modulando a atividade de enzimas, direcionando as LP aos locais de catabolismo e interagindo com receptores celulares específicos e de alta afinidade (DONMA; DONMA, 1989). As principais apo são apoA (A-I, A-II e A-IV), apoB (B-48 e B-100), apoC (C-I, C-II e C-III), apoD e apoE (FRANCESCHINI, 1996).

Apesar de apresentarem a mesma estrutura básica (Figura 1), as LP diferem quanto à composição, tamanho, mobilidade eletroforética e densidade. Como foram originalmente analisadas através da ultracentrifugação, sendo separadas em várias frações segundo, diferentes padrões de densidade, passaram a ser designadas em função desta característica. A Tabela 1 mostra algumas características das lipoproteínas plasmáticas, como densidade, tamanho, concentrações de CE, CL, TG, PL, TG e proteína (PR), bem como as principais apo (SANTOS, 2001).

---



**Figura 1 – Esquema da estrutura básica das lipoproteínas.** Núcleo hidrofóbico constituído por TG e CE, além de vitaminas lipossolúveis, circundado por componentes anfífilos, PL, CL e um conjunto de proteína (apo). CE= colesterol Esterificado, CL= Colesterol Livre, TG= Triacilgliceróis, FL= fosfolípides, PR= proteínas

**Tabela 1 – Características das lipoproteínas plasmáticas**

Lipoproteína	Densidade (g/dL)	Diâmetro (Å)	Composição (%)					Apolipoproteína
			CE	CL	TG	PL	PR	
Quilomícron	>0,95	800-5000	5	2	84	7	2	B-48, E, C, A-I, A-II, A-IV
VLDL	>1,006	300-800	12	7	55	18	8	B-100, E, C
IDL	1,006 -1,019	250-350	23	8	32	21	16	B-100, E, C
LDL	1,019 -1,063	180-280	38	10	9	22	21	B-100
HDL-2	1,063 -1,125	90-120	16	6	4	30	44	A-I, A-II
HDL-3	1,125 -1,210	50-90	12	3	4	26	55	A-I, A-II

FONTE: SANTOS, 2001

NOTA: Abreviaturas: CE= colesterol Esterificado, CL= Colesterol Livre, TG= Triacilgliceróis, FL= fosfolípides, PR= proteínas, VLDL= lipoproteína de densidade muito baixa, IDL= lipoproteína de densidade intermediária, LDL= lipoproteína de baixa densidade e HDL= lipoproteína de alta densidade.

---

### 1.1.2 Lipoproteína de Baixa densidade (LDL) e Lipoproteína de Baixa densidade Oxidada (oxLDL)

A LDL é indispensável ao fornecimento do colesterol usado no processo ativo de divisão celular, na síntese de membranas e na síntese de hormônios e sais biliares. (BROWN; KOVANEN; GOLDSTEIN, 1981; BROWN; GOLDSTEIN, 1986). Sua captação é mediada pela interação dos resíduos de lisina da apoB com os receptores específicos para LDL (receptores B-E). Ao entrar na célula o colesterol exerce uma ação bloqueadora da produção desses receptores B-E (BROWN; GOLDSTEIN, 1986).

Em condições normais, a camada endotelial das artérias representa uma barreira para a livre difusão de macromoléculas, contudo aproximadamente 15% da LDL que circula no plasma atravessa o endotélio e penetra na camada íntima (FRY et al., 1986; VESSBY et al., 1987). Naturalmente, a entrada dessa lipoproteína na parede vascular é diretamente proporcional à sua concentração plasmática. Em condições fisiológicas, a concentração de LDL na camada íntima é vinte vezes maior que no fluido intersticial, sendo essa considerada hipercolesterolêmica em relação ao fluido intersticial de outros tecidos. Essa diferença, provavelmente, decorre da falta de linfáticos na íntima e da presença de uma densa matriz extracelular de carga negativa, que aprisiona certa proporção de LDL (PENTIKAINEN et al., 2000).

Contudo, há mecanismos fisiológicos que tendem a diminuir a concentração de LDL na íntima, como a atividade de células musculares, de monócitos e a capacidade de remoção HDL, que executam o chamado “transporte reverso do colesterol”.

A maior concentração de LDL na íntima arterial pode decorrer de: concentrações plasmáticas elevadas da LDL; alterações na funcionalidade endotelial, por ação de diferentes formas de injúria; dificuldades funcionais dos monócitos e das células musculares lisas; transporte reverso de colesterol insuficiente, por baixa concentração da fração HDL

Na região subendotelial da íntima a LDL pode ser modificada por enzimas, como mieloperoxidase, xantina oxidase, NADPH-oxidase e fosfolipases (KLOUCHE et al., 1998; KLOUCHE et al., 2000; LUSIS, 2000), por metilação, por glicação, por agregação (KHOO et al., 1988) e/ou por oxidação (GIDLUND et al., 1996; FERNEVIK et al., 2004). Assim, novos antígenos são gerados (STEINBERG et al., 1989)

---

---

induzindo diferentes respostas imunes. A modificação de LDL em oxLDL, *in vivo*, comumente deve-se a espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), produzidas por células ativadas (linfócitos, monócitos/macrófagos, células endoteliais e musculares lisas) (ESTERBAUER; WÄG; PUHL, 1993; CARR; MCCALL; FREI, 2000; CHEN; THOMAS; KEANEY, 2003). Estas espécies desencadeiam uma seqüência de reações na partícula onde, inicialmente, ocorre a peroxidação de seus ácidos graxos poliinsaturados liberados dos PF, dando origem à LDL minimamente oxidada. No decorrer do processo, os ácidos graxos se decompõem gerando cetonas e aldeídos reativos, os quais, interagindo com grupos lisina e histidina da apoB, alteram a carga elétrica, a densidade e as propriedades eletroforéticas da partícula de LDL (KEANEY, 2000). Ao longo deste processo, a apoB sofre degradação gradual, gerando fragmentos polipeptídicos. (ESTERBAUER et al., 1992). Além disso, a modificação de estrutura molecular impede seu reconhecimento pelo receptor B-E, porém permite que passe a ser reconhecida por receptores *scavenger* presentes nos macrófagos, cuja expressão não é auto-regulável pela concentração de colesterol intracelular. Por essa razão, há entrada ininterrupta de LDL para o interior dos macrófagos, resultando em células com gordura em demasia, chamadas de células espumosas (ou *foam cell*) (ENDEMANN et al., 1993).

A oxLDL é um potente agente pro-inflamatório: atua estimulando a camada de células endoteliais a produzir moléculas de adesão celular como VCAM-1 (molécula-1 de adesão da célula vascular), ICAM-1 (molécula-1 de adesão intercelular), fatores de crescimento, tal como M-CSF (fator estimulador de colônia de macrófago) e proteínas quimiotáticas, como MCP-1 (proteína-1 quimiotática para monócitos), resultando na adesão e no recrutamento de monócitos e linfócitos circulantes para dentro da parede arterial (LUSIS, 2000), além de aumentar a permeabilidade vascular (SVENSJÖ et al., 2003). Na íntima os monócitos sofrem modificações fenotípicas que os transformam em macrófagos, e por ação quimiotática da oxLDL, são impedidos de retornarem ao sangue circulante (FROSTEGÅRD et al., 1996; STEINBERG, 1997; QUINN et al., 1987; KIM et al., 1994).

---

---

### 1.1.3 Aterogênese

A aterosclerose pode ser definida como um processo inflamatório crônico e degenerativo que acomete as grandes e médias artérias, sendo caracterizada pelo acúmulo de lipídeos, células inflamatórias e elementos fibrosos no espaço subendotelial da íntima (VANDERLAAN; REARDON; GETZ, 2004; LUSIS, 2000).

Na literatura não há um consenso a respeito do fenômeno inicial da aterogênese: se, primeiramente, o endotélio sofre uma injúria ou se a LDL atravessa a parede do vaso antes da injúria endotelial. Contudo, já se sabe que: a LDL pode atravessar a parede do vaso por difusão simples (WILLIAMS; TABAS, 1995); a LDL modificada (mLDL) pode lesionar o endotélio, e que o endotélio lesionado permite um maior influxo de LDL (ROSS; GLOMSET, 1973, BACHEM et al., 1999). Como descrito anteriormente, no espaço subendotelial a LDL é modificada pelo processo de oxidação.

A LDL minimamente modificada, ou seja, quando apenas a fração lipídica está oxidada, induz maior adesão de monócitos, mas não de neutrófilos, às células endoteliais (BERLINER, et al., 1990). A mLDL age nas células da íntima e induz a expressão de citocinas inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão levando a aderência de monócitos e linfócitos ao endotélio e a migração destes para a camada subendotelial. Nessa camada, ocorre a diferenciação dos monócitos em macrófagos (FROSTEGÅRD et al., 1996; STEINBERG, 1997; QUINN et al., 1987, KIM et al., 1994).

O macrófago internaliza a mLDL através de receptores *scavengers*, principalmente SR-A e CD36 (HARA; TAKETOMI, 1987; HASSALL, 1992), sem que ocorra retroalimentação negativa na expressão desse tipo de receptor. Desta maneira o macrófago fica repleto de gotículas citoplasmáticas de ésteres de colesterol, passando a ser chamado de célula espumosa, e, juntamente com células musculares e linfócitos T, formam as estrias gordurosas (LIBBY, 2000). Este é considerado o primeiro estágio do processo aterosclerótico e que pode ser formado nos primeiros anos de vida (MUNRO; COTRAN, 1988).

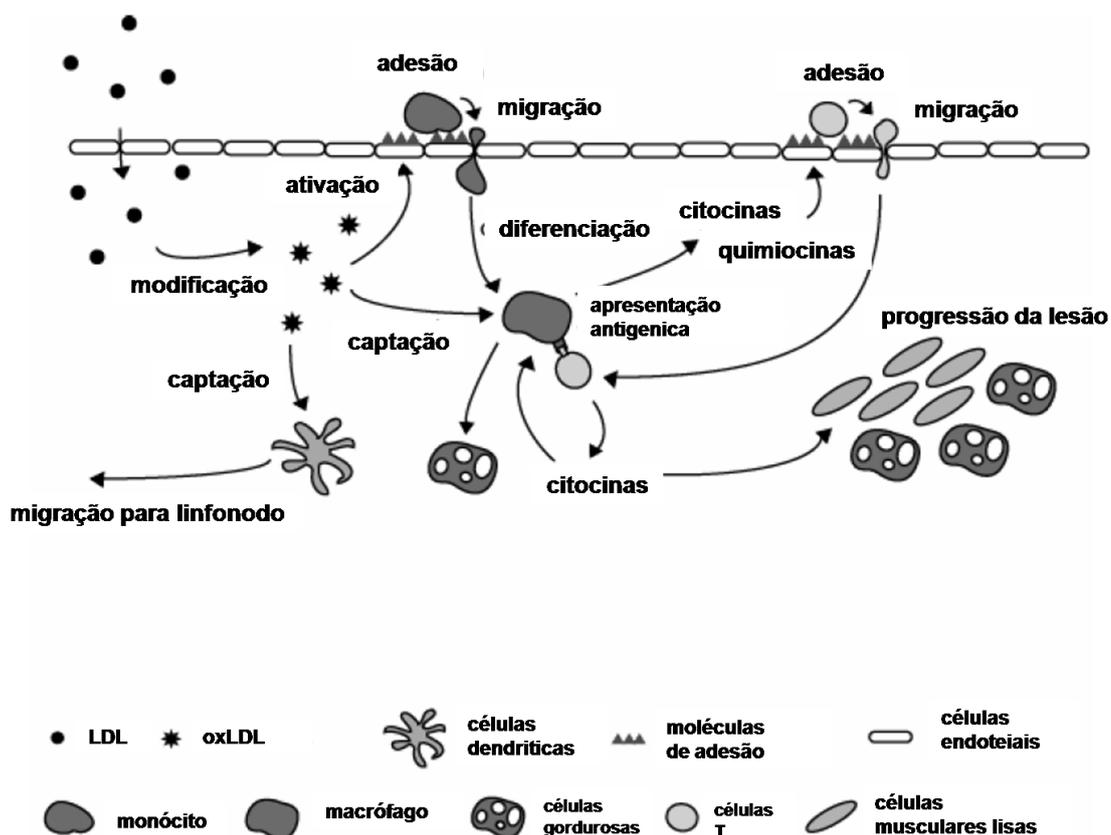
As células espumosas secretam diversos mediadores inflamatórios incluindo fator ativador de plaqueta (PAF), eicosanoides, interleucinas, fosfolipases e metaloproteases. Em resposta a fatores de crescimento e citocinas secretados por macrófagos e células T, células musculares lisas migram da camada média para a

---

camada íntima onde se proliferam e produzem matriz extracelular a fim de formar uma cápsula ao redor das células espumosas e do colesterol livre (LEE; LIBBY, 1997). Essa estria fibro-gordurosa caracteriza a fase intermediária da lesão aterosclerótica.

Placas avançadas têm um centro de células gordurosas, debris celulares e lipídios extracelulares circundados por uma capa fibrosa de células musculares lisas e matriz extracelular rica em colágeno. Com a progressão do processo aterosclerótico, as citocinas inflamatórias inibem a proliferação das células musculares lisas e a produção de colágeno e induzem a produção de metaloproteases que degradam o colágeno enfraquecendo a lesão o que a torna suscetível à ruptura (HANSSON et al., 1989; MACH, 1997; AMENTO, 1991).

---



**Figura 2 – Aterogênese.** A LDL migra do sangue por difusão simples para a camada íntima, onde é oxidada. A oxLDL estimula as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão, e a produção local de citocinas inflamatórias. Os monócitos são recrutados para a íntima, se diferenciam em macrófagos, e passam a capturar oxLDL via receptores *scavenger*, transformando-se em células espumosas.

FONTE: Adaptado de: GLASS; WITZTUM, 2001

---

#### 1.1.4 Modelos Animais Usados no Estudo da Aterosclerose

Devido à complexidade e a cronicidade da aterosclerose, associada à ausência de métodos de detecção não invasivos que permitam uma caracterização seqüencial da doença, modelos animais têm sido utilizados para definir seus mecanismos fisiopatológicos e se tentar estabelecer alvos precisos para possíveis tratamentos. Vários modelos animais, como coelhos, porcos, primatas e roedores são utilizados em estudos de doenças cardiovasculares, todavia os mais utilizados são os camundongos. No entanto, os camundongos selvagens são altamente resistentes ao desenvolvimento de aterosclerose. Estes animais apresentam baixos níveis sorológicos de VLDL (*very low density lipoprotein*) e LDL e a maior parte do colesterol está na fração de HDL, em resposta a uma dieta com baixos níveis de lipídeos e colesterol. Em camundongos selvagens a HDL é responsável pelo transporte de mais de 85% do colesterol plasmático, enquanto que em humanos a LDL é a principal LP transportadora de colesterol (65-85%) (HOFKER et al., 1998; BRESLOW, 1996; PLUMP, et al., 1992). Apesar dessa diferença metabólica, os camundongos são usados como modelos experimentais para o estudo da aterosclerose por possuírem o mesmo conjunto de genes que controlam o metabolismo de LP em humanos, com poucas exceções. Ainda sua utilização é facilitada pela rápida reprodução, amplo conhecimento da sua genética e pelo pequeno porte dos animais (VANDERLAAN et al., 2004; HOFKER et al., 1998).

As técnicas transgênicas, mormente a de *knockout*, têm possibilitado a criação de modelos murinos para o estudo da fisiopatologia e dos componentes específicos do sistema imune na aterosclerose. Atualmente, dois modelos de camundongos *knockout*, que desenvolvem hipercolesterolemia e aterosclerose são usados: os que são *knockout* para a apoE (*apoE<sup>-/-</sup>*) e os para receptor de LDL (*Ldlr<sup>-/-</sup>*). Os *apoE<sup>-/-</sup>* desenvolvem hipercolesterolemia e aterosclerose espontaneamente enquanto que os *Ldlr<sup>-/-</sup>* precisam ser alimentados com dieta rica em colesterol (ISHIBASHI et al., 1993; VENIANT et al., 2001).

---

---

#### 1.1.4.1 Apolipoproteína E

A apoE é um componente constitutivo dos quilomicrons, e pode estar presente na HDL, VLDL e IDL (*intermediate density lipoprotein*), sendo fundamental para a estabilização, solubilização e catabolismo destas partículas. É sintetizada principalmente pelos hepatócitos, porém pode ser produzida em células de origem hematopoiéticas, como os macrófagos. Atua no transporte de colesterol e outros lipídios entre o tecido periférico e o fígado, ligando-se a receptores específicos nas células desses tecidos (MAHLEY; HUANG, 1999). A deficiência na apoE leva a uma remoção deficiente de quilomicrons remanescentes e de VLDL e IDL da circulação (PLUMP et al., 1992).

Camundongos apoE<sup>-/-</sup> desenvolvem lesões ateroscleróticas similares as humanas, progredindo desde estrias gordurosas a placas fibrogordurosas e a lesões avançadas (PIEDRAHITA et al., 1992; PLUMP et al., 1992). Entretanto, seu perfil lipídico difere do humano, uma vez que possuem preponderantemente elevação na fração VLDL.

A apoE possui diversas outras funções fisiológicas como na coagulação, estresse oxidativo, homeostase das células neuronais e da glia, função adrenal, proliferação celular e inflamação. Na aterosclerose esta proteína apresenta um papel protetor, uma vez que, sendo produzida localmente pelos macrófagos, promove o efluxo do colesterol dessas células, reduz o estresse oxidativo e inibe os mecanismos da inflamação. (HARA; YOKOYAMA, 1991; HAYEK et al., 1994).

#### 1.1.5 Anticorpos e Aterosclerose

Os diversos neo-antígenos formados a partir da modificação da LDL podem ser reconhecidos por auto-anticorpos. Eles reagem não apenas contra antígenos de natureza lipídica, como relatado na literatura (DAMASCENO et al., 2000), mas também contra a parte protéica da LDL, sugerindo uma importante resposta imune humoral contra a apoB (GIDLUND et al., 1996). O papel desse tipo de resposta imune contra a oxLDL ainda gera muita controvérsia. Alguns estudos tentam correlacionar altos níveis de anticorpos anti-oxLDL ao aumento do risco de desenvolvimento de aterosclerose (HULTHE et al., 2001). Enquanto outros, mais

---

---

recentes, mostram a existência de uma relação inversa entre níveis destes anticorpos e a suscetibilidade à ocorrência dessa doença (SHOJI et al., 2000). Em recente publicação, Ketelhuth et al., 2008 testaram frações de oxLDL separadas por tamanho molecular contra soro de pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e de controles normolipidêmicos, sendo que este grupo apresentou títulos mais elevados de anticorpos contra as frações de maior peso molecular e o grupo DAC contra frações de menor peso molecular.

Esses dados reforçam a hipótese da existência de anticorpos contra diferentes fragmentos da oxLDL. A suscetibilidade ou proteção à aterosclerose deve estar relacionada não só aos níveis destes anticorpos, mas também às suas especificidades e suas diferentes classes e subclasses.

Apesar dos animais hiperlipidêmicos apresentarem auto-anticorpos contra oxLDL, o papel dos mesmos no processo aterosclerótico ainda não está esclarecido. Alguns estudos têm demonstrado que anticorpos IgM são anti-aterogênicos por possibilitarem a remoção de partículas de oxLDL através da via clássica de ativação do complemento por C1q (SHAW et al., 2001; LEWIS et al., 2009).

Como em muitas doenças inflamatórias o balanço entre a resposta Th1 e Th2 influencia a progressão da aterosclerose bem como nas subclasses de anticorpos contra os antígenos específicos da doença. A lesão aterosclerótica contém citocinas que promovem uma resposta tipo Th1, predominantemente. Não obstante, quando se analisa as subclasses de IgG anti-oxLDL em modelos murinos tipicamente Th1 (C57Bl/6) a subclasse IgG<sub>2a</sub> apresenta título maior que a subclasse IgG<sub>1</sub> (SCHULTE et al., 2008).

#### *1.1.5.1. Anticorpos Naturais*

Anticorpos naturais são uma classe de anticorpos, principalmente IgM, que são produzidos por células B1 sem a participação de células T. O anticorpo natural IgM que promove proteção contra infecções pneumocócicas é chamado de T15, (SHAW et al., 2000).

Camundongos apoE<sup>-/-</sup> possuem clones de IgM de anti-oxLDL são idênticos aos T15 na região variável. Esses clones reconhecem a fosforilcolina presente na parede celular de pneumococos, fosfolípidos oxidados e células apoptóticas e inibem a captação de oxLDL e de células apoptóticas por

---

---

macrófagos (PALINSKI et al., 1996; HÖRKKÖ et al., 1999; CHANG et al., 1999; SHAW et al., 2001). O efeito ateroprotetor desses anticorpos pode ser através dessa inibição de captação de oxLDL com conseqüente inibição da formação de células espumosas. A vacina anti-pneumococica reduz a aterosclerose em modelos experimentais (BINDER et al., 2003).

### **1.1.6 Imunização e Aterosclerose**

Muitos estudos mostram a presença de anticorpos IgM e IgG na placa aterosclerótica (ZHOU; HANSSON, 1999; HANSSON, 1979). Essas observações são a base de muitas hipóteses a respeito da função desses anticorpos.

A imunização de camundongos apoE<sup>-/-</sup> com homólogo de homogeneizado de placa aterosclerótica ou MDA-LDL causa redução da lesão aterosclerótica (ZHOU et al., 2001; GEORGE et al., 1998). Estes estudos mostraram que a presença de anticorpos IgG contra estes antígenos foi o motivo dessa redução.

Outros estudos, observaram que a imunização de animais apoE com peptídeos específicos da apoB também reduziram a aterosclerose (FREDRIKSON et al., 2003; CHYU et al., 2005). Tratamento com IgG humana recombinante contra peptídeos da apoE também reduzem a aterosclerose experimental (SCHIOPU et al., 2004).

#### *1.1.6.1 Adjuvantes na imunização contra Aterosclerose*

Os adjuvantes ("adjuvare" = auxiliar) são substâncias utilizadas como estimuladores não-específicos em associação a antígenos, com o objetivo específico de auxiliar ou potencializar a resposta imunológica que seria de menor intensidade, se o antígeno fosse ministrado isoladamente. Além disso, servem para evitar o catabolismo do antígeno, retê-lo no sítio de inoculação e recrutar células imunes a interagirem com o imunógeno. Atuam, também, ativando de maneira seletiva as subpopulações de células T<sub>helper</sub> (MITCHELL et al., 2001).

O adjuvante influencia na apresentação antigênica, induz a produção de citocinas imunomoduladoras e age sobre as células apresentadoras de antígeno

---

---

umentando, acelerando, modificando ou prolongando a resposta imune específica ao antígeno. O adjuvante de Freund completo, composto por óleo mineral e células mortas de *Mycobacterium tuberculosis*, induz uma forte resposta Th1, DTH (*delayed-type hypersensitivity* - hipersensibilidade tardia) e formação de anticorpos, enquanto que o adjuvante de Freund incompleto, que não contém a micobacteria, induz a uma resposta do tipo Th2, formação de anticorpo, porém não induz DTH (NILSSON; HANSSON; SHAH, 2005). Alum é usado como uma alternativa do adjuvante de Freund por causar menos efeitos adversos. Este, junto com o fosfato de cálcio, são os únicos adjuvantes licenciados para o uso humano (LINDBLAD, 2004). Khallou-Laschet et al. (2006) demonstraram que a injeção de Alum ou adjuvante de Freund completo ou incompleto em camundongos apoE<sup>-/-</sup> leva a uma grande redução no tamanho da lesão aterosclerótica. Outros estudos demonstram que a imunização de coelhos e camundongos com adjuvante de Freund completo induz a formação de uma resposta imune pró-aterogênica contra HSP (XU et al., 1992; GEORGE et al., 1999). Nos primeiros estágios de ativação do sistema imune na aterosclerose as células Th1 promovem o desenvolvimento dessa doença (BINDER et al., 2002; HANSSON et al., 2002). Neste cenário, adjuvantes que favoreçam uma resposta antiinflamatória Th2 podem ser mais eficientes na imunização contra a aterosclerose.

### 1.1.7 Aterosclerose e Doença Renal

A mortalidade por doenças cardiovasculares é 10-20 vezes maior em pacientes com doença renal crônica (FOLEY et al., 1998) devido ao fato de apresentarem processos ateroscleróticos avançados.

Idade avançada, hipertensão arterial, diabetes e dislipidemia são fatores de risco comuns às doenças cardiovasculares e renais (LONGENECKER et al., 2002). Contudo, Go et al. (2004) mostraram que somente a taxa de filtração glomerular reduzida constitui fator de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular. Em estudo observacional de longo prazo, estratificado por faixa etária, foi demonstrado que o déficit de função renal é um fator de risco independente para a ocorrência de eventos cardiovasculares e óbitos decorrentes desses eventos (FRIED et al., 1998).

---

É crescente o número de evidências que sugerem o efeito direto da aterosclerose sobre a função renal; em grande parte por causa da doença microvascular e intraglomerular que representam a fase silenciosa da isquemia do rim (MEYRIER; HILL; SIMON, 1998; TEXTOR, 2004). Anormalidades na função deste órgão podem estar presentes nos primeiros estágios da aterogênese e em pacientes com evidências de aterosclerose apenas extrarenal (BAGGIO et al., 2001).

A patogênese envolvida na interação entre essas doenças ainda está pouco esclarecida, principalmente por serem doenças multifatoriais. Os animais apoE<sup>-/-</sup> têm sido utilizados a fim de se entender os mecanismos de interação entre elas (KULAH et al., 2007; WEN et al., 2002; BUZELLO et al., 2003). Knowles et al., 2000, estudando camundongos deficientes em óxido nítrico sintase endotelial e em apoE observaram, em 4 meses, diminuição no peso dos rins, aumento da creatinina plasmática, e um aumento do número de glomérulos com depósitos de lipídios, porém não explicaram o mecanismo envolvido nesse processo.

Um modelo experimental usado para estudo de doenças renais crônicas é o de isquemia e reperfusão, onde se realiza a obstrução da via arterial do rim. Após o retorno do fluxo sanguíneo para o parênquima renal ocorre o desencadeamento de uma gama de eventos fisiopatológicos, caracterizados pela produção de espécies reativas de oxigênio, infiltrado de células inflamatórias, produção de citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas (MOLITORIS, 1991).

---

---

---

## **2 OBJETIVOS**

---

---

## 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste estudo foi de avaliar o efeito da imunização com oxLDL em um modelo experimental de aterosclerose espontânea utilizando-se camundongos apoE<sup>-/-</sup>. Outrossim, objetivou-se também avaliar a influência dessa imunização em um modelo experimental de isquemia renal, onde apenas um rim sofre isquemia e reperfusão.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar a influência do adjuvante de Freund nas variáveis avaliadas.
2. Analisar a influência da imunização com oxLDL na aterosclerose experimental.
3. Analisar a influência do processo de isquemia e reperfusão renal na aterosclerose experimental.
4. Analisar a influência da imunização com oxLDL no processo de isquemia e reperfusão renal.

Para tanto as variáveis avaliadas foram: perfil lipídico (colesterol total e suas frações – LDL, HDL e VLDL, triacilgliceróis), anticorpos anti-oxLDL e anti-pepD e lesão aterosclerótica.

---

---

# **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### 3.1 ANIMAIS

No presente estudo foram utilizados camundongos C57Bl/6 selvagens e camundongos deficientes do gene codificador para a apoE (apoE<sup>-/-</sup>) de *background* C57Bl/6 com idade inicial de 6-8 semanas.

A matriz dos animais apoE<sup>-/-</sup> foi doada pela Professora Helena Coutinho Franco de Oliveira do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Universidade de Campinas (Bar Harbor, ME). Camundongos apoE<sup>-/-</sup> foram desenvolvidos por Piedrahita et al. (1992) através da inativação do locus responsável pela produção de apolipoproteína E.

Machos e fêmeas foram usados para a avaliação da imunização com FIA e com oxLDL. Para a avaliação da isquemia renal apenas machos foram usados.

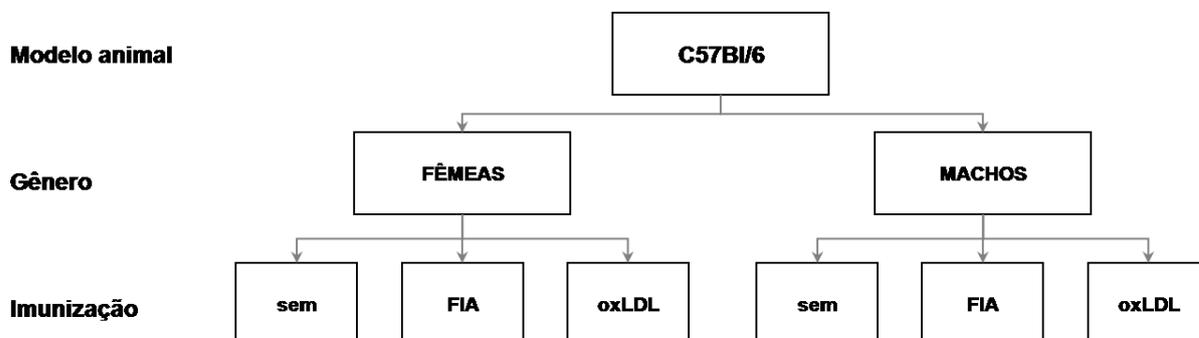
Durante estudo, os animais foram mantidos em gaiolas com 4 animais, sob iluminação de 12 h, com o fornecimento de ração e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade de São Paulo.

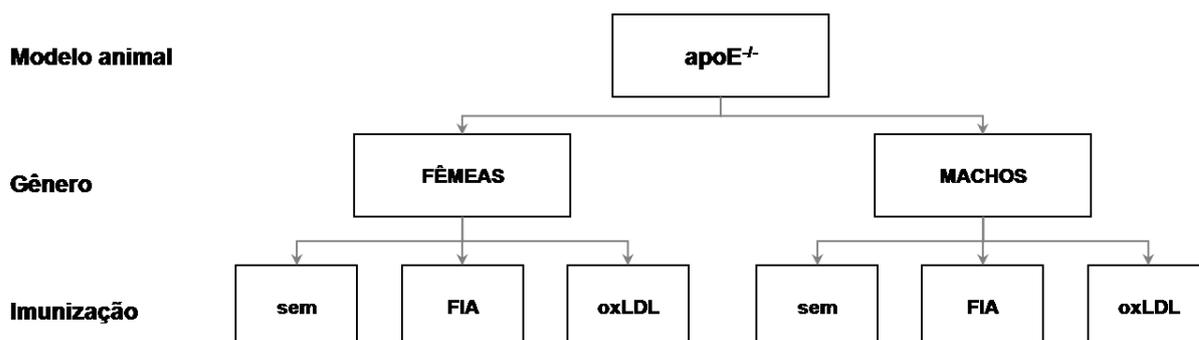
### 3.2 GRUPOS

Os experimentos foram sempre realizados de forma pareada nos grupos de animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup>. As figuras 3-6 apresentam a divisão dos grupos conforme o procedimento realizado.

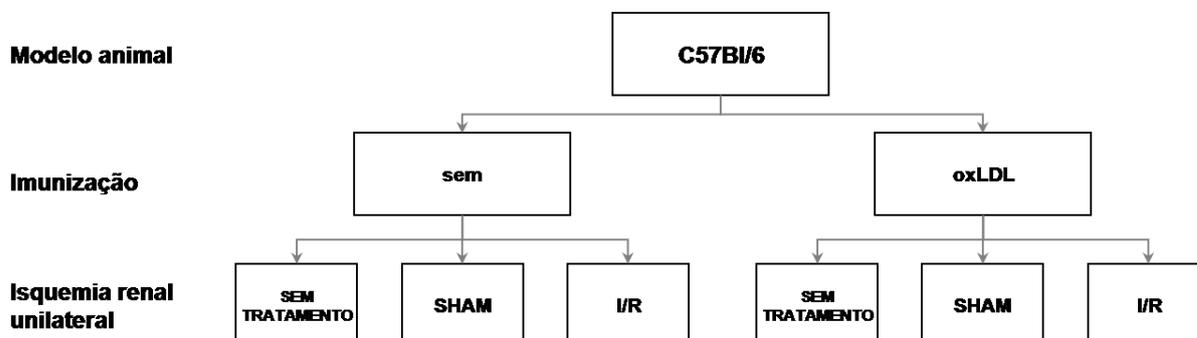
---



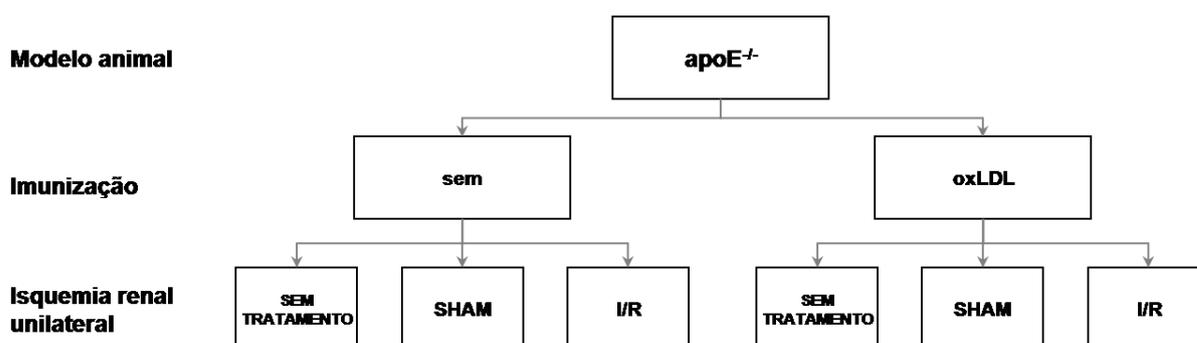
**Figura 3 – Esquema dos grupos experimentais realizados com camundongos C57Bl/6.** Os animais que não receberam imunização também não receberam qualquer outra forma de tratamento experimental (**sem**), apenas para se ter um controle experimental. Animais **FIA** foram imunizado com 100  $\mu$ L de veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) primeiramente por via subcutânea na região inguinal, seguido por 3 reforços de mesmo volume via intraperitoneal, no intervalo de 15 dias entre eles. Os animais **oxLDL** foram imunizados seguindo o mesmo protocolo de imunização que os animais FIA, porém a oxLDL foi utilizada como antígeno na concentração de 50 $\mu$ g/mL na primeira imunização e de 25 $\mu$ g/mL nos reforços.



**Figura 4 – Esquema dos grupos experimentais realizados com camundongos apoE<sup>-/-</sup>.** Os animais que não receberam imunização também não receberam qualquer outra forma de tratamento experimental (**sem**), apenas para se ter um controle experimental. Animais **FIA** foram imunizado com 100  $\mu$ L de veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) primeiramente por via subcutânea na região inguinal, seguido por 3 reforços de mesmo volume via intraperitoneal, no intervalo de 15 dias entre eles. Os animais **oxLDL** foram imunizados seguindo o mesmo protocolo de imunização que os animais FIA, porém a oxLDL foi utilizada como antígeno na concentração de 50 $\mu$ g/mL na primeira imunização e de 25 $\mu$ g/mL nos reforços.



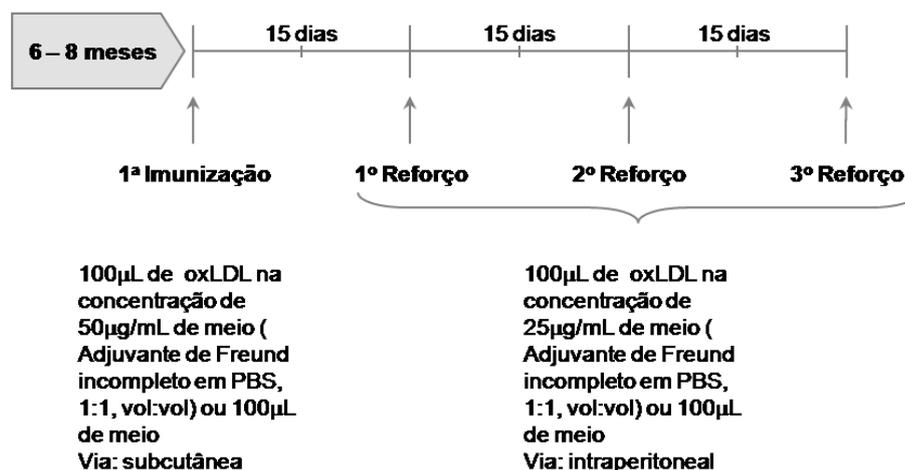
**Figura 5 – Esquema dos grupos experimentais realizados com camundongos C57Bl/6 machos.** Os animais que não receberam qualquer forma de imunização (**sem**) foram usados apenas como controle. Os animais que foram imunizados com oxLDL (**oxLDL**) receberam primeiramente uma dose de 50 $\mu$ g/mL de oxLDL em 100  $\mu$ L veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) subcutaneamente, seguido por 3 reforços de 25  $\mu$ g/mL de oxLDL em 100  $\mu$ L de veículo intraperitonealmente, no intervalo de 15 dias entre eles. Alguns animais foram submetidos procedimento cirúrgico no qual houve a isquemia renal unilateral por 60 min (**I/R**). Para controle deste procedimento, outros animais sofreram apenas a cirurgia sem que sofressem I/R (**SHAM**). Para controle, outros animais não sofreram qualquer procedimento (**SEM TRATAMENTO**).



**Figura 6 – Esquema dos grupos experimentais com camundongos apoE<sup>-/-</sup> machos.** Os animais que não receberam qualquer forma de imunização (**sem**) foram usados apenas como controle. Os animais que foram imunizados com oxLDL (**oxLDL**) receberam primeiramente uma dose de 50 $\mu$ g/mL de oxLDL em 100  $\mu$ L veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) subcutaneamente, seguido por 3 reforços de 25  $\mu$ g/mL de oxLDL em 100  $\mu$ L de veículo intraperitonealmente, no intervalo de 15 dias entre eles. Alguns animais foram submetidos procedimento cirúrgico no qual houve a isquemia renal unilateral por 60 min (**I/R**). Para controle deste procedimento, outros animais sofreram apenas a cirurgia sem que sofressem I/R (**SHAM**). Para controle, outros animais não sofreram qualquer procedimento (**SEM TRATAMENTO**).

### 3.3 IMUNIZAÇÕES

As imunizações foram realizadas seguindo-se o protocolo esquematizado na figura 7.



**Figura 7 – Esquema do protocolo de imunização utilizado durante o estudo.** Animais de 6-8 semanas de vida receberam inicialmente 50µg/mL de oxLDL em 100 µL veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) subcutaneamente ou apenas 100µL de veículo, seguido por 3 reforços de 25 µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo ou apenas 100µL de veículo, intraperitonealmente, no intervalo 15 dias entre eles.

#### 3.3.1 Primeira Imunização

Na primeira imunização foi injetado subcutaneamente na região inguinal 50 µg/mL de antígeno, oxLDL, emulsificado em 100 µL de meio (Adjuvante de Freund incompleto [Sigma] + PBS, 1:1, vol:vol) por animal (FREIGANG et al., 1998) ou apenas 100 µL de veículo.

#### 3.3.2 Reforços

Foram realizados 3 reforços por via intraperitoneal, em intervalos de 2 semanas entre eles, com 25 µg/mL do antígeno emulsificado em 100 µL de veículo (Adjuvante de Freund incompleto [Sigma] + PBS, 1:1, vol:vol) por animal ou apenas com 100 µL de veículo por animal (FREIGANG et al., 1998).

---

### 3. 4 ANTÍGENO UTILIZADO NA IMUNIZAÇÃO E EM IMUNOENSAIOS: OXLDL

Ao "pool" de plasma fresco de voluntários humanos normolipidêmicos (colesterol < 200mg/dL) e saudáveis foram adicionados os seguintes preservantes: 2 mM benzamidina, 0,5% de gentamicina, 0,25% cloranfenicol, 0,5 mM PMSF, e 0,1 unit/mL de aprotinina. A LDL (densidade = 1,019 a 1,063 g/mL) e o infranadante (densidade > 1,21g/mL) foram isolados por ultracentrifugação (40000 rpm a 4 °C) (Havel, Eder et al., 1955) usando o rotor 75Ti (L-8 ultracentrifuge, Beckman). Após a preparação foi adicionado EDTA à LDL, que foi armazenada a 4 °C. Antes de ser oxidada, a LDL foi dialisada durante 48 h contra PBS. A oxidação foi induzida pela incubação de 1 mL de LDL (1-3 mg/mL de proteína) com CuSO<sub>4</sub> (concentração final de 20 µM de CuSO<sub>4</sub>) por 18 h a 37 °C. A reação foi finalizada com adição de EDTA (concentração final de 1,0mM) (KETELHUTH et al., 2008; ZARATIN et al., 2002).

### 3.5 PROTOCOLO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO RENAL

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com doses de 100 mg/kg de peso de ketamina e 10 mg/Kg de peso de xilazina (Agribands do Brasil, São Paulo). Após estarem anestesiados os animais foram fixados em mesa cirúrgica em decúbito dorsal. A assepsia do abdômen foi realizada com álcool iodado a 2%. Foi feita incisão xifopubiana mediana para posterior exposição das vísceras abdominais a fim de dissecar e isolar os pedículos renais. A isquemia renal unilateral foi promovida por ligadura desses pedículos com *clamps* microvasculares (Rocca) durante 60 min. Após esse tempo os *clamps* foram retirados e os rins massageados até observação da completa reperfusão renal. Animais controles, chamados de *sham*, foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a ligadura de quaisquer dos pedículos arteriais renais. A cavidade foi fechada com pontos cirúrgicos em dois planos com fios de seda tamanho 4-0 (Technofio). Os animais foram mantidos em aquecimento por iluminação indireta até completa recuperação da anestesia. Após 6 semanas os animais foram sacrificados como descrito anteriormente (FRIEDEWALD; RABB, 2004).

---

### 3.6 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E COLETA DE SANGUE

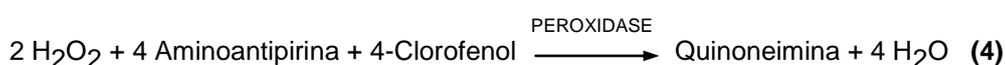
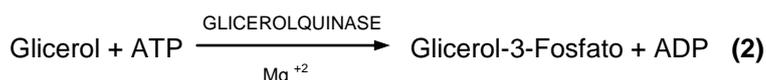
Ao término do período 4 semanas após a última imunização ou 6 semanas após a isquemia, os animais foram mantidos por 12 h em jejum, anestesiados (ketamina, 40 mg/kg i.p. e xilazina 6 mg/kg i.p.) e o sangue coletado pelo plexo oftálmico. O sacrifício foi realizado por sangria total.

O sangue retirado foi centrifugado por 15 min a 14000 rpm para a obtenção do soro, que foi armazenado a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  para análises posteriores.

### 3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

#### 3.7.1 Triacilgliceróis (TG)

A concentração sorológica de TG foi determinada utilizando-se *kit* enzimático comercial (Triglicérides Liquiform, Labtest), de acordo com o método enzimático colorimétrico (FOSSATI, PRECIPE, 1982). Neste método, os triacilgliceróis do soro foram hidrolisados pela lipase lipoprotéica produzindo glicerol livre, que é fosforilado pela enzima glicerol quinase, cujo produto sofre a ação da glicerol-P-oxidase, a qual em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Este, sob a ação da peroxidase em presença de um reagente fenólico (p-clorofenol) e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado (quinona), com máximo de absorção a 492 nm (Reações 1-4).

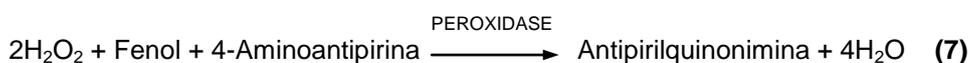


---

Este teste foi adaptado para realização em microplacas de 96 poços. Assim, a 10  $\mu\text{L}$  de soro dos camundongos foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  do reagente de cor. Após o período de incubação de 10 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 500 nm em um leitor de microplaca (Modelar Devices, modelo Spectra Max Plus). A concentração de TG foi determinada através da curva padrão, que foi submetida ao mesmo procedimento de análise que as amostras. O padrão utilizado para a curva de calibração foi obtido junto ao *kit* comercial para determinação deste analito.

### 3.7.2 Colesterol Total (CT)

A concentração sorológica de colesterol total (CT) foi determinada de acordo com o método colesterol oxidase (ALLAIN et al., 1974), utilizando-se *kit* enzimático comercial (Colesterol Liquiform, Labtest). O método consiste na hidrólise dos ésteres de colesterol pela colesterol esterase, produzindo colesterol livre, o qual é oxidado a colest-4-en-3-ona com a produção simultânea de peróxido de hidrogênio. Este sofre ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina produzindo um composto róseo-avermelhado (quinonimina) com máximo de absorção em 500nm (Reações 5-7).



Esse teste foi adaptado para ser realizado em microplaca de 96 poços, sendo realizado como descrito acima para a determinação de TG. Assim, a 10  $\mu\text{L}$  de soro dos camundongos foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  do reagente de cor. Após o período de incubação de 10 minutos a 37 °C, a absorbância foi lida a 500 nm em um leitor de microplaca (Modelar Devices, modelo Spectra Max Plus). O mesmo procedimento foi feito com a curva de calibração. O padrão utilizado para a curva de calibração foi obtido junto ao *kit* comercial para determinação deste analito.

---

---

### 3.7.3 HDL

As amostras foram tratadas com agente precipitante (Colesterol HDL, Labtest) para que os quilomicrons, VLDL e LDL fossem quantitativamente precipitados através do ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio. Após centrifugação, a fração HDL que permaneceu no sobrenadante foi determinada utilizando-se o *kit* utilizado para a concentração de colesterol total (FRIEDEWALD et al., 1972).

### 3.7.4 LDL e VLDL

A concentração sorológica de LDL e VLDL foi calculada utilizando a equação de Friedewald:

Equação de Friedewald:

$$\text{LDL} = \text{CT} - (\text{HDL} + \text{VLDL}), \text{ onde } \text{VLDL} = \text{TG}/5 \text{ (1)}$$

## 3.8 DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA oxLDL

A detecção de anticorpos IgM, IgG, IgG1 e IgG2a contra oxLDL presentes nos soros dos animais foi analisada pelo método de ELISA modificado (DAMASCENO et al., 2001; KETELHUTH et al., 2008; ZARATIN et al., 2002). Placas de 96 poços (Costar<sup>®</sup>, cód. 3690) foram sensibilizadas com 50  $\mu\text{L}$ /poço de oxLDL humana (7,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,4. As placas foram armazenadas a 4 °C *overnight*. Após este período, foram lavadas quatro vezes com 100  $\mu\text{L}$  PBS e bloqueadas com 150  $\mu\text{L}$  de gelatina (Merck) (1%) diluída em PBS, por 2h a temperatura ambiente. Após nova etapa de quatro lavagens seqüenciais com PBS, amostras de soro diluídas a 1:200 (50  $\mu\text{L}$ ) foram adicionadas aos poços e as placas mantidas por 2h a temperatura ambiente. Em seguida foram feitas 4 lavagens com 100  $\mu\text{L}$  de em PBS/Tween 20. Nesta etapa diferentes anticorpos de cabra foram utilizados para a determinação dos diferentes tipos de anticorpos analisados. Para a análise de IgG foi utilizado o anticorpo de cabra conjugado com peroxidase anti-IgG de camundongo (KPL) (50 $\mu\text{L}$ ; 1:500) enquanto que para a determinação dos demais

---

---

anticorpos foram utilizados anticorpos de cabra biotinilado contra IgM, IgG1 e IgG2a (50µL; 1:5000). Após 1h de incubação, a temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas com PBS/Tween 20. Nos experimentos em que anticorpos biotinilados foram usados, foi adicionada estreptavidina conjugada com peroxidase (50µL; 1:5000) e as placas permaneceram por 40 min a temperatura ambiente, seguida por nova etapa de lavagem. O substrato para enzima (75 µL/poço; 250 mg de tetrametilbenzidina diluído em 50 mL de DMSO, 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 12 mL de tampão citrato, pH 5,5) foi adicionado e incubado por aproximadamente 5 min, a temperatura ambiente. Após 5 min, a reação foi parada com 25 µL de 2,0 M de ácido sulfúrico. A leitura da densidade óptica foi realizada a 450 nm.

Numa possível comparação entre as diferentes baterias de ensaios para determinação de anticorpos anti-oxLDL foi utilizado um controle interno (*Pool* de soro de camundongos) e um branco (usando PBS no lugar da amostra) em cada placa, dessa maneira os resultados são expressos através da absorbância (Abs) relativa (AR) calculada pela seguinte fórmula:

$$AR = \frac{((Abs \text{ anticorpo})-(Abs \text{ branco}))}{((Abs \text{ controle interno})-(Abs \text{ branco}))} \quad (2)$$

### 3.9 DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA pepD

Foram desenvolvidos, em nosso laboratório, diversos peptídeos sintéticos baseados na seqüência de aminoácidos da apoB. Estes foram selecionados de acordo com parâmetros conhecidos para a predição de peptídeos imunogênicos (CHEN; THOMAS; KEANEY, 1988):

- a) a presença de regiões anfipáticas;
  - b) probabilidade da exposição da superfície da molécula em sua configuração terciária;
  - c) presença de domínios na molécula que permite a ligação ao MHC;
  - d) domínios relacionados com os receptores celulares de LDL;
-

e) acessibilidade da tripsina (onde a inabilidade da tripsina clivar sugeriria que este epítopo escondido somente é acessível em uma molécula apoB degradada); e,

f) solubilidade na água (para melhorar a manipulação e imunização).

Além disso, o potencial imunogênico dos peptídeos foi baseado na informação física sobre a molécula intacta da apoB, obtida de um banco de dados do específico (*Expasy Molecular Biology Server: www.expasy.ch*) pela metodologia convencional. Vinte e cinco seqüências de peptídeos foram sintetizadas em fase contínua, cada uma com 18-25 resíduos de aminoácidos e com um grupo de amino na extremidade do C-terminal. Destas, uma chamada de pepD, foi selecionada após apresentar um bom potencial imunogênico para o uso em testes de ELISA. Esse peptídeo corresponde a uma das duas seqüências que constituem a região de ligação da LDL com o receptor de LDL nos macrófagos (BOSCHCOV et al., 2000). Sua obtenção é feita junto ao Professor Luiz Juliano do Departamento de Biofísica da UNIFESP, onde é sintetizado em fase sólida, sendo aminado na extremidade C-terminal, usando-se a estratégia química FMOC (projeto concluído FAPESP n<sup>o</sup> 99/00158-4).

A determinação de anticorpos anti-pepD foi feita seguindo o mesmo protocolo usado para a determinação de anticorpos anti-oxLDL, entretanto as placas foram sensibilizadas utilizando 50 µL/poço de pepD (1 µg/mL) em tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,4.

### 3.10 AVALIAÇÃO DA LESÃO ATEROSCLERÓTICA

Ao final dos sacrifícios, os corações foram perfundidos com solução salina seguida de tampão de formalina 10% em PBS e em seguida removidos e mantidos em formaldeído 10% durante 24 h, seguido de banhos seqüenciais em 5%, 10% e 25% de gelatina. O coração e a raiz da aorta foram processados e corados de acordo com a técnica descrita por Paigen et al., 1987. A quantificação de lipídeos marcados nas lesões da aorta foi realizada utilizando-se Image Pro Plus Software (versão 3) para análise de imagens (Media Cybernetics) (RUBIN et al., 1991).

As análises das lesões foram feitas por um único observador sem acesso a identificação do material analisado. As áreas de lesões nas aortas foram expressas

como a soma das áreas presentes em 6 secções seqüenciais, com intervalos de 10  $\mu\text{m}$  a 80  $\mu\text{m}$ , correspondendo a um comprimento de aorta de 480  $\mu\text{m}$  (CAZITA et al., 2003). Os dados da área de lesão são expressos em  $\mu\text{m}^2 \times 10^3$ .

### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão. Para comparação dos resultados nos diferentes grupos foi empregada Análise de Variância com um fator seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey para cada variável de interesse. O coeficiente de correlação de Pearson foi obtido em cada grupo estudado para avaliar a relação linear entre as diferentes variáveis. O nível de significância adotado foi 5% ( $p < 0,05$ ). Todos os processamentos foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 5.

---

---

---

## **4 RESULTADOS**

---

---

## 4. 1 INFLUÊNCIA DO ADJUVANTE DE FREUND INCOMPLETO E DA oxLDL EM ANIMAIS C57Bl/6 E apoE<sup>-/-</sup>

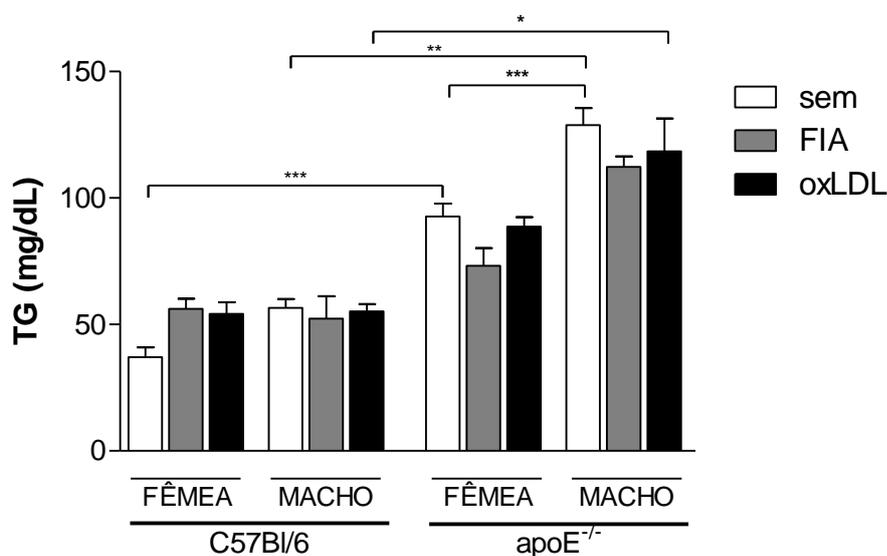
### 4.1.1 Perfil Lipídico

A fim de se avaliar a influência da imunização com oxLDL no modelo experimental de aterosclerose, o perfil lipídico e de anticorpos anti-oxLDL e anti-pepD forma avaliados.

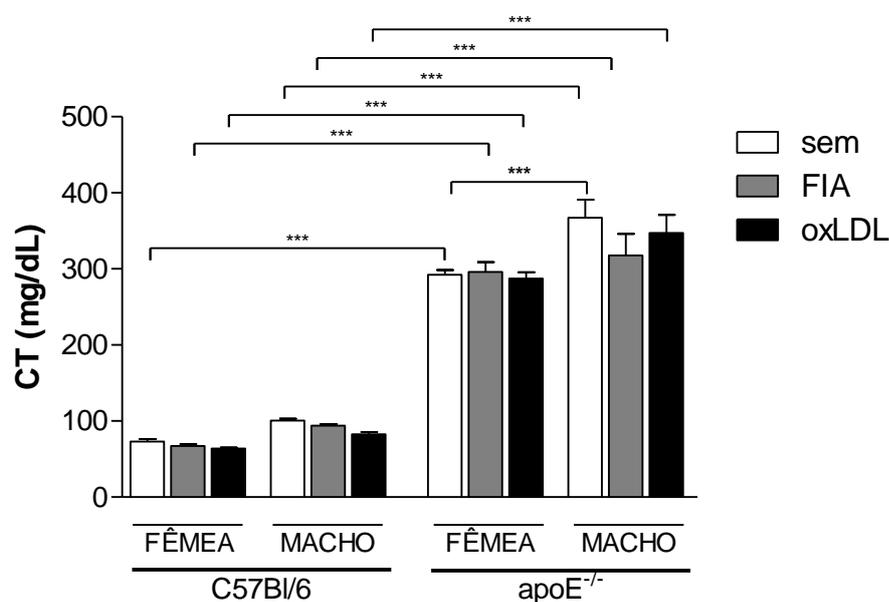
Entre outras alterações fenotípicas, os animais apoE<sup>-/-</sup> apresentam altas concentrações sorológicas de TG, CT, LDL e VLDL (Figuras 8, 9, 11 e 12) e baixas HDL (Figura 10). Os índices de TG, CT e VLDL dos animais apoE<sup>-/-</sup> também diferem entre fêmeas e machos (Figuras 8, 9 e 11). Os animais C57Bl/6 fêmeas e machos não apresentam diferença entres estes índices sorológicos, mas diferem quanto a concentração sorológica de HDL (Figura 10).

A imunização com e sem oxLDL não causa qualquer interferência no perfil lipídico dos animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> (Figuras 8-12).

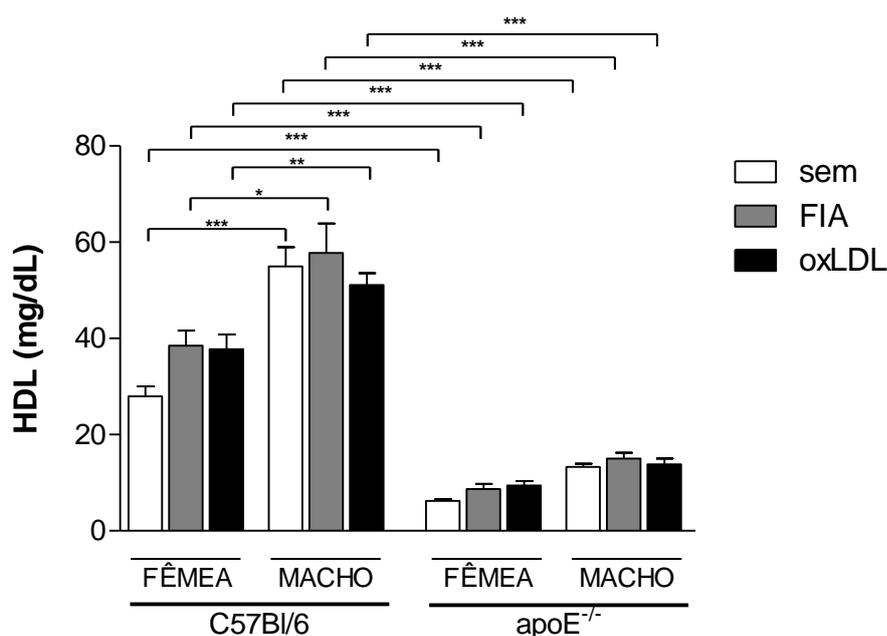
---



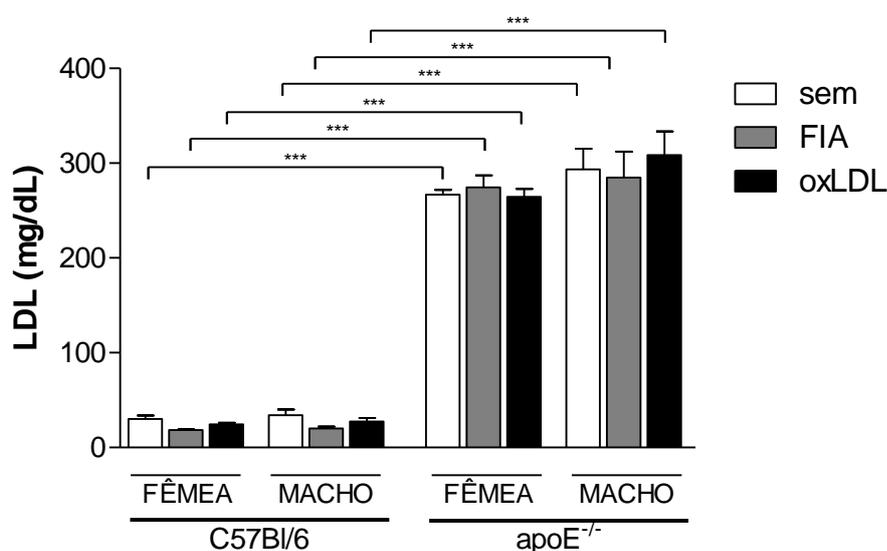
**Figura 8 – Influência do Adjuvante de Freund (FIA) e da imunização com oxLDL na concentração sorológica de TG.** Animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup>, fêmeas e machos foram imunizados inicialmente com 50µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) por via subcutânea, seguido por 3 reforços de 25µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo por via intraperitoneal, no intervalo 15 dias entre eles (**oxLDL**). Seguindo o mesmo protocolo de imunização, dois grupos de animais receberam o veículo em antígeno (**FIA**). Para controle foram utilizados animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que não foram tratados com qualquer tipo de imunização (**sem**). A determinação de TG sorológico foi realizada por *kit* comercial. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*p<0,05; \*\*p<0,001 e \*\*\*p<0,0001.



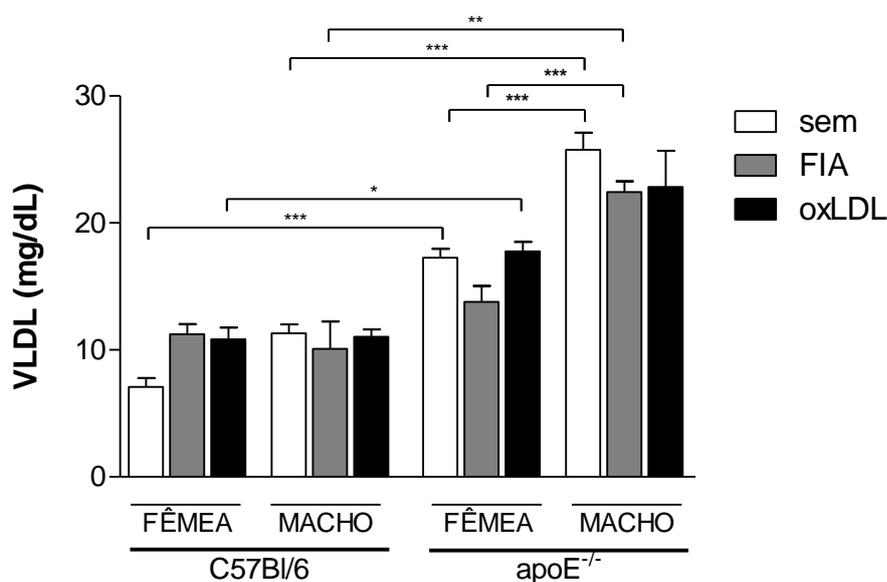
**Figura 9** – Influência do Adjuvante de Freund (FIA) e da imunização com oxLDL na concentração sorológica de colesterol total (CT). Animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup>, fêmeas e machos foram imunizados inicialmente com 50µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) por via subcutânea, seguido por 3 reforços de 25µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo por via intraperitoneal, no intervalo 15 dias entre eles (oxLDL). Seguindo o mesmo protocolo de imunização, dois grupos de animais receberam o veículo em antígeno (FIA). Para controle foram utilizados animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que não foram tratados com qualquer tipo de imunização (sem). A determinação de CT sorológico foi realizada por *kit* comercial. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*\*\*p<0,0001.



**Figura 10 – Influência do Adjuvante de Freund (FIA) e da imunização com oxLDL na concentração sorológica de HDL.** Animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup>, fêmeas e machos foram imunizados inicialmente com 50µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) por via subcutânea, seguido por 3 reforços de 25µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo por via intraperitoneal, no intervalo 15 dias entre eles (**oxLDL**). Seguindo o mesmo protocolo de imunização, dois grupos de animais receberam o veículo em antígeno (**FIA**). Para controle foram utilizados animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que não foram tratados com qualquer tipo de imunização (**sem**). A determinação de HDL sorológico foi realizada por *kit* comercial. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*p<0,05; \*\*p< 0,001 e \*\*\*p<0,0001.



**Figura 11 – Influência do Adjuvante de Freund (FIA) e da imunização com oxLDL na concentração sorológica de LDL.** Animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup>, fêmeas e machos foram imunizados inicialmente com 50µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) por via subcutânea, seguido por 3 reforços de 25µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo por via intraperitoneal, no intervalo 15 dias entre eles (**oxLDL**). Seguindo o mesmo protocolo de imunização, dois grupos de animais receberam o veículo em antígeno (**FIA**). Para controle foram utilizados animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que não foram tratados com qualquer tipo de imunização (**sem**). Os valores de LDL foram obtidos através da Equação de Friedewald. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*\*\*p<0,0001.



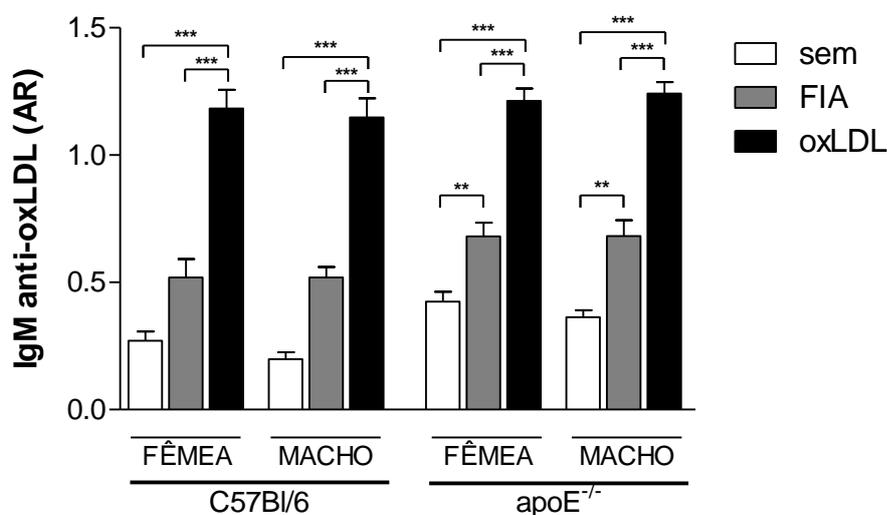
**Figura 12 – Influência do Adjuvante de Freund (FIA) e da imunização com oxLDL na concentração sorológica de VLDL.** Animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup>, fêmeas e machos foram imunizados inicialmente com 50µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) por via subcutânea, seguido por 3 reforços de 25µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo por via intraperitoneal, no intervalo 15 dias entre eles (**oxLDL**). Seguindo o mesmo protocolo de imunização, dois grupos de animais receberam o veículo em antígeno (**FIA**). Para controle foram utilizados animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que não foram tratados com qualquer tipo de imunização (**sem**). Os valores de VLDL foram calculados. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*p<0,05; \*\*p< 0,001 e \*\*\*p<0,0001.

#### **4.1.2 PERFIL DE ANTICORPOS ANTI-oxLDL**

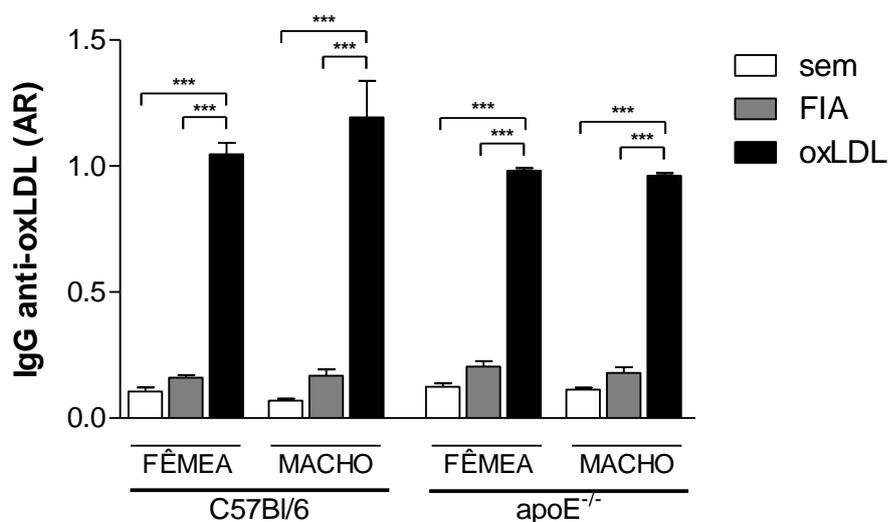
O perfil de anticorpos anti-oxLDL estudado consta das classes IgM e IgG e das subclasses IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2a</sub>. Este perfil de anticorpos anti-oxLDL não diferiu entre os animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup>, nem entre os gêneros. Contudo, quando os animais são imunizados com oxLDL os títulos desses anticorpos aumentam independentes do tipo de animal ou do gênero. (Figuras 13-16).

Na Figura 14, verifica-se um aumento dos anticorpos IgM anti-oxLDL na imunização apenas com FIA independente do tipo animal ou do gênero.

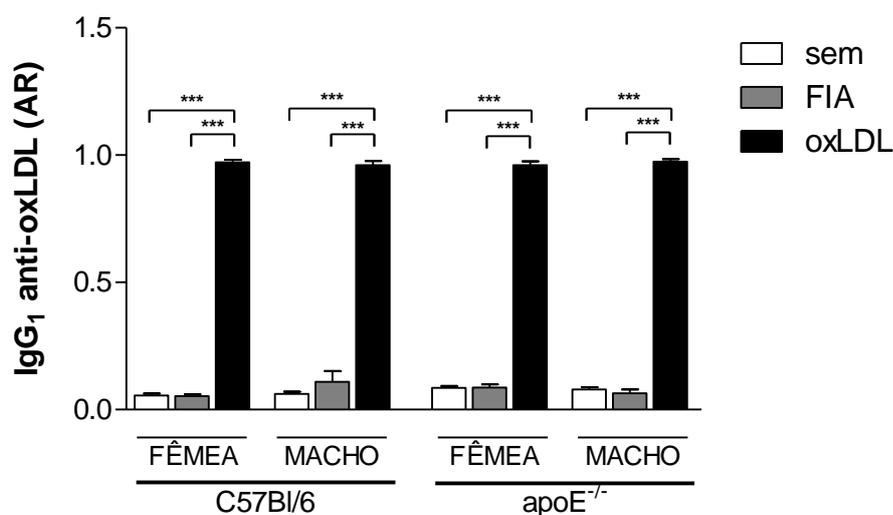
---



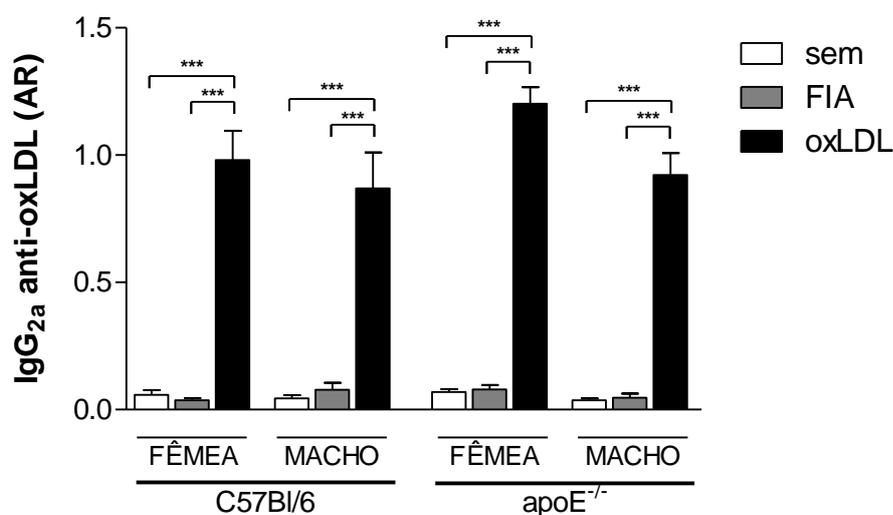
**Figura 13 – Influência do Adjuvante de Freund (FIA) e da imunização com oxLDL nos índices anticorpos IgM anti-oxLDL.** Animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup>, fêmeas e machos foram imunizados inicialmente com 50µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) por via subcutânea, seguido por 3 reforços de 25µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo por via intraperitoneal, no intervalo 15 dias entre eles (**oxLDL**). Seguindo o mesmo protocolo de imunização, dois grupos de animais receberam o veículo em antígeno (**FIA**). Para controle foram utilizados animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que não foram tratados com qualquer tipo de imunização (**sem**). Os níveis de anticorpos foram avaliados por ELISA. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*\*p < 0,001 e \*\*\*p < 0,0001.



**Figura 14 – Influência do Adjuvante de Freund (FIA) e da imunização com oxLDL nos índices anticorpos IgG anti-oxLDL.** Animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup>, fêmeas e machos foram imunizados inicialmente com 50µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) por via subcutânea, seguido por 3 reforços de 25µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo por via intraperitoneal, no intervalo 15 dias entre eles (**oxLDL**). Seguindo o mesmo protocolo de imunização, dois grupos de animais receberam o veículo em antígeno (**FIA**). Para controle foram utilizados animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que não foram tratados com qualquer tipo de imunização (**sem**). Os níveis de anticorpos foram avaliados por ELISA. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*\*\*p<0,0001.



**Figura 15 – Influência do Adjuvante de Freund (FIA) e da imunização com oxLDL nos índices anticorpos IgG<sub>1</sub> anti-oxLDL.** Animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup>, fêmeas e machos foram imunizados inicialmente com 50µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) por via subcutânea, seguido por 3 reforços de 25µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo por via intraperitoneal, no intervalo 15 dias entre eles (**oxLDL**). Seguindo o mesmo protocolo de imunização, dois grupos de animais receberam o veículo em antígeno (**FIA**). Para controle foram utilizados animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que não foram tratados com qualquer tipo de imunização (**sem**). Os níveis de anticorpos foram avaliados por ELISA. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*\*\*p<0,0001.



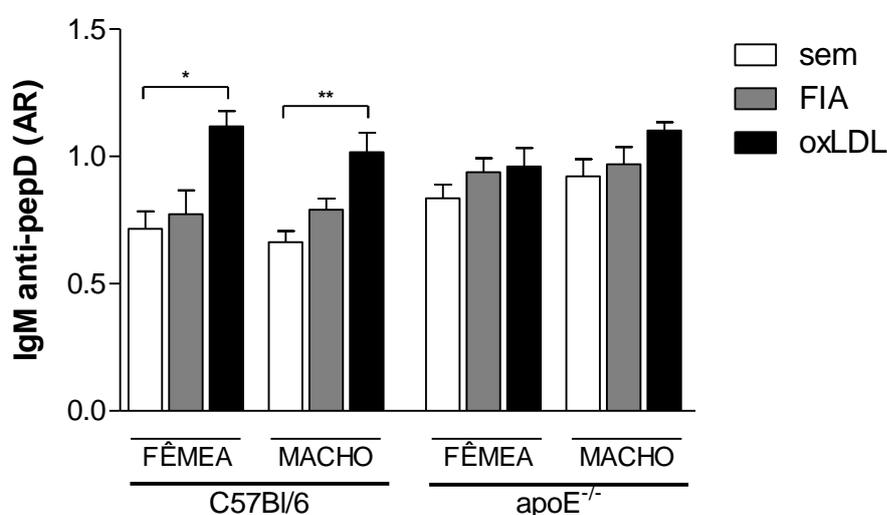
**Figura 16 – Influência do Adjuvante de Freund (FIA) e da imunização com oxLDL nos índices anticorpos IgG<sub>2a</sub> anti-oxLDL.** Animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup>, fêmeas e machos foram imunizados inicialmente com 50µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) por via subcutânea, seguido por 3 reforços de 25µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo por via intraperitoneal, no intervalo 15 dias entre eles (**oxLDL**). Seguindo o mesmo protocolo de imunização, dois grupos de animais receberam o veículo em antígeno (**FIA**). Para controle foram utilizados animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que não foram tratados com qualquer tipo de imunização (**sem**). Os níveis de anticorpos foram avaliados por ELISA. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*\*\*p<0,0001

#### **4.1.3 Perfil de anticorpos anti-pepD**

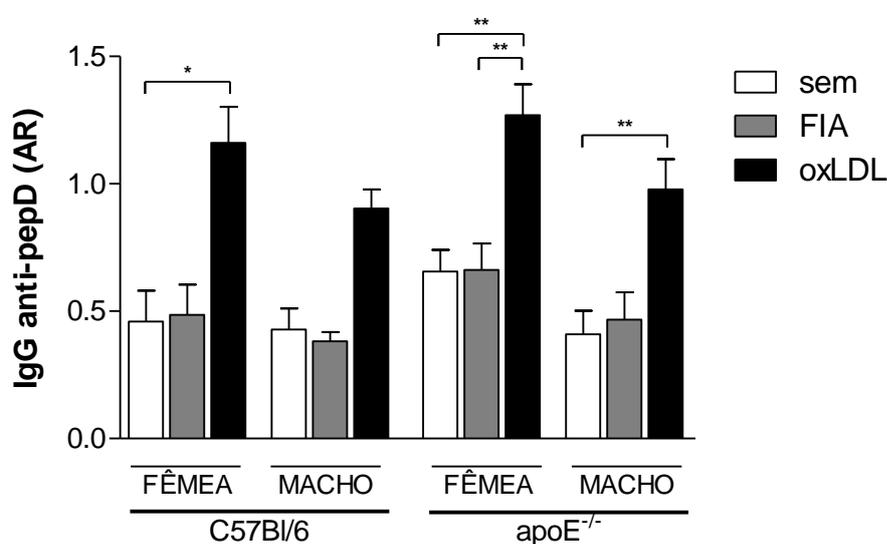
A imunização com oxLDL estimula a produção de anticorpos IgM anti-pepD somente nos animais C57Bl/6 e não nos animais apoE<sup>-/-</sup> (Figura 17), enquanto a produção de anticorpos IgG (Figura 18) e IgG<sub>1</sub> anti-pepD (Figura 19) é estimulada nos dois tipos de animais. Os títulos de anticorpos IgG<sub>2a</sub> anti-pepD não são influenciados pela imunização com oxLDL (Figura 20). O FIA não causa alteração significativa dos títulos de anticorpos anti-pepD das classes e subclasses estudadas (Figuras 17-20).

O gênero e o tipo de animal não interferem nos títulos destes anticorpos (Figuras 17-20).

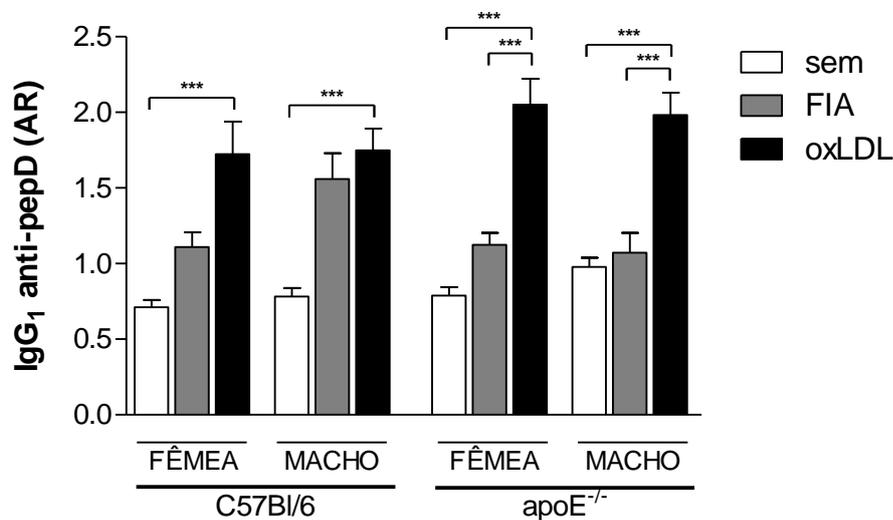
---



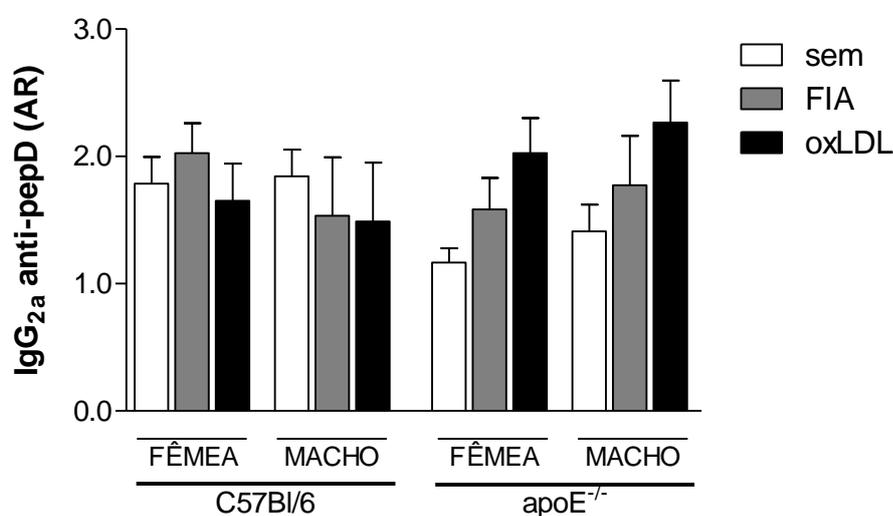
**Figura 17 – Influência do Adjuvante de Freund (FIA) e da imunização com oxLDL nos índices anticorpos IgM anti-pepD.** Animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup>, fêmeas e machos foram imunizados inicialmente com 50µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) por via subcutânea, seguido por 3 reforços de 25µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo por via intraperitoneal, no intervalo 15 dias entre eles (**oxLDL**). Seguindo o mesmo protocolo de imunização, dois grupos de animais receberam o veículo em antígeno (**FIA**). Para controle foram utilizados animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que não foram tratados com qualquer tipo de imunização (**sem**). Os níveis de anticorpos foram avaliados por ELISA. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*p< 0,05 e \*\*p<0,001.



**Figura 18 – Influência do Adjuvante de Freund (FIA) e da imunização com oxLDL nos índices anticorpos IgG anti-pepD.** Animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup>, fêmeas e machos foram imunizados inicialmente com 50µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) por via subcutânea, seguido por 3 reforços de 25µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo por via intraperitoneal, no intervalo 15 dias entre eles (**oxLDL**). Seguindo o mesmo protocolo de imunização, dois grupos de animais receberam o veículo em antígeno (**FIA**). Para controle foram utilizados animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que não foram tratados com qualquer tipo de imunização (**sem**). Os níveis de anticorpos foram avaliados por ELISA. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*p < 0,05 e \*\*p < 0,001.



**Figura 19 – Influência do Adjuvante de Freund (FIA) e da imunização com oxLDL nos índices anticorpos IgG<sub>1</sub> anti-pepD.** Animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup>, fêmeas e machos foram imunizados inicialmente com 50µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) por via subcutânea, seguido por 3 reforços de 25µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo por via intraperitoneal, no intervalo 15 dias entre eles (**oxLDL**). Seguindo o mesmo protocolo de imunização, dois grupos de animais receberam o veículo em antígeno (**FIA**). Para controle foram utilizados animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que não foram tratados com qualquer tipo de imunização (**sem**). Os níveis de anticorpos foram avaliados por ELISA. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*\*\*p<0,0001.

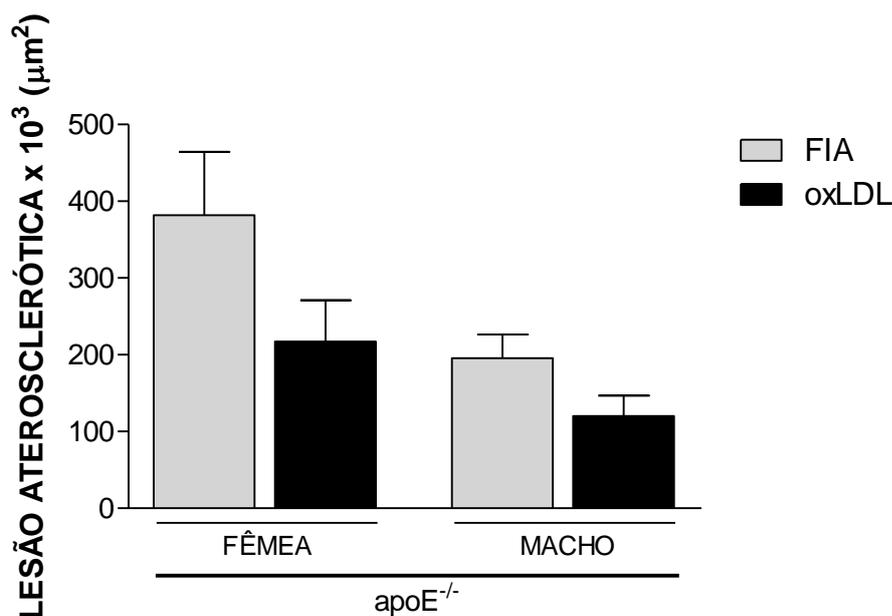


**Figura 20 – Influência do Adjuvante de Freund (FIA) e da imunização com oxLDL nos índices anticorpos IgG<sub>2a</sub> anti-pepD.** Animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup>, fêmeas e machos foram imunizados inicialmente com 50µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) por via subcutânea, seguido por 3 reforços de 25µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo por via intraperitoneal, no intervalo 15 dias entre eles (**oxLDL**). Seguindo o mesmo protocolo de imunização, dois grupos de animais receberam o veículo em antígeno (**FIA**). Para controle foram utilizados animais C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que não foram tratados com qualquer tipo de imunização (**sem**). Os níveis de anticorpos foram avaliados por ELISA. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. ns.

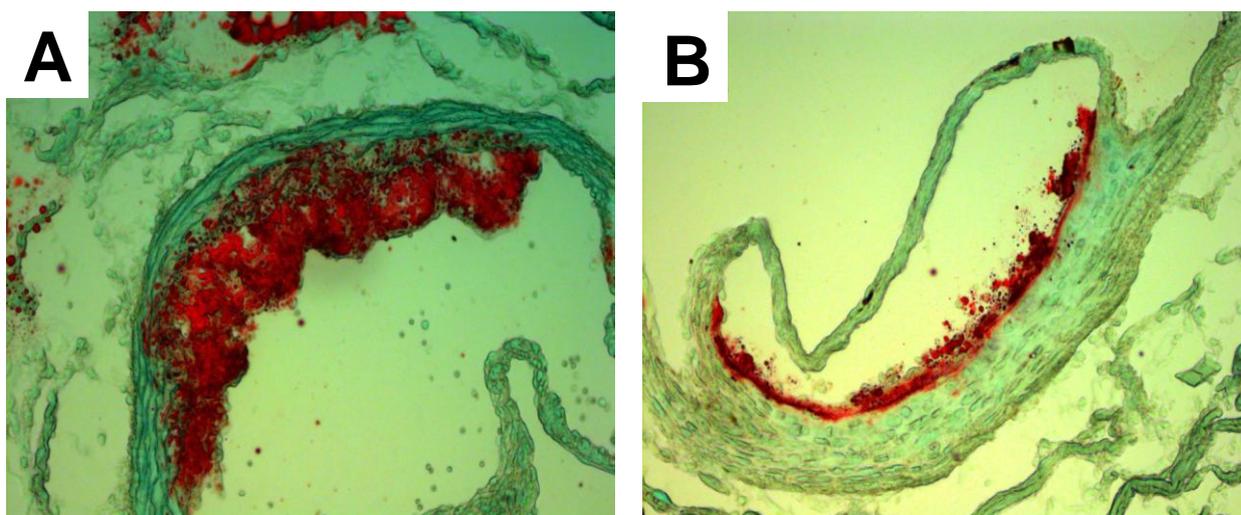
#### 4.1.4 Lesão aterosclerótica

Como os animais C57Bl/6 são resistentes a lesão aterosclerótica, na Figura 21 tem-se os resultados das lesões dos animais apoE<sup>-/-</sup> tratados com FIA e oxLDL. Não foi observada uma diminuição estatisticamente significativa nos apoE<sup>-/-</sup> que receberam oxLDL em relação aos que receberam apenas FIA. Na Figura 22 temos uma foto representativa da lesão aterosclerótica dos camundongos apoE<sup>-/-</sup> que receberam FIA (**A**) ou oxLDL (**B**).

---



**Figura 21 – Influência da imunização com oxLDL na lesão aterosclerótica** Animais  $\text{apoE}^{-/-}$ , fêmeas e machos foram imunizados inicialmente com  $50\mu\text{g/mL}$  de oxLDL em  $100\mu\text{L}$  de veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) por via subcutânea, seguido por 3 reforços de  $25\mu\text{g/mL}$  de oxLDL em  $100\mu\text{L}$  de veículo por via intraperitoneal, no intervalo 15 dias entre eles (**oxLDL**). Seguindo o mesmo protocolo de imunização, dois grupos de animais receberam o veículo em antígeno (**FIA**). A quantificação de lipídeos marcados nas lesões da aorta é realizada através do Image Pro Plus Software (versão 3) para análise de imagens (Media Cybernetics). As áreas de lesões nas aortas são expressas como a soma das áreas presentes em 6 seções seqüenciais, com intervalos de  $10\mu\text{m}$  a  $80\mu\text{m}$ , correspondendo a um comprimento de aorta de  $480\mu\text{m}$ . Os dados da área de lesão são expressos em média  $\pm$  EP ( $\mu\text{m}^2 \times 10^3$ ). Os resultados são expressos pela média  $\pm$  EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. ns.

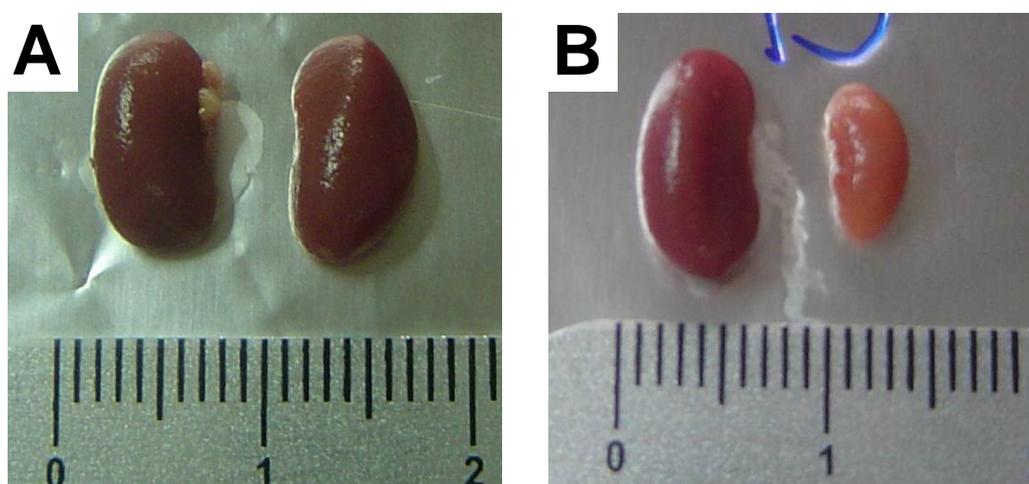


**Figura 22 – Lesão aterosclerótica em animais apoE<sup>-/-</sup>.** Animais apoE<sup>-/-</sup>, fêmeas e machos foram imunizados inicialmente com 50µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) por via subcutânea, seguido por 3 reforços de 25µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo por via intraperitoneal, no intervalo 15 dias entre eles (**oxLDL**). Seguindo o mesmo protocolo de imunização, dois grupos de animais receberam o veículo em antígeno (**FIA**). Coloração por oil red realizada de acordo com a técnica descrita por Paigen et al., 1987. As imagens são representativas dos grupos fêmea FIA (**A**) e macho oxLDL (**B**). **A.** Aumento 20x **B.** Aumento 10x.

#### 4. 2 INFLUÊNCIA DA ISQUEMIA E REPERFUSÃO RENAL UNILATERAL (I/R) EM ANIMAIS C57BL/6 E EM ANIMAIS apoE<sup>-/-</sup> IMUNIZADOS OU NÃO COM oxLDL

Após o sacrifício os rins dos animais foram retirados para a análise de tamanho. Todos os animais que foram submetidos a I/R apresentaram o rim isquemiado menor que o rim contralateral enquanto que os rins dos animais que não foram submetidos a procedimento cirúrgico e os SHAM possuíam tamanhos iguais. Na figura 23 imagens representativas dos rins dos animais SHAM e I/R são apresentadas.

---



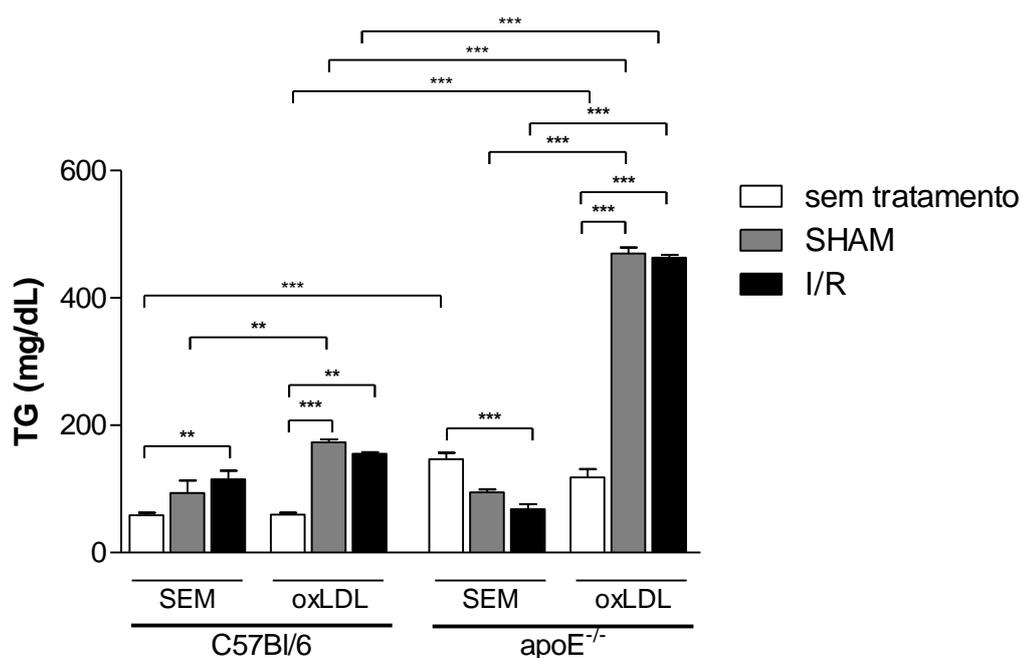
**Figura 23 – Rim de animais isquemiados e de animais sham.** Machos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> foram submetidos a procedimento cirúrgico no qual houve a isquemia renal unilateral por 60 min (I/R). Para controle deste procedimento, outros animais sofreram apenas o procedimento cirúrgico sem que sofressem I/R (SHAM). As imagens são representativas dos grupos SHAM (A) e I/R (B).

#### 4.2.1 Perfil Lipídico

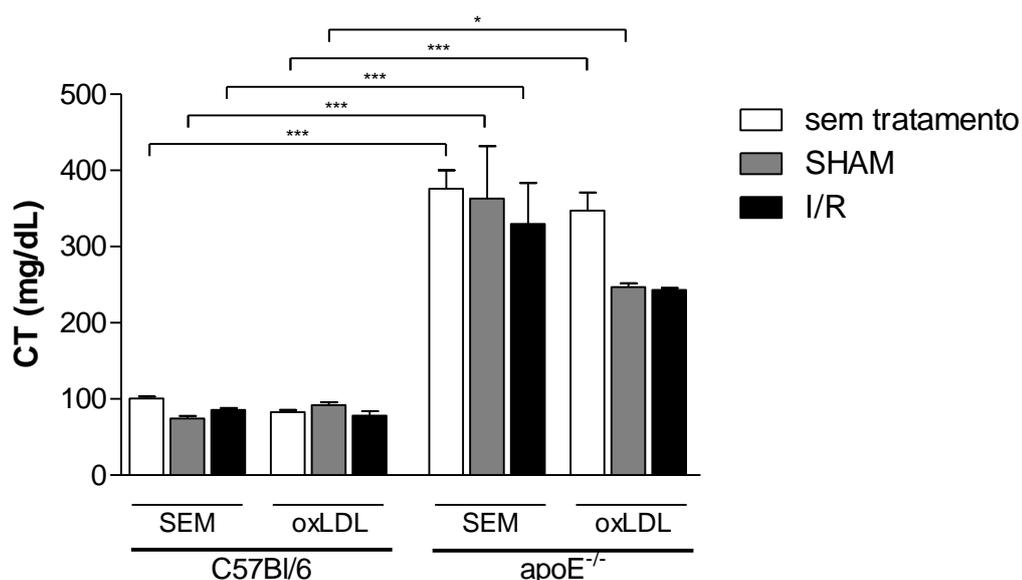
Como visto anteriormente animais apoE<sup>-/-</sup> possuem maiores concentrações sorológicas de TG, CT LDL e VLDL e menores concentrações sorológicas de HDL que camundongos C57Bl/6 (Figuras 24, 25, 27 e 29). A concentração de CT não é influenciada pelo procedimento cirúrgico nem pela I/R (Figura 25). No entanto, o procedimento cirúrgico leva a diminuição da concentração sorológica de HDL em animais C57Bl/6 não imunizados com oxLDL (Figura 26) e diminuição da concentração sorológica de LDL em animais apoE<sup>-/-</sup> imunizados (Figura 27).

Nas Figuras 24 e 28 observa-se que: animais apoE<sup>-/-</sup> tem maiores concentrações de TG e VLDL do que os animais C57Bl/6, a imunização aumenta a concentração desses lípidos em animais C57Bl/6 SHAM e apoE<sup>-/-</sup> SHAM e I/R, o processo cirúrgico causa aumento das concentrações de TG e VLDL nos animais imunizados, enquanto que diminui os níveis desses lípidos nos camundongos apoE<sup>-/-</sup> não imunizados.

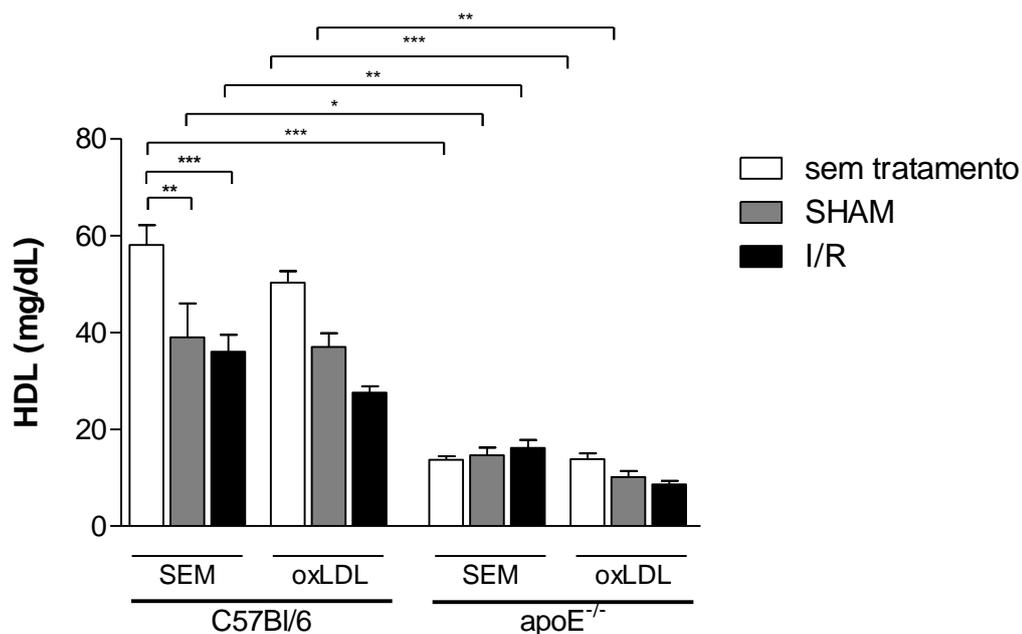
---



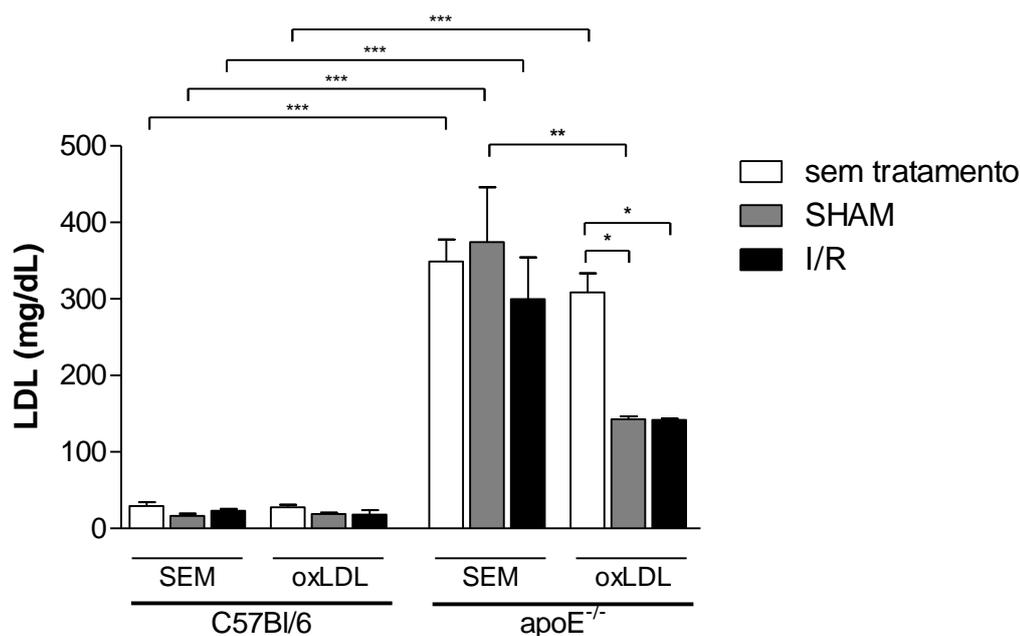
**Figura 24 – Influência da isquemia renal unilateral (I/R) nos índices sorológicos de TG em camundongos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> imunizados ou não com oxLDL.** Machos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que foram imunizados com oxLDL (**oxLDL**) receberam primeiramente uma dose de 50µg/mL de oxLDL em 100 µL veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) subcutaneamente, seguido por 3 reforços de 25 µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo intraperitonealmente, no intervalo 15 dias entre eles. Alguns de animais foram submetidos a procedimento cirúrgico no qual houve a isquemia renal unilateral por 60 min (**I/R**). Para controle deste procedimento, outros animais sofreram apenas a cirurgia sem que sofressem I/R (**SHAM**). Para controle, outros animais não sofreram qualquer procedimento cirúrgico (**SEM TRATAMENTO**). Os animais que não receberam qualquer forma de imunização (**sem**) foram usados apenas como controle. A determinação de TG sorológico foi realizada por kit comercial. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*p<0,05; \*\*p< 0,001 e \*\*\*p<0,0001.



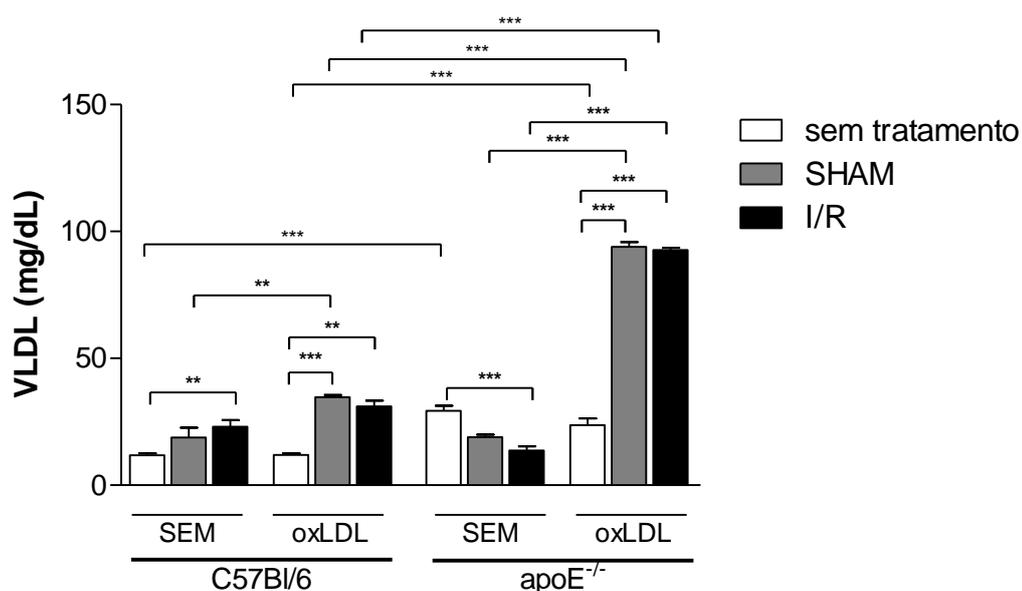
**Figura 25 – Influência da isquemia renal unilateral (I/R) nos índices sorológicos de colesterol total (CT) em camundongos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> imunizados ou não com oxLDL.** Machos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que foram imunizados com oxLDL (oxLDL) receberam primeiramente uma dose de 50µg/mL de oxLDL em 100 µL veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) subcutaneamente, seguido por 3 reforços de 25 µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo intraperitonealmente, no intervalo 15 dias entre eles. Alguns de animais foram submetidos a procedimento cirúrgico no qual houve a isquemia renal unilateral por 60 min (I/R). Para controle deste procedimento, outros animais sofreram apenas a cirurgia sem que sofressem I/R (SHAM). Para controle, outros animais não sofreram qualquer procedimento cirúrgico (SEM TRATAMENTO). Os animais que não receberam qualquer forma de imunização (sem) foram usados apenas como controle. A determinação de CT sorológico foi realizada por kit comercial. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*p<0,05 e \*\*\*p<0,0001.



**Figura 26 – Influência da isquemia renal unilateral (I/R) nos índices sorológicos de HDL em camundongos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> imunizados ou não com oxLDL.** Machos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que foram imunizados com oxLDL (**oxLDL**) receberam primeiramente uma dose de 50µg/mL de oxLDL em 100 µL veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) subcutaneamente, seguido por 3 reforços de 25 µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo intraperitonealmente, no intervalo 15 dias entre eles. Alguns de animais foram submetidos a procedimento cirúrgico no qual houve a isquemia renal unilateral por 60 min (**I/R**). Para controle deste procedimento, outros animais sofreram apenas a cirurgia sem que sofressem I/R (**SHAM**). Para controle, outros animais não sofreram qualquer procedimento cirúrgico (**SEM TRATAMENTO**). Os animais que não receberam qualquer forma de imunização (**sem**) foram usados apenas como controle. A determinação de HDL sorológico foi realizada por kit comercial. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*p<0,05; \*\*p< 0,001 e \*\*\*p<0,0001.



**Figura 27 – Influência da isquemia renal unilateral (I/R) nos índices sorológicos de LDL em camundongos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> imunizados ou não com oxLDL.** Machos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que foram imunizados com oxLDL (**oxLDL**) receberam primeiramente uma dose de 50µg/mL de oxLDL em 100 µL veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) subcutaneamente, seguido por 3 reforços de 25 µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo intraperitonealmente, no intervalo 15 dias entre eles. Alguns de animais foram submetidos a procedimento cirúrgico no qual houve a isquemia renal unilateral por 60 min (**I/R**). Para controle deste procedimento, outros animais sofreram apenas a cirurgia sem que sofressem I/R (**SHAM**). Para controle, outros animais não sofreram qualquer procedimento cirúrgico (**SEM TRATAMENTO**). Os animais que não receberam qualquer forma de imunização (**sem**) foram usados apenas como controle. Os valores de LDL foram obtidos através da Equação de Friedewald. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*p<0,05; \*\*p< 0,001 e \*\*\*p<0,0001.

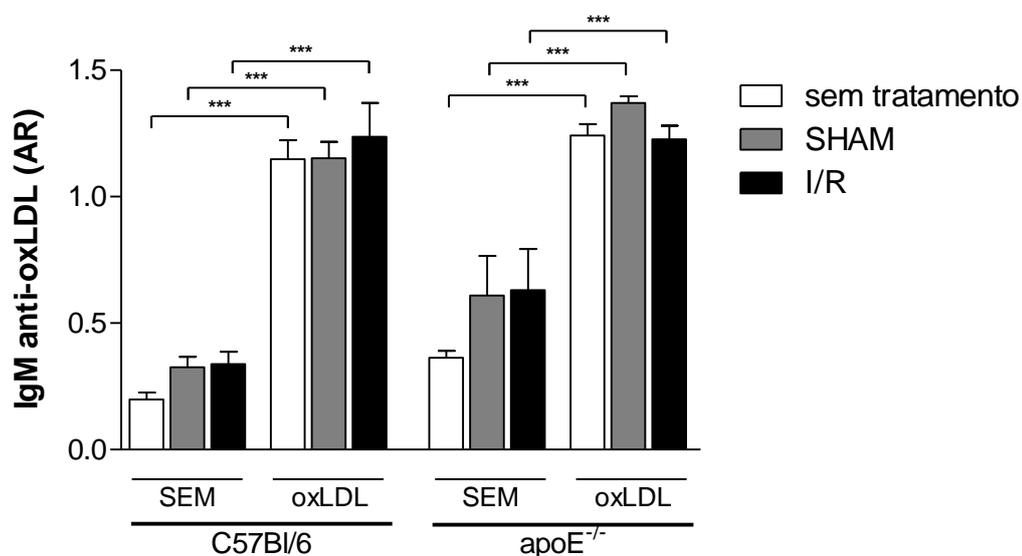


**Figura 28 – Influência da isquemia renal unilateral (I/R) nos índices sorológicos de VLDL em camundongos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> imunizados ou não com oxLDL.** Machos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que foram imunizados com oxLDL (**oxLDL**) receberam primeiramente uma dose de 50µg/mL de oxLDL em 100 µL veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) subcutaneamente, seguido por 3 reforços de 25 µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo intraperitonealmente, no intervalo 15 dias entre eles. Alguns de animais foram submetidos a procedimento cirúrgico no qual houve a isquemia renal unilateral por 60 min (**I/R**). Para controle deste procedimento, outros animais sofreram apenas a cirurgia sem que sofressem I/R (**SHAM**). Para controle, outros animais não sofreram qualquer procedimento cirúrgico (**SEM TRATAMENTO**). Os animais que não receberam qualquer forma de imunização (**sem**) foram usados apenas como controle. Os valores de VLDL foram calculados. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*\*p< 0,001 e \*\*\*p<0,0001.

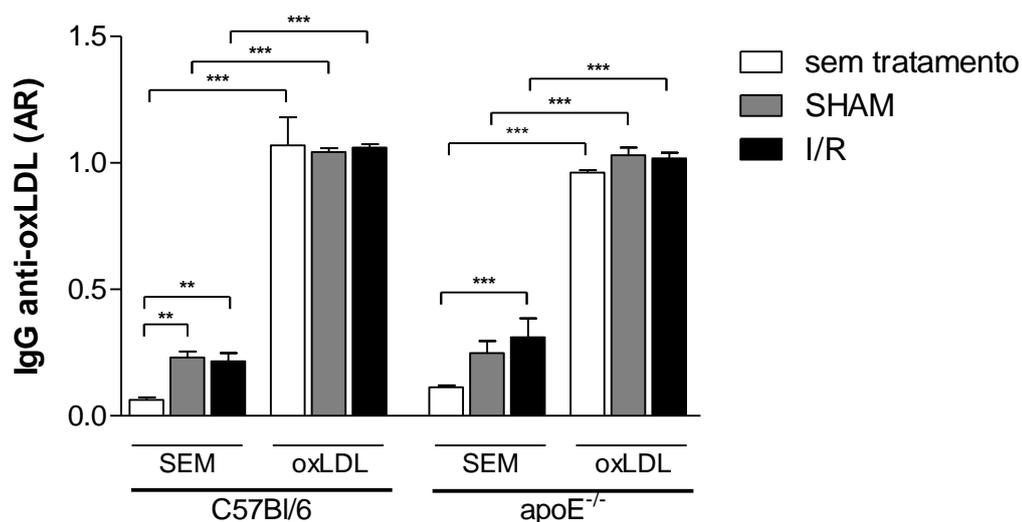
#### **4.2.2 Perfil de Anticorpos anti-oxLDL**

Como relatado anteriormente a imunização com oxLDL aumenta os títulos de anticorpos IgM, IgG, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2a</sub> (Figuras 29-32). No entanto, o ato cirúrgico não influencia os títulos dos anticorpos IgM, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2a</sub> anti-oxLDL. (Figuras 29, 31 e 32) O título de anticorpos IgG anti-oxLDL aumenta após a I/R nos animais sem imunização, contudo, nos animais C57Bl/6 esse aumento também foi observado nos animais SHAM.

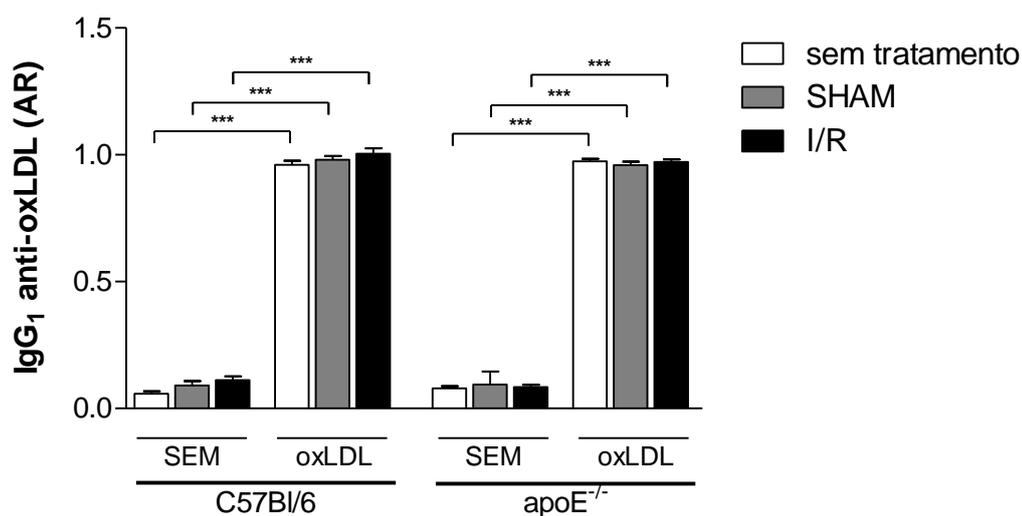
---



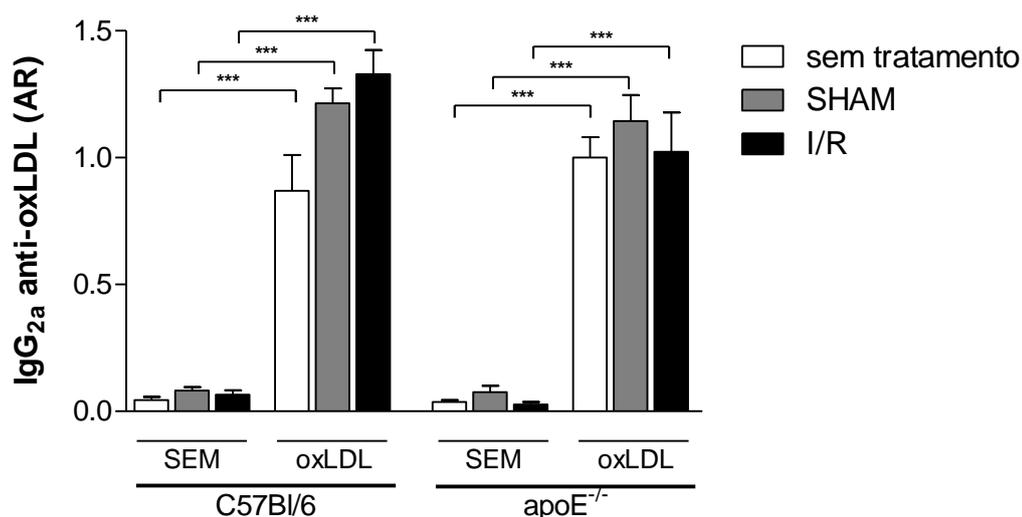
**Figura 29 – Influência da isquemia renal unilateral (I/R) nos índices de anticorpos IgM anti-oxLDL em camundongos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> imunizados ou não com oxLDL.** Machos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que foram imunizados com oxLDL (oxLDL) receberam primeiramente uma dose de 50µg/mL de oxLDL em 100 µL veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) subcutaneamente, seguido por 3 reforços de 25 µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo intraperitonealmente, no intervalo 15 dias entre eles. Alguns de animais foram submetidos a procedimento cirúrgico no qual houve a isquemia renal unilateral por 60 min (I/R). Para controle deste procedimento, outros animais sofreram apenas a cirurgia sem que sofressem I/R (SHAM). Para controle, outros animais não sofreram qualquer procedimento cirúrgico (SEM TRATAMENTO). Os animais que não receberam qualquer forma de imunização (sem) foram usados apenas como controle. Os níveis de anticorpos foram avaliados por ELISA. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*\*\*p<0,0001.



**Figura 30 – Influência da isquemia renal unilateral (I/R) nos índices de anticorpos IgG anti-oxLDL em camundongos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> imunizados ou não com oxLDL.** Machos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que foram imunizados com oxLDL (oxLDL) receberam primeiramente uma dose de 50µg/mL de oxLDL em 100 µL veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) subcutaneamente, seguido por 3 reforços de 25 µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo intraperitonealmente, no intervalo 15 dias entre eles. Alguns de animais foram submetidos a procedimento cirúrgico no qual houve a isquemia renal unilateral por 60 min (I/R). Para controle deste procedimento, outros animais sofreram apenas a cirurgia sem que sofressem I/R (SHAM). Para controle, outros animais não sofreram qualquer procedimento cirúrgico (SEM TRATAMENTO). Os animais que não receberam qualquer forma de imunização (sem) foram usados apenas como controle. Os níveis de anticorpos foram avaliados por ELISA. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*\*p<0,001 e \*\*\*p<0,0001.



**Figura 31 – Influência da isquemia renal unilateral (I/R) nos índices de anticorpos IgG<sub>1</sub> anti-oxLDL em camundongos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> imunizados ou não com oxLDL.** Machos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que foram imunizados com oxLDL (oxLDL) receberam primeiramente uma dose de 50µg/mL de oxLDL em 100 µL veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) subcutaneamente, seguido por 3 reforços de 25 µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo intraperitonealmente, no intervalo 15 dias entre eles. Alguns de animais foram submetidos a procedimento cirúrgico no qual houve a isquemia renal unilateral por 60 min (I/R). Para controle deste procedimento, outros animais sofreram apenas a cirurgia sem que sofressem I/R (SHAM). Para controle, outros animais não sofreram qualquer procedimento cirúrgico (SEM TRATAMENTO). Os animais que não receberam qualquer forma de imunização (sem) foram usados apenas como controle. Os níveis de anticorpos foram avaliados por ELISA. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*\*\*p<0,0001.

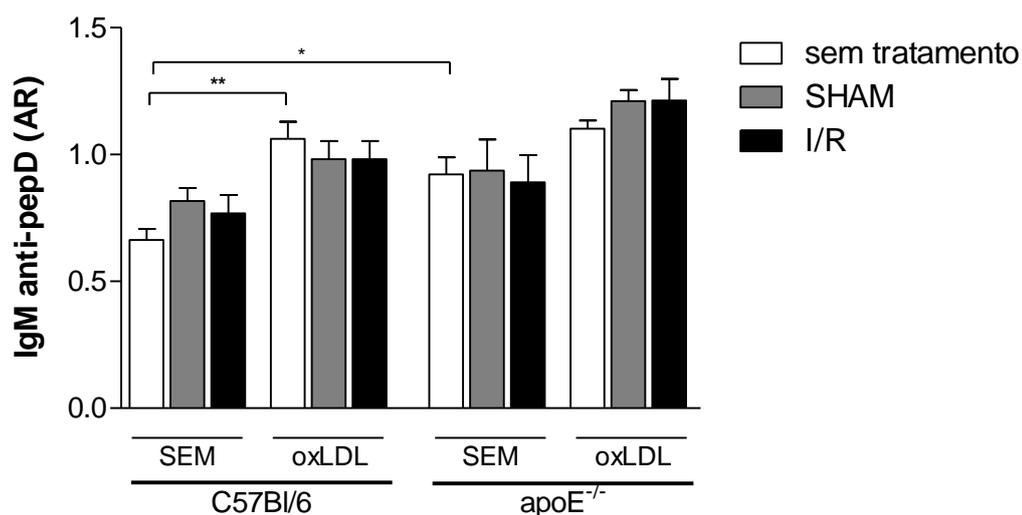


**Figura 32 – Influência da isquemia renal unilateral (I/R) nos índices de anticorpos IgG<sub>2a</sub> anti-oxLDL em camundongos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> imunizados ou não com oxLDL.** Machos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que foram imunizados com oxLDL (oxLDL) receberam primeiramente uma dose de 50µg/mL de oxLDL em 100 µL veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) subcutaneamente, seguido por 3 reforços de 25 µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo intraperitonealmente, no intervalo 15 dias entre eles. Alguns de animais foram submetidos a procedimento cirúrgico no qual houve a isquemia renal unilateral por 60 min (I/R). Para controle deste procedimento, outros animais sofreram apenas a cirurgia sem que sofressem I/R (SHAM). Para controle, outros animais não sofreram qualquer procedimento cirúrgico (SEM TRATAMENTO). Os animais que não receberam qualquer forma de imunização (sem) foram usados apenas como controle. Os níveis de anticorpos foram avaliados por ELISA. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*\*\*p<0,0001.

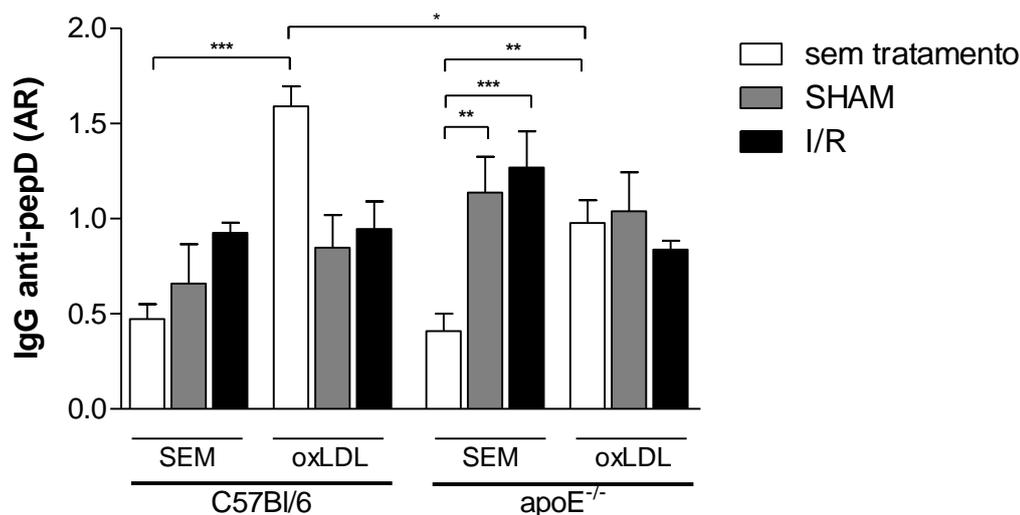
#### **4.2.3 Perfil de anticorpos anti-pepD**

Nas Figuras 33-35, verifica-se que a imunização com oxLDL estimula a produção de anticorpos IgM, IgG e IgG<sub>1</sub> anti-pepD, porém não estimula a produção de anticorpos anti-pepD da subclasse IgG<sub>2a</sub>. Em camundongos apoE<sup>-/-</sup> não imunizados com oxLDL o ato cirúrgico promove o aumento de anticorpos IgG anti-pepD (Figura 34) e diminuição dos anticorpos IgG<sub>2a</sub> (Figura 36), independente da I/R.

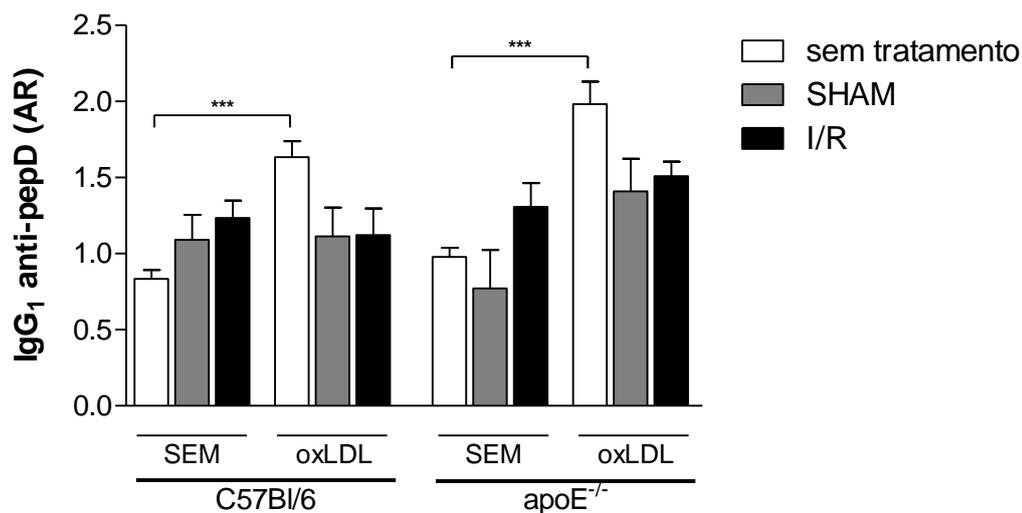
---



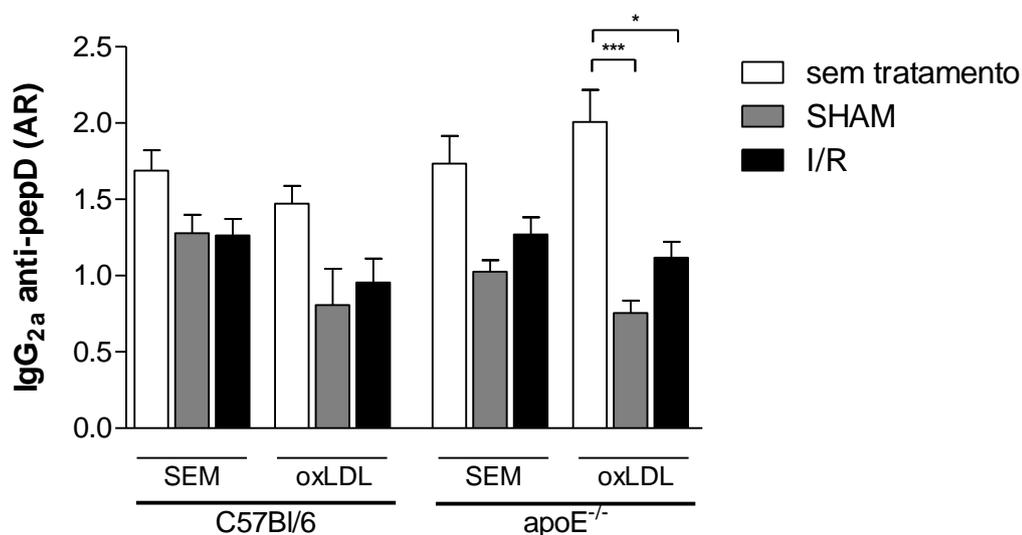
**Figura 33 – Influência da isquemia renal unilateral (I/R) nos índices de anticorpos IgM anti-pepD em camundongos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> imunizados ou não com oxLDL.** Machos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que foram imunizados com oxLDL (**oxLDL**) receberam primeiramente uma dose de 50µg/mL de oxLDL em 100 µL veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) subcutaneamente, seguido por 3 reforços de 25 µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo intraperitonealmente, no intervalo 15 dias entre eles. Alguns de animais foram submetidos a procedimento cirúrgico no qual houve a isquemia renal unilateral por 60 min (**I/R**). Para controle deste procedimento, outros animais sofreram apenas a cirurgia sem que sofressem I/R (**SHAM**). Para controle, outros animais não sofreram qualquer procedimento cirúrgico (**SEM TRATAMENTO**). Os animais que não receberam qualquer forma de imunização (**sem**) foram usados apenas como controle. Os níveis de anticorpos foram avaliados por ELISA. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*\*\*p<0,0001.



**Figura 34 – Influência da isquemia renal unilateral (I/R) nos índices de anticorpos IgG anti-pepD em camundongos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> imunizados ou não com oxLDL.** Machos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que foram imunizados com oxLDL (oxLDL) receberam primeiramente uma dose de 50µg/mL de oxLDL em 100 µL veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) subcutaneamente, seguido por 3 reforços de 25 µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo intraperitonealmente, no intervalo 15 dias entre eles. Alguns de animais foram submetidos a procedimento cirúrgico no qual houve a isquemia renal unilateral por 60 min (I/R). Para controle deste procedimento, outros animais sofreram apenas a cirurgia sem que sofressem I/R (SHAM). Para controle, outros animais não sofreram qualquer procedimento cirúrgico (SEM TRATAMENTO). Os animais que não receberam qualquer forma de imunização (sem) foram usados apenas como controle. Os níveis de anticorpos foram avaliados por ELISA. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*p<0,05, \*\*p<0,001 e\*\*\* p< 0,0001.



**Figura 35 – Influência da isquemia renal unilateral (I/R) nos índices de anticorpos IgG<sub>1</sub> anti-pepD em camundongos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> imunizados ou não com oxLDL.** Machos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que foram imunizados com oxLDL (**oxLDL**) receberam primeiramente uma dose de 50µg/mL de oxLDL em 100 µL veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) subcutaneamente, seguido por 3 reforços de 25 µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo intraperitonealmente, no intervalo 15 dias entre eles. Alguns de animais foram submetidos a procedimento cirúrgico no qual houve a isquemia renal unilateral por 60 min (**I/R**). Para controle deste procedimento, outros animais sofreram apenas a cirurgia sem que sofressem I/R (**SHAM**). Para controle, outros animais não sofreram qualquer procedimento cirúrgico (**SEM TRATAMENTO**). Os animais que não receberam qualquer forma de imunização (**sem**) foram usados apenas como controle. Os níveis de anticorpos foram avaliados por ELISA. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*\*\* p< 0,0001.

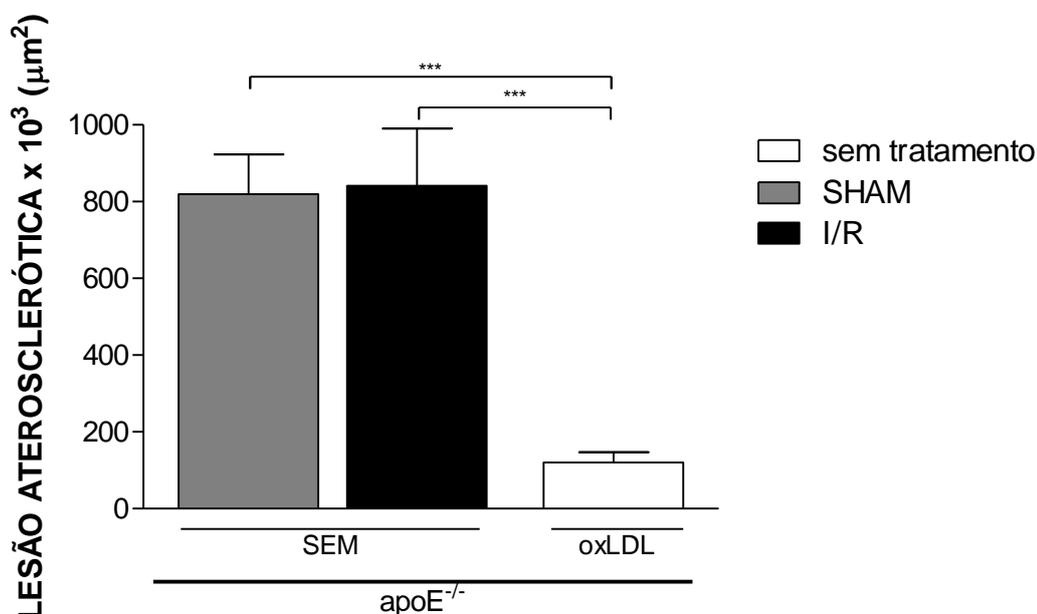


**Figura 36 – Influência da isquemia renal unilateral (I/R) nos índices de anticorpos IgG<sub>2a</sub> anti-pepD em camundongos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> imunizados ou não com oxLDL.** Machos C57Bl/6 e apoE<sup>-/-</sup> que foram imunizados com oxLDL (oxLDL) receberam primeiramente uma dose de 50µg/mL de oxLDL em 100 µL veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) subcutaneamente, seguido por 3 reforços de 25 µg/mL de oxLDL em 100 µL de veículo intraperitonealmente, no intervalo 15 dias entre eles. Alguns de animais foram submetidos a procedimento cirúrgico no qual houve a isquemia renal unilateral por 60 min (I/R). Para controle deste procedimento, outros animais sofreram apenas a cirurgia sem que sofressem I/R (SHAM). Para controle, outros animais não sofreram qualquer procedimento cirúrgico (SEM TRATAMENTO). Os animais que não receberam qualquer forma de imunização (sem) foram usados apenas como controle. Os níveis de anticorpos foram avaliados por ELISA. Os resultados são expressos pela média ± EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. \*\*\* p < 0,0001.

#### **4.2.4 Lesão aterosclerótica**

Na Figura 37 são apresentadas as médias das lesões ateroscleróticas dos animais apoE<sup>-/-</sup> que sofreram I/R sem prévia imunização e dos camundongos que receberam oxLDL sem tratamento cirúrgico posterior. Como pode ser observado nessa figura a I/R não interfere no tamanho da lesão aterosclerótica em comparação com os animais SHAM.

---



**Figura 37 – Influência da imunização com oxLDL na lesão aterosclerótica** Animais  $\text{apoE}^{-/-}$ , fêmeas e machos foram imunizados inicialmente com  $50\mu\text{g/mL}$  de oxLDL em  $100\mu\text{L}$  de veículo (adjuvante de Freund incompleto – FIA – emulsificado com PBS) por via subcutânea, seguido por 3 reforços de  $25\mu\text{g/mL}$  de oxLDL em  $100\mu\text{L}$  de veículo por via intraperitoneal, no intervalo 15 dias entre eles (**oxLDL**). Seguindo o mesmo protocolo de imunização, dois grupos de animais receberam o veículo em antígeno (**FIA**). Alguns de animais foram submetidos a procedimento cirúrgico no qual houve a isquemia renal unilateral por 60 min (**I/R**). Para controle deste procedimento, outros animais sofreram apenas a cirurgia sem que sofressem I/R (**SHAM**). Para controle, outros animais não sofreram qualquer procedimento cirúrgico (**SEM TRATAMENTO**). A quantificação de lipídeos marcados nas lesões da aorta é realizada através do Image Pro Plus Software (versão 3) para análise de imagens (Media Cybernetics). As áreas de lesões nas aortas são expressas como a soma das áreas presentes em 6 secções seqüenciais, com intervalos de  $10\mu\text{m}$  a  $80\mu\text{m}$ , correspondendo a um comprimento de aorta de  $480\mu\text{m}$ . Os dados da área de lesão são expressos em média  $\pm$  EP ( $\mu\text{m}^2 \times 10^3$ ). Os resultados são expressos pela média  $\pm$  EP dos grupos de 6-8 animais. ANOVA e pós-teste de Tukey. ns.

---

---

# 5 DISCUSSÃO

---

---

---

A aterosclerose é uma doença de etiologia multifatorial e os mecanismos implicados em sua gênese ainda não são completamente esclarecidos, tornando, dessa forma, a sua terapêutica bastante complexa. Diversos estudos mostram a participação do sistema imune na progressão dessa patologia. (LUSIS, 2000). Nesse contexto, muitos grupos de pesquisa têm trabalhado com a manipulação do sistema imune a fim de se obter respostas a respeito de seu mecanismo bem como obter possíveis alvos para tratamento dessa patologia. (HULTHE et al., 2001; SHOJI et al., 2000).

A apoE é uma apo que atua como ligante para receptores de LDL e para receptores de quilomicrons remanescentes. A deficiência de apoE causa uma ineficiente remoção de quilomícrons e de IDL da circulação, resultando em hipercolesterolemia. Camundongo apoE<sup>-/-</sup> é um modelo de aterosclerose e hiperlipidemia amplamente citado na literatura (PORTUGAL et al., 2004; PELUZIO et al., 2003; PELUZIO et al., 2001). Eles desenvolvem lesões ateroscleróticas similares às humanas, progredindo de estrias gordurosas a placas fibro-gordurosas e a lesões avançadas (PIEDRAHITA et al., 1992; PLUMP et al., 1992). Escolhemos este modelo experimental por desenvolver lesões ateroscleróticas espontaneamente sem a necessidade de dieta rica em colesterol (BRESLOW, et al., 1996).

Uma das características desse modelo são altas concentrações de VLDL. Por isso, um dos parâmetros avaliados neste estudo foi o perfil lipídico. Confirmando esses dados da literatura, em nosso estudo, os animais apoE<sup>-/-</sup> apresentaram maiores níveis de TG, CT, LDL e VLDL e menores concentrações de HDL em relação aos índices dos animais C57Bl/6.

As diferenças na manifestação de doenças cardiovasculares relacionada ao gênero estão bem estabelecidas em humanos (CANTO et al., 2007; SHAW et al., 2006). Em animais, Korstanje et al. (2004) mostraram que a diferença entre os gêneros afeta os níveis de HDL. Nossos dados mostram que o gênero interfere não apenas nas concentrações de HDL, mas também nas de TG, CT e VLDL, entretanto não afeta os níveis de LDL. Paigen et al. (1987) demonstraram que em modelo experimental de aterosclerose, especialmente em animais de *background* C57Bl/6, as fêmeas desenvolvem mais lesões ateroscleróticas que os machos. Todavia, nossos dados não apresentaram diferença estatística entre as lesões de fêmeas e machos.

---

---

Os adjuvantes atuam de diversas maneiras durante a imunização. Uma delas é modular a resposta imune, deslocando-a para os diferentes tipos de resposta. Além disso, como muitas doenças inflamatórias, o balanço entre a resposta Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub> influencia a progressão da aterosclerose. Baseando-se nessa premissa, alguns grupos tem estudado o efeito dos adjuvantes na imunização contra a aterosclerose. Dados na literatura sugerem que o uso de FIA pode deslocar a resposta imune para um perfil Th<sub>2</sub> (NILSSON; HANSSON; SHAH, 2005) e, conseqüentemente, levar a efeito ateroprotetor (KHALLOU-LASCHET et al., 2006), visto que a aterosclerose tem uma resposta, predominantemente, de perfil Th<sub>1</sub>.

O balanço de citocinas Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> interfere na subclasse de anticorpo a ser formado. Assim, quando esse balanço pende para a resposta Th<sub>2</sub>, a produção da subclasse IgG<sub>1</sub> deve aumentar. No entanto, não observamos aumento de nenhuma das classe de anticorpos específicos para oxLDL ou para pepD ao estimularmos os animais apenas com FIA.

A presença de diversos antígenos na placa aterosclerótica que compartilham epítomos com (MDA)-LDL, MDA-VLDL e cardiopina oxidada, levam muitos grupos a estudarem os efeitos anti-aterogênicos da imunização com tais antígenos. Levandonos a crer que o aumento de anticorpos anti-oxLDL é o responsável por este efeito (ZHOU et al., 2001; GEORGE et al., 1998, FREIGANG et al., 1998).

Gidlund et al. (1996) demonstram que os auto-anticorpos contra mLDL reagem não apenas contra antígenos de natureza lipídica, mas também contra a parte protéica da LDL, sugerindo uma importante resposta imune humoral contra a apoB.

Em nosso laboratório, estudamos a presença de anticorpos contra um peptídeo derivado da apoB, o pepD. Acreditamos que na LDL ele esteja na parte interna e ao ser oxidada este peptídeo seja exposto. Sabemos que o pepD é imunodominante além de promiscuo e xenoreativo, pois reage com anticorpos de camundongo com vários haplótipos (CAZITA et al., 2003), humano (MANGUEIRA et al., 2003; MEDEIROS et al., 2004; UINT et al., 2004) e também de vaca (GIDLUND et al., 2004). Esses trabalhos sugerem ainda que anticorpos anti-pepD são naturalmente formados.

Outro foco de investigação tem sido a caracterização das classes e subclasses dos anticorpos envolvidos na aterosclerose.

Como em muitas doenças inflamatórias o balanço entre a resposta Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub> influencia a progressão da aterosclerose bem como nas subclasses de

---

---

anticorpos contra os antígenos específicos da doença. Na aterosclerose encontramos citocinas que promovem uma resposta, predominantemente, do tipo Th<sub>1</sub>. Não obstante, quando se analisa as subclasses de IgG anti-oxLDL em modelos murinos tipicamente Th<sub>1</sub> (C57Bl/6) a subclasse IgG<sub>2a</sub> apresenta título maior que a subclasse IgG<sub>1</sub> (SCHULTE et al., 2008).

Baseados neste contexto analisamos o perfil de anticorpos anti-oxLDL e anti-pepD. Os anticorpos IgM e IgG específicos para oxLDL aumentaram com a imunização. O FIA *per se* pode causar o aumento de anticorpos IgM anti-oxLDL apenas em camundongos apoE<sup>-/-</sup>, sugerindo que o adjuvante apenas esteja reforçando a resposta imune primária.

No atual estudo observamos que a imunização com não estimula aumento de IgM nos animais apoE<sup>-/-</sup>, o que nos leva a crer que estes animais já terem tido contato com este antígeno, e devam ter naturalmente oxLDL.

Os anticorpos IgG contra esse antígeno é estimulada com a imunização, bem como a produção das subclasses IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2a</sub>.

Todavia, a produção de anticorpos IgM anti-pepD é estimulada apenas nos animais C57Bl/6. Este dado reforça a nossa hipótese de que os animais apoE<sup>-/-</sup> já possuam oxLDL e, portanto, a resposta a este antígeno não deva se tratar de uma resposta primária, diferentemente dos animais C57Bl/6.

Ao analisarmos as subclasses de IgG anti-pepD temos que somente a produção de IgG<sub>1</sub> foi estimulada com a imunização com oxLDL. Uma possível explicação para isso é o fato de o FIA estimular o sistema imune para uma resposta tipo Th1, e, por conseguinte, estimular a produção desta subclasse. Esses anticorpos podem ter efeito ateroprotetor. Não obstante, não conseguimos comprovar esse efeito pois o número amostral para o experimento de avaliação da lesão aterosclerótica não foi suficiente.

Essa diferença de estímulo da produção das subclasses de IgG anti-oxLDL e anti-pepD pode ser explicada pelo fato de a oxLDL ser um *pool* de diferentes antígenos, enquanto que o pepD se trata de um único antígeno.

Muitas evidências se têm do efeito da aterosclerose na função renal (MEYRIER et al., 1998; TEXTOR, 2004; BAGGIO et al., 2001) bem como da doença renal na aterogênese (SIEMS et al., 2002). A fim de se estudar a interação entre essas doenças, lançamos mão do uso de camundongos apoE<sup>-/-</sup>

---

---

(modelo experimental para aterosclerose) e do modelo de isquemia e reperfusão renal unilateral (modelo de doença renal crônica).

Sabe-se que o retorno do fluxo sanguíneo renal após a lesão de isquemia leva a um desencadeamento de eventos inflamatórios (MOLITORIS, 1991) com conseqüente secreção de citocinas pro-inflamatórias.

Dentre estas citocinas destacamos a IL-6, pois induz a produção de proteínas de fase aguda no fígado (HEINRICH et al., 1990). A IL-6 pode afetar o clearance e/ou a produção de triacilgliceróis e, portanto, induzir hipertrigliceridemia (FEINGOLD; GRUNFELD 1992; NONOGAKI et al., 1995). Isto sustenta nosso achado: animais submetidos a I/R apresentaram maiores concentrações de TG do que os animais que não sofreram processo cirúrgico.

Durante o processo inflamatório renal ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (MOLITORIS, 1991). Essas espécies podem contribuir para o desenvolvimento de uma série de complicações como múltiplas disfunções orgânicas ou ateroscleroses (TEXTOR, 2004; PARKE et al., 2003).

Geralmente durante o estresse oxidativo há, nas paredes dos vasos, formação de oxLDL (HÖRKKÖ et al., 2000; SHOENFELD et al., 2000). Alguns estudos têm mostrado a presença de oxLDL no tecido renal após isquemia usando técnica de imunofluorescência (KULAH et al., 2007). Essas evidências do aumento de oxLDL após o processo de isquemia levam-nos a inferir que ocorra aumento da oxLDL plasmática e, conseqüentemente, aumento do título dos anticorpos anti-oxLDL. Não obstante, esse aumento de oxLDL deve ser suficiente para induzir a formação de anticorpos da classe IgG em animais que sofreram I/R. Em animais imunizados não se pode observar essa influência da I/R pois a imunização produz um maior estímulo da produção de IgG anti-oxLDL. Nos animais apoE<sup>-/-</sup>, por possuírem maiores concentrações de LDL, o processo inflamatório decorrente do procedimento cirúrgico oxida maior quantidade de LDL, aumentando a quantidade de pepD e, conseqüentemente, de anticorpos IgG anti-pepD.

---

---

---

## **6 CONCLUSÃO**

---

---

Muito se especula a respeito dos anticorpos na aterosclerose. Sugere-se que seu efeito ateroprotetor deve-se principalmente a classe ou subclasse a qual ele pertence (SCHIOPU et al., 2004).

Concluimos que a imunização com oxLDL aumenta as classes e subclasses dos anticorpos anti-oxLDL estudadas, porém aumenta apenas os anticorpos IgG e IgG<sub>1</sub> anti-pepD. Por termos tido um pequeno número de animais para análise das lesões ateroscleróticas não podemos dizer qual a correlação destes anticorpos com a aterogênese.

Além disso, concluimos também, que a I/R pode agravar os fatores promotores da aterosclerose, sendo que a imunização com oxLDL não é capaz de reverter estes efeitos pro-aterogênicos.

---

---

---

# REFERÊNCIAS

---

---

---

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Saúde Brasil 2007: Uma análise da Situação de Saúde: Perfil de Mortalidade do Brasileiro.** Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/coletiva\\_saude\\_061008.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/coletiva_saude_061008.pdf). 5 jan. 2010.

ALLAIN, C. C.; POON, L. S.; CHAN, C. S.; RICHMOND, W.; FU, P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clin. Chem.**, v. 20, n. 4, p. 470-475, 1974.

AMENTO, E. P.; EHSANI, N.; PALMER, H.; LIBBY, P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. **Arterioscler. Thromb.**, v. 11, n. 5, p. 1223-1230, 1991.

ANDERSON, K. M.; CASTELLI, W. P.; LEVY, D. Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the Framingham study. **JAMA**, v. 257, n. 16, p. 2176-2180, 1987.

ASCER, E.; BERTOLAMI, M. C.; VENTURINELLI, M. L.; BUCCHERI, V.; SOUZA, J.; NICOLAU, J. C.; RAMIRES, J. A.; SERRANO, C. V. JR. Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. **Atherosclerosis**, v.177, n. 1, p. 161-166, 2004.

BACHEM, M. G.; WENDELIN, D.; SCHNEIDERHAN, W.; HAUG, C.; ZORN, U.; GROSS, H. J.; SCHMID-KOTSAS, A.; GRÜNERT, A. Depending on their concentration oxidized low density lipoproteins stimulate extracellular matrix synthesis or induce apoptosis in human coronary artery smooth muscle cells. **Clin. Chem. Lab. Med.** v. 37, n. 3, p. 319-326, 1999.

BAGGIO, B.; BUDAKOVIC, A.; CASARA, D.; GAMBARO, G.; SALADINI, G.; PICCOLI, A.; VERLATO, F. Renal involvement in subjects with peripheral atherosclerosis. **J. Nephrol.**, v. 14, n. 4, p. 286–292, 2001.

BARRETO, S. M., PASSOS, V. M.; CARDOSO, A. R.; LIMA-COSTA, M. F. Quantifying the risk of coronary artery disease in a community: the Bambui project. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 81, n. 8, p. 556-561, 2003.

BERLINER, J. A.; TERRITO, M. C.; SEVANIAN, A.; RAMIN, S.; KIM, J. A.; BAMSHAD, B.; ESTERSON, M.; FOGELMAN, A. M. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. **J. Clin. Invest.**, v. 85, n. 4, p. 1260-1266, 1990.

BINDER, C. J.; CHANG, M. K.; SHAW, P. X.; MILLER, Y. I.; HARTVIGSEN, K; DEWAN, A; WITZTUM, J. L. Innate and acquired immunity in atherogenesis. **Nat. Med.**, v. 8, n. 11, p. 1218-1226, 2002.

---

BINDER, C. J.; HÖRKKÖ, S.; DEWAN, A.; CHANG, M. K.; KIEU, E. P.; GOODYEAR, C. S.; SHAW, P. X.; PALINSKI, W.; WITZTUM, J. L.; SILVERMAN, G. J. Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. **Nat. Med.**, v. 9, n. 6, p. 736-743, 2003.

BOSCHCOV, P.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A.; GIDLUND, M. Development of a peptide-based ELISA for the detection of antibodies against oxidized low density lipoprotein (oxLDL). **Atherosclerosis**, v. 151, n. 1, p. 224, 2000.

BRESLOW, J. L. Mouse models of atherosclerosis. **Science**, v. 272, n. 5262, p. 685-688, 1996.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, v.232, p.34-47, 1986.

BROWN, M. S.; KOVANEN, P. T.; GOLDSTEIN, J. L. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. **Science**, v. 212, n. 4495, p. 628-635, 1981.

BUZELLO, M.; TÖRNIG, J.; FAULHABER, J.; EHMKE, H.; RITZ, E.; AMANN, K. The apolipoprotein e knockout mouse: a model documenting accelerated atherogenesis in uremia. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 14, n. 2, p. 311-316, 2003.

CANTO, J. G.; GOLDBERG, R. J.; HAND, M. M.; BONOW, R. O.; SOPKO, G.; PEPINE, C. J.; LONG, T. Symptom presentation of women with acute coronary syndromes: myth vs reality. **Arch. Intern. Med.**, v. 167, n. 22, p. 2405-2413, 2007.

CARR, A. C., MCCALL, M. R.; FREI, B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, p. 1716-1723, 2000.

CAZITA, P. M.; BERTI, J. A.; AOKI, C.; GIDLUND, M.; HARADA, L. M.; NUNES, V. S.; QUINTÃO, E. C.; OLIVEIRA, H. C. Cholesteryl ester transfer protein expression attenuates atherosclerosis in ovariectomized mice. **J. Lipid. Res.**, v. 44, n. 1, p. 33-40, 2003.

CHANG, M. K.; BERGMARK, C.; LAURILA, A.; HÖRKKÖ, S.; HAN, K. H.; FRIEDMAN, P.; DENNIS, E. A.; WITZTUM, J. L. Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, n. 11, p. 6353-6358, 1999.

CHAPPEY, B., MYARA, I.; BENOIT, M. O.; MAZIÈRE, C.; MAZIÈRE, J. C.; MOATTI, N. Characteristics of ten charge-differing subfractions isolated from human native low density lipoprotein (LDL). No evidence of peroxidative modifications. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1259, n. 3, p. 261-70, 1995.

---

---

CHEN, K.; THOMAS, S. R.; KEANEY, J. F. JR. Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 35, n. 2, p. 117-132, 2003.

CHYU, K. Y.; ZHAO, X.; REYES, O. S.; BABBIDGE, S. M.; DIMAYUGA, P. C.; YANO, J.; CERCEK, B.; FREDRIKSON, G. N.; NILSSON, J.; SHAH, P. K. Immunization using an Apo B-100 related epitope reduces atherosclerosis and plaque inflammation in hypercholesterolemic apo E (-/-) mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 338, n. 4, p. 1982-1989, 2005.

DAMASCENO, N. R.; GIDLUND, M. A.; GOTO, H.; DIAS, C. T.; OKAWABATA, F. S.; ABDALLA, D. S. Casein and soy protein isolate in experimental atherosclerosis: influence on hyperlipidemia and lipoprotein oxidation. **Ann. Nutr. Metab.**, v. 45, n. 1, p. 38-46, 2001.

DAMASCENO, N. R.; GOTO, H.; RODRIGUES, F. M.; DIAS, C. T.; OKAWABATA, F. S.; ABDALLA, D. S.; GIDLUND M. Soy protein isolate reduces the oxidizability of LDL and the generation of oxidized LDL autoantibodies in rabbits with diet-induced atherosclerosis. **J. Nutr.**, v. 130, n. 11, p. 2641-7, 2000.

DONMA, M. M., DONMA, O. Apolipoproteins: Biochemistry, methods and clinical significance. **Biochem. Educ.**, v. 17, p. 63-68, 1989.

ENDEMANN, G.; STANTON, L. W.; MADDEN, K. S.; BRYANT, C. M.; WHITE, R. T.; PROTTER, A. A. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 16, p. 11811-11816.

ESTERBAUER, H.; GEBICKI, J.; PUHL, H.; JÜRGENS, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 13, n. 4, p. 341-390, 1992.

ESTERBAUER, H.; WÄG, G.; PUHL, H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. **Br. Med. Bull.**, v. 49, n. 3, p. 566-76, 1993.

FEINGOLD, K. R.; GRUNFELD, C. Role of cytokines in inducing hyperlipidemia. **Diabetes**, v. 41, p. 97-101, 1992, Suppl 2.

FERNVIK, E. C.; KETELHUTH, D. F.; RUSSO, M.; GIDLUND M. The autoantibody repertoire against copper- or macrophage-modified LDL differs in normolipidemics and hypercholesterolemic patients. **J. Clin. Immunol.**, v. 24, n. 2, p. 170-176, 2004.

FOLEY, R. N.; PARFREY, P.; SAMAK, M. J. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal failure. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 32, S112-S119, 1998.

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clin. Chem.**, v. 28, n. 10, p. 2077-2080, 1982.

---

---

FRANCESCHINI, G. Apolipoprotein function in health and disease: insights from natural mutations. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 26, n. 9, p. 733-746, 1996.

FREDRIKSON, G. N.; SÖDERBERG, I.; LINDHOLM, M.; DIMAYUGA, P.; CHYU, K. Y.; SHAH, P. K.; NILSSON, J. Inhibition of atherosclerosis in apoE-null mice by immunization with apoB-100 peptide sequences. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 23, n. 5, p. 879-884, 2003.

FREIGANG, S.; HÖRKKÖ, S.; MILLER, E.; WITZTUM, J. L.; PALINSKI, W. Immunization of LDL receptor-deficient mice with homologous malondialdehyde-modified and native LDL reduces progression of atherosclerosis by mechanisms other than induction of high titers of antibodies to oxidative neoepitopes. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 18, n. 12, p. 1972-1982, 1998.

FRIEDEWALD, J. J.; RABB, H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. **Kidney Int.**, v. 66, n. 2, p. 486-491, 2004.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of the low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

FRIED, L. P.; KRONMAL, R. A.; NEWMAN, A. B.; BILD, D. E.; MITTELMARK, M. B.; POLAK, J. F.; ROBBINS, J. A.; GARDIN, J. M. Risk factors for 5-year mortality in older adults: the Cardiovascular Health Study. **JAMA**, v. 279, n. 8, p. 585-592, 1998.

FROSTEGÅRD, J.; KJELLMAN, B.; GIDLUND, M.; ANDERSSON, B.; JINDAL, S.; KIESSLING, R. Induction of heat shock protein in monocytic cells by oxidized low density lipoprotein. **Atherosclerosis**, v. 121, n. 1, p. 93-103, 1996.

FROSTEGÅRD, J.; WU, R.; GISCOMBE, R.; HOLM, G.; LEFVERT, A. K.; NILSSON, J. Induction of T-cell activation by oxidized low density lipoprotein. **Arterioscler. Thromb.**, v. 12, n. 4, p. 461-467, 1992.

FRUCHART, J. C.; NIERMAN, M. C.; STROES, E. S.; KASTELEIN, J. J.; DURIEZ P. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. **Circulation**, v. 109, n. 23, p. III15-19, 2004. Suppl 1.

FRY, D. L.; CORNHILL, J. F.; SHARMA, H.; PAP, J.M.; MITSCHELEN, J. Uptake of low density lipoprotein, albumin, and water by deendothelialized in vitro minipig aorta. **Arteriosclerosis**, v.6, n. 5, p. 475-490.

GEORGE, J.; AFEK, A.; GILBURD, B.; LEVKOVITZ, H.; SHAISH, A.; GOLDBERG, I.; KOPOLOVIC, Y.; WICK, G.; SHOENFELD, Y.; HARATS, D. Hyperimmunization of apo-E-deficient mice with homologous malondialdehyde low-density lipoprotein suppresses early atherogenesis. **Atherosclerosis**, v. 138, n. 1, p. 147-152, 1998.

GEORGE, J.; SHOENFELD, Y.; AFEK, A.; GILBURD, B.; KEREN, P.; SHAISH, A.; KOPOLOVIC, J.; WICK, G.; HARATS, D. Enhanced fatty streak formation in C57BL/6J mice by immunization with heat shock protein-65. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, n. 3, p. 505-510, 1999.

---

---

GIDLUND, M.; DAMASCENO, N. R.; LINDOSO, J. A.; ABDALLA, D. S.; GOTO, H. Monoclonal antibodies against low density lipoprotein with various degrees of oxidative modifications. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, n. 12, p. 1625-1628, 1996.

GLASS, C. K.; WITZTUM, J. L. Atherosclerosis. the road ahead. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 503-516, 2001.

GO, A. S.; CHERTOW, G. M.; FAN, D.; MCCULLOCH, C. E.; HSU, C. Y. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. **N. Engl. J. Med.**, v. 351, n. 13, p. 1296-1305, 2004 Published erratum appears in: **N Engl J Med.**, v. 18, n. 4, p. 4, 2008 .

HACKAM, D. G.; ANAND, S.S. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. **JAMA**, v. 290, n. 7, p. 932-940, 2003.

HANSSON, G. K.; BONDJERS, G.; NILSSON, L. A. Plasma protein accumulation in injured endothelial cells. Immunofluorescent localization of IgG and fibrinogen in the rabbit aortic endothelium. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 30, n. 1, p. 12-26, 1979.

HANSSON, G. K.; LIBBY, P.; SCHÖNBECK, U.; YAN, Z. Q. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. **Circ. Res.**, v. 91, n. 4, p. 281-291, 2002.

HANSSON, G. K.; HELLSTRAND, M.; RYMO, L.; RUBBIA, L.; GABBIANI, G. Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells. **J. Exp. Med.**, v. 170, n. 5, p. 1595-1608, 1989.

HARA, H.; YOKOYAMA, S. Interaction of free apolipoproteins with macrophages. Formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 5, p. 3080-3086, 1991.

HARA, A.; TAKETOMI, T. Occurrence of sulfatide as a major glycosphingolipid in WHHL rabbit serum lipoproteins. **J. Biochem.**, v. 102, n. 1, p. 83-92. 1987.

HASSALL, D. G. Three probe flow cytometry of a human foam-cell forming macrophage. **Cytometry**, v. 13, n. 4, p. 381-388, 1992.

HAYEK, T.; OIKNINE, J.; BROOK, J. G.; AVIRAM, M. Increased plasma and lipoprotein lipid peroxidation in apo E-deficient mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 201, n. 3, p. 1567-1574, 1994.

HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochem. J.**, v. 265, n. 3, p. 621-636, 1990.

HOEG, J.M.; BREWER, H. B. JR. Human lipoprotein metabolism and the liver. **Prog. Liver Dis.**, v. 8, p. 51-64, 1986.

---

---

HOFKER, M. H.; VAN VLIJMEN, B. J.; HAVEKES, L. M. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 137, n. 1, p. 1-11, 1998.

HÖRKKÖ, S.; BINDER, C. J.; SHAW, P. X.; CHANG, M. K.; SILVERMAN, G.; PALINSKI, W.; WITZTUM, J. L. Immunological responses to oxidized LDL. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 28, n. 12, p. 1771–1779, 2000.

HÖRKKÖ, S.; BIRD, D. A.; MILLER, E.; ITABE, H.; LEITINGER, N.; SUBBANAGOUNDER, G.; BERLINER, J. A.; FRIEDMAN, P.; DENNIS, E. A.; CURTISS, L. K.; PALINSKI, W.; WITZTUM, J. L. Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of oxidized low-density lipoproteins. **J. Clin. Invest.**, v. 103, n. 1, p. 117-128, 1999.

HULTHE, J.; WIKLUND, O.; HURT-CAMEJO, E.; BONDJERS, G. Antibodies to oxidized LDL in relation to carotid atherosclerosis, cell adhesion molecules, and phospholipase A(2). **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, n. 2, p. 269-274, 2001.

ISHIBASHI, S.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L.; GERARD, R. D.; HAMMER, R. E.; HERZ, J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **J. Clin. Invest.**, v. 92, n. 2, p. 883-893, 1993.

JOHNSON, W. J.; MAHLBERG, F. H.; ROTHBLAT, G. H.; PHILLIPS, M. C. Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1085, n. 3, p. 273-298, 1991.

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

KETELHUTH, D. F.; TONINI, G. C.; CARVALHO, M. D.; RAMOS, R. F.; BOSCHCOV, P.; GIDLUND M. Autoantibody response to chromatographic fractions from oxidized LDL in unstable angina patients and healthy controls. **Scand. J. Immunol.**, v. 68, n. 4, p. 456-462, 2008.

KHALLOU-LASCHET, J.; TUPIN, E.; CALIGIURI, G.; POIRIER, B.; THIEBLEMONT N.; GASTON, A. T.; VANDAELE, M.; BLETON, J.; TCHAPLA, A.; KAVERI, S. V.; RUDLING, M.; NICOLETTI A. Atheroprotective effect of adjuvants in apolipoprotein E knockout mice. **Atherosclerosis**, v. 184, n. 2, p. 330-341, 2006.

KHOO, J. C.; MILLER, E.; MCLOUGHLIN, P.; STEINBERG, D. Enhanced macrophages uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. **Atherosclerosis**, v. 8, n. 4, p. 348-358, 1988

KIM, J. A.; TERRITO, M. C.; WAYNER, E.; CARLOS, T. M.; PARHAMI, F.; SMITH, C. W.; HABERLAND, M. E.; FOGELMAN, A. M.; BERLINER, J. A. Partial characterization of leukocyte binding molecules on endothelial cells induced by minimally oxidized LDL. **Arterioscler. Thromb.**, v. 14, n. 3, p. 427-433, 1994.

---

---

KLOUCHE, M.; GOTTSCHLING, S.; GERL, V.; HELL, W.; HUSMANN, M.; DORWEILER, B.; MESSNER, M.; BHAKDI, S. Atherogenic properties of enzymatically degraded LDL: selective induction of MCP-1 and cytotoxic effects on human macrophages. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 18, n. 9, p. 1376-1385, 1998.

KLOUCHE, M.; ROSE-JOHN, S.; SCHMIEDT, W.; BHAKDI, S. Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation. **Circulation**, v. 101, n. 15, p. 1799-1805, 2000.

KNOWLES, J. W.; REDDICK, R. L.; JENNETTE, J. C.; SHESELY, E. G.; SMITHIES, O.; MAEDA, N. Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-) Apoe(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 4, p. 451-458, 2000.

KORSTANJE, R.; LI, R.; HOWARD, T.; KELMENSEN, P.; MARSHALL, J.; PAIGEN, B.; CHURCHILL, G. Influence of sex and diet on quantitative trait loci for HDL cholesterol levels in an SM/J by NZB/BINJ intercross population. **J. Lipid. Res.**, v. 45, n. 5, p. 881-888, 2004.

KULAH, E.; TASCILAR, O.; ACIKGOZ, S.; TEKIN, I. O.; KARADENIZ, G.; CAN, M.; GUN, B.; BARUT, F.; COMERT, M. Oxidized LDL accumulation in experimental renal ischemia reperfusion injury model. **Ren. Fail.**, v. 29, n. 4, p. 409-415, 2007.

LEE, R. T.; LIBBY, P. The unstable atheroma **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 17, n. 10, p. 1859-1867, 1997.

LEWIS, M. J.; MALIK, T. H.; EHRENSTEIN, M. R.; BOYLE, J. J.; BOTTO, M.; HASKARD, D. O. Immunoglobulin M is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Circulation**, v. 120, n. 5, p. 417-426, 2009.

LIBBY, P. Changing concepts of atherogenesis. **J. Intern. Med.**, v. 247, n. 3, p. 349-358, 2000.

LINDBLAD, E. B. Aluminium adjuvants--in retrospect and prospect. **Vaccine**, v. 22, n. 27-28, p. 3658-3668, 2004.

LONGENECKER, J. C.; CORESH, J.; POWE, N. R.; LEVEY, A. S.; FINK, N. E.; MARTIN, A.; KLAG, M.J. Traditional cardiovascular disease risk factors in dialysis patients compared with the general population: the CHOICE Study. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 13, n. 7, p. 1918-1927, 2002.

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

MACH, F.; SCHÖNBECK, U.; BONNEFOY, J. Y.; POBER, J. S.; LIBBY P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. **Circulation**, v. 96, n. 2, p. 396-399, 1997.

---

---

MAHLEY, R. W.; HUANG, Y. Apolipoprotein E: From atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 10, n. 3, p. 207–217, 1999.

MEYRIER, A.; HILL, G. S.; SIMON, P. Ischemic renal diseases: new insights into old entities. **Kidney Int.**, v. 54, n. 1, p. 2–13, 1998.

MITCHELL, T. C.; HILDEMAN, D.; KEDL, R. M.; TEAGUE, T. K.; SCHAEFER, B. C.; WHITE, J.; ZHU, Y.; KAPPLER, J.; MARRACK, P. Immunological adjuvants promote activated T cell survival via induction of Bcl-3. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 5, p. 397-402. 2001.

MOLITORIS, B. A. New insights into the cell biology of ischemic acute renal failure. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 1, n. 12, p. 1263-1270, 1991.

MUNRO, J. M. E. COTRAN, R. S. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. **Lab. Invest.**, v. 58, n. 3, p. 249-261, 1988.

NAGHAVI, M.; LIBBY, P.; FALK, E.; CASSCELLS, S. W.; LITOVSKY, S.; RUMBERGER, J.; BADIMON, J. J.; STEFANADIS, C.; MORENO, P.; PASTERKAMP, G.; FAYAD, Z.; STONE, P. H.; WAXMAN, S.; RAGGI, P.; MADJID, M.; ZARRABI, A.; BURKE, A.; YUAN, C.; FITZGERALD, P. J.; SISCOVICK, D. S.; DE KORTE, C. L.; AIKAWA, M.; AIRAKSINEN, K. E.; ASSMANN, G.; BECKER, C. R.; CHESEBRO, J. H.; FARB, A.; GALIS, Z. S.; JACKSON, C.; JANG, I. K.; KOENIG, W.; LODDER, R. A.; MARCH, K.; DEMIROVIC, J.; NAVAB, M.; PRIORI, S. G.; REKHTER, M. D.; BAHR, R.; GRUNDY, S. M.; MEHRAN, R.; COLOMBO, A.; BOERWINKLE, E.; BALLANTYNE, C.; INSULL, W. JR.; SCHWARTZ, R. S.; VOGEL, R.; SERRUYS, P. W.; HANSSON, G. K.; FAXON, D. P.; KAUL, S.; DREXLER, H.; GREENLAND, P.; MULLER, J. E.; VIRMANI, R.; RIDKER, P. M.; ZIPES, D. P.; SHAH, P. K.; WILLERSON, J. T. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. **Circulation**, v. 108, n. 14, p. 1664-1672, 2003.

NILSSON, J.; HANSSON, G. K.; SHAH, P. K. Immunomodulation of atherosclerosis: implications for vaccine development. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 25, n. 1, p. 18-28, 2005.

NONOGAKI, K.; MOSER, A. H.; PAN, X. M.; STAPRANS, I.; GRUNFELD, C.; FEINGOLD, K. R. Lipoteichoic acid stimulates lipolysis and hepatic triglyceride secretion in rats in vivo. **J Lipid Res.**, v. 36, n. 9, p. 1987-1995, 1995.

PAIGEN, B.; MORROW, A.; HOLMES, P. A.; MITCHELL, D.; WILLIAMS, R. A. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. **Atherosclerosis**, v. 68, n. 3, p. 231-240, 1987.

PALINSKI, W.; HÖRKKÖ, S.; MILLER, E.; STEINBRECHER, U. P.; POWELL, H. C.; CURTISS, L. K.; WITZTUM, J. L. Cloning of monoclonal antibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma. **J. Clin. Invest.**, v. 98, n. 3, p. 800–814, 1996.

---

---

PARKE, A. L.; LIU, P. T.; PARKE, D. V. Multiple organ dysfunction syndrome. **Inflammopharmacology**, v. 11, n. 1, p. 87–95, 2003.

PELUZIO, M. C.; MIGUEL, E. J.; DRUMOND, T. C.; CESAR, G. C.; SANTIAGO, H. C.; TEIXEIRA, M. M.; VIEIRA, E. C.; ARANTES, R. M.; ALVAREZ-LEITE, J. I. Monocyte chemoattractant protein-1 involvement in the  $\alpha$ -tocopherol-induced reduction of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. **Br. J. Nutr.**, v. 90, n. 1, p. 3-11, 2003.

PELUZIO, M. C.; HOMEM, A. P.; CESAR, G. C.; AZEVEDO, G. S.; AMORIM, R.; CARA, D. C.; SALIBA, H.; VIEIRA, E. C.; ARANTES, R. E.; ALVAREZ-LEITE, J. Influences of alpha-tocopherol on cholesterol metabolism and fatty streak development in apolipoprotein E-deficient mice fed an atherogenic diet. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, n. 12, p.1539-1545, 2001.

PENTIKAINEN, M. O.; OÖRNI, K.; ALA-KORPELA, M.; KOVANEN, P.T. Modified LDL - trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima. **J. Intern. Med.**, v. 247, p. 359, 2000.

PIEDRAHITA, J. A.; ZHANG, S. H.; HAGAMAN, J. R.; OLIVER, P. M.; MAEDA, N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 89, n. 10, p. 4471-4475, 1992.

PLUMP, A. S.; SMITH, J. D.; HAYEK, T.; AALTO-SETALA, K.; WALSH, A.; VERSTUYFT, J. G.; RUBIN, E. M.; BRESLOW, J. L. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**, v. 71, n. 2, p. 343–353, 1992.

PORTUGAL, L. R.; FERNANDES, L. R.; CESAR, G. C.; SANTIAGO, H. C.; OLIVEIRA, D. R.; SILVA, N. M.; SILVA, A. A.; LANNES-VIEIRA, J.; ARANTES, R. M.; GAZZINELLI, R. T.; ALVAREZ-LEITE, J. I. Infection with *Toxoplasma gondii* increases atherosclerotic lesion in ApoE-deficient mice. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 3571-3576, 2004.

QUINN, M. T.; PARTHASARATHY, S.; FONG, L. G.; STEINBERG, D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 84, n. 9, p. 2995-2998, 1987.

RIDKER, P. M.; DANIELSON, E.; FONSECA, F. A.; GENEST, J.; GOTTO, A. M. JR.; KASTELEIN, J. J.; KOENIG, W.; LIBBY, P.; LORENZATTI, A. J.; MACFADYEN, J. G.; NORDESTGAARD, B. G.; SHEPHERD, J.; WILLERSON, J. T.; GLYNN, R. J.; JUPITER Study Group. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. **N. Engl. J. Med.**, v. 359, n. 21, p. 2195-2207, 2008.

---

---

ROSS, R.; GLOMSET, J. A. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. **Science**, v. 29, n. 93, p. 1332- 1339, 1973

RUBIN, E. M.; KRAUSS, R. M.; SPANGLER, E. A.; VERSTUYFT, J. G.; CLIFT, S. M. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. **Nature**, v. 353, n. 6341, p. 265-267, 1991.

SANTOS DR. III Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretrizes de Prevenção da Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 77, p. 1-48, 2001, Supl. 3.

SCHULTE, S.; SUKHOVA, G. K.; LIBBY, P. Genetically programmed biases in Th1 and Th2 immune responses modulate atherogenesis. **Am. J. Pathol.**, v. 172, n. 6, p. 1500-1508, 2008.

SCHIOPU, A.; BENGTSSON, J.; SÖDERBERG, I.; JANCIAUSKIENE, S.; LINDGREN, S.; ARES, M. P.; SHAH, P. K.; CARLSSON, R.; NILSSON, J.; FREDRIKSON, G. N. Recombinant human antibodies against aldehyde-modified apolipoprotein B-100 peptide sequences inhibit atherosclerosis **Circulation**. v. 110, n. 14, p. 2047-2052, 2004.

SHAW, L. J.; BAIREY MERZ, C. N.; PEPINE, C. J.; REIS, S. E.; BITTNER, V.; KELSEY, S. F.; OLSON, M.; JOHNSON, B. D.; MANKAD, S.; SHARAF, B. L.; ROGERS, W. J.; WESSEL, T. R.; ARANT, C. B.; POHOST, G. M.; LERMAN, A.; QUYYUMI, A. A.; SOPKO, G.; WISE INVESTIGATORS. Insights from the NHLBI-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) Study: Part I: gender differences in traditional and novel risk factors, symptom evaluation, and gender-optimized diagnostic strategies. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 47, n. 3, p. S4-S20, 2006. Suppl.

SHAW, P. X.; HÖRKKÖ, S.; CHANG, M. K.; CURTISS, L. K.; PALINSKI, W.; SILVERMAN, G. J.; WITZTUM, J. L. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 12, p. 1731–1740, 2000.

SHAW, P. X.; HORKKO, S.; TSIMIKAS, S.; CHANG, M. K.; PALINSKI, W.; SILVERMAN, G. J.; WITZTUM, J. L. Human-derived anti-oxidized LDL autoantibody blocks uptake of oxidized LDL by macrophages and localizes to atherosclerotic lesions in vivo. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, n. 8, p. 1333-1339, 2001.

SHOENFELD, Y.; SHERER, Y.; GEORGE, J.; HARATS, D. Autoantibodies associated with atherosclerosis. **Ann. Med.**, v. 32, p. 37–40, 2000. Suppl. 1.

SHOJI, T.; NISHIZAWA, Y.; FUKUMOTO, M.; SHIMAMURA, K.; KIMURA, J.; KANDA, H.; EMOTO, M.; KAWAGISHI, T.; MORII, H. Inverse relationship between circulating oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and anti-oxLDL antibody levels in healthy subjects. **Atherosclerosis**, v. 148, n. 1, p. 171-177, 2000.

---

---

SIEMS, W.; QUAST, S.; CARLUCCIO, F.; WISWEDEL, I.; HIRSCH, D.; AUGUSTIN, W.; HAMPI, H.; RIEHLE, M.; SOMMERBURG, O. Oxidative stress in chronic renal failure as a cardiovascular risk factor. **Clin. Nephrol.**, v. 58, p. S12-S19, 2002. Suppl 1.

STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T. E.; KHOO, J. C.; WITZTUM, J. L. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **N. Engl. J. Med.**, v. 320, n. 14, p. 915-924, 1989.

STEINBERG, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 34, p. 20963-20966, 1997.

SVENSJÖ, E.; BOSCHCOV, P.; KETELHUTH, D. F.; JANCAR, S.; GIDLUND, M. Increased microvascular permeability in the hamster cheek pouch induced by oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and some fragmented apolipoprotein B proteins. **Inflamm. Res.**, v. 52, n. 5, p. 215-220, 2003.

TEXTOR, S.C. Ischemic nephropathy: where are we now? **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 15, n. 8, p. 1974-1982, 2004.

VANDERLAAN, A. P.; REARDON, A. C.; GETZ, S. G. Site specificity of atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 24, n. 1, p. 12-22, 2004.

VENIANT, M. M.; WITHYCOMBE, S.; YOUNG, S.G. Lipoprotein size and atherosclerosis susceptibility in Apoe(-/-) and Ldlr(-/-) mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, n. 10, p. 1567-1570, 2001.

VESSBY, B.; GUSTAFSON, S.; CHAPMAN, M. J.; HELLSING, K.; LITHELL, H. Lipoprotein composition of human suction-blister interstitial fluid. **J. Lipid. Res.**, v. 28, n. 6, p. 629-641, 1987.

WEN, M.; SEGERER, S.; DANTAS, M.; BROWN, P. A.; HUDKINS, K. L.; GOODPASTER, T.; KIRK, E.; LEBOEUF, R.C.; ALPERS, C.E. Renal injury in apolipoprotein E-deficient mice **Lab. Invest.**, v. 82, n. 8, p. 999-1006, 2002.

WILLIAMS, K. J.; TABAS, I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 15, n. 5, p. 551-561, 1995.

WITZTUM, J. L.; STEINBERG, D. Role of oxidized low protein in atherosclerosis. **The J. Clin. Invest.**, v. 88, n. 6, p. 1785-1792, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Cardiovascular diseases. Available from: <http://www.who.int/cardiovascular diseases>. Cited from: 10 oct. 2006.

XU, Q.; DIETRICH, H.; STEINER, H. J.; GOWN, A. M.; SCHOEL, B.; MIKUZ, G.; KAUFMANN, S. H.; WICK, G. Induction of arteriosclerosis in normocholesterolemic rabbits by immunization with heat shock protein 65. **Arterioscler. Thromb.**, v. 12, n. 7, p. 789-799, 1992.

---

ZARATIN, A.; GIDLUND, M.; BOSCHCOV, P.; CASTILHO, L.; DE FARIA, E. C. Antibodies against oxidized low-density lipoprotein in normolipidemic smokers. **Am. J. Cardiol.**, v. 90, n. 6, p. 651-653, 2002.

ZHOU, X.; CALIGIURI, G.; HAMSTEN, A.; LEFVERT, A. K.; HANSSON, G. K. LDL immunization induces T-cell-dependent antibody formation and protection against atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, n. 1, p. 108-114, 2001.

ZHOU, X.; HANSSON, G. K. Detection of B cells and proinflammatory cytokines in atherosclerotic plaques of hypercholesterolaemic apolipoprotein E knockout mice. **Scand. J. Immunol.**, v. 50, n. 1, p. 25-30, 1999.

---

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)