

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**TALITA ANTUNES GUIMARÃES**

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-LIPOPROTEÍNA DE BAIXA  
DENSIDADE OXIDADA PARA USO EM DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE  
RISCO CARDIOVASCULAR**

Alfenas/MG  
2012

**TALITA ANTUNES GUIMARÃES**

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-LIPOPOTEÍNA DE BAIXA  
DENSIDADE OXIDADA PARA USO EM DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE  
RISCO CARDIOVASCULAR**

Dissertação apresentada ao programa do curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Obtenção de insumos farmacêuticos e avaliação da atividade biológica.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão

(Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Alfenas)

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Agda Andrade  
(BIOTÉCNICA Indústria e Comércio Ltda Varginha/MG)

Alfenas/MG  
2012

Guimarães, Talita Antunes.

Produção de anticorpos anti-lipoproteína de baixa densidade oxidada para uso em diagnóstico laboratorial de risco cardiovascular / Talita Antunes Guimarães. - 2012.

67 f. -

Orientador: Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2012.

Bibliografia.

1. Aterosclerose. 2. Lipoproteínas LDL. 3. Anticorpos. 4. NADP. I. Brigagão, Maísa Ribeiro Pereira Lima. II. Título.

CDD: 572

**TALITA ANTUNES GUIMARÃES**

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-LIPOPOTEÍNA DE BAIXA  
DENSIDADE OXIDADA PARA USO EM DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE  
RISCO CARDIOVASCULAR**

A Banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção de insumos farmacêuticos e avaliação da atividade biológica.

Aprovada em 07 de fevereiro de 2012.

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão**

**Instituição** Universidade Federal de Alfenas **Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leda Quércia Vieira**

**Instituição** Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG **Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisângela Monteiro Pereira**

**Instituição** Universidade Federal de Alfenas **Assinatura:** \_\_\_\_\_

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, seja com uma palavra de incentivo ou um sorriso. Muito obrigada!

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e coragem nas horas mais difíceis.

Aos meus pais, que me ensinaram o valor da dignidade... Antônio e Suely. Que sempre me permitiram ir de encontro às minhas aspirações e que me ensinaram que humildade e honestidade são passos fundamentais para a concretização de todo e qualquer objetivo. Sem vocês, eu não seria ninguém.

Às minhas irmãs e afilhada, Tatiana, Tamile e Alice, simplesmente por serem partes de mim!

À Universidade Federal de Alfenas - MG, pela oportunidade.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão pela oportunidade, credibilidade e confiança, que foram fundamentais para meu crescimento profissional e pessoal. Sem a sua contribuição e ajuda este trabalho não teria se realizado e meu sonho não teria se concretizado.

A minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Agda Andrade, pela disponibilidade, eficiência e incentivo, que contribuiu de maneira decisiva na realização deste trabalho.

A todos os funcionários da empresa BioTécnica que sempre estiveram dispostos a ajudar.

Aos colegas em especial a Gérsika, Patrícia, Olímpia e André pela convivência, companheirismo e amizade que certamente continuará por toda nossa existência.

Aos Funcionários da Unifal-MG, em especial, aos Funcionários do Laboratório de Bioquímica Básica, Gabriel, Val, Marta e Rose pelo auxílio durante a realização deste trabalho.

À CAPES, CNPq-Redoxoma; Unifal-MG, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Diversos estudos têm evidenciado que as doenças inflamatórias estão fortemente ligadas à condição de estresse oxidativo. Dentre elas, uma das mais estudadas é a aterosclerose. A aterosclerose é uma doença de grande importância mundial, devido à alta mortalidade resultante de condições clínicas decorrentes da doença. Estudos demonstram que a modificação da LDL é um fator importante no desenvolvimento desta doença. Por isso, a determinação da LDLox plasmática é essencial, não apenas para investigar sua relevância para as doenças cardiovasculares, mas, também, como um auxiliar no diagnóstico destas doenças. A oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDLox) induz à formação de epítomos imunogênicos na molécula. Contudo, o papel desses anticorpos na fisiopatologia da aterosclerose e o seu significado clínico permanecem indefinidos. O objetivo deste estudo foi produzir anticorpos anti-LDLox para uso em diagnóstico laboratorial de risco cardiovascular e também avaliar a associação entre a LDLox e o complexo formado entre o LDLox e o anticorpos anti-LDL na resposta inflamatória de macrófagos pela ativação da NADPH oxidase associada a proteína dissulfeto isomerase (PDI). A ativação da NADPH oxidase de macrófagos requer o acoplamento das subunidades citosólicas aos componentes de grânulos e translocação do complexo à membrana do fagossoma. A PDI é uma chaperona envolvida no tráfego protéico celular, sendo encontrada na superfície de diversas células procarióticas e eucarióticas. Trabalhos prévios sugeriram que PDI pode ser um dos componentes responsáveis pela montagem de Nox2, facilitando o enovelamento correto das subunidades do complexo e/ou auxiliando o trânsito das subunidades até à membrana do fagossoma. Neste trabalho testou-se a atividade de Nox2 de macrófagos inflamatórios correlacionada à atividade redutase de PDI de membrana. Macrófagos dormentes apresentaram baixa atividade de PDI e não foi detectado consumo de oxigênio associado ao sistema Nox2. Sob estímulo de LDLox e do complexo LDLox/ anti-LDLox, os fagócitos consumiram quantidade significativa de oxigênio e apresentaram atividade de PDI, maior que as células dormentes. Testes com inibidores padrões de PDI (bacitracina e ácido ditionitrobenzólico- DTNB) confirmaram que a inibição de PDI determina decréscimo da atividade de Nox2, resultados obtidos através de ensaios espectrofotométricos (redução de citocromo c, 550 nm). Em conjunto, os resultados apontam que, simultaneamente à atividade de Nox2 em macrófagos estimulados, ocorre atividade redutase de PDI, confirmando que essa chaperona está diretamente associada à ativação e/ou manutenção da atividade da oxidase fagocitária.

**Palavras-chave:** Aterosclerose. Lipoproteínas LDL. Anticorpos. NADP.

## ABSTRACT

Inflammatory disorders are strongly associated with the condition of oxidative stress, and atherosclerosis is one of the most studied condition. Atherosclerosis is a disease of great world-wide importance due to the high mortality of decurrently clinical conditions of the illness. Studies have demonstrated that the modification of the LDL is an important factor in the development of the illness. Therefore, the determination of the plasma LDL-ox is essential not only to investigate its relevance for the atherosclerotic diseases, but also to contribute in the diagnosis of these illnesses. The oxidation of low-density lipoprotein (oxLDL) induces the formation of immunogenic epitopes in molecules. However, the role of these antibodies in the pathophysiology of atherosclerosis and their clinical significance remain undefined. Objective this study was produce antibodies anti-LDLox in the diagnosis of atherosclerotic diseases and evaluate the association between LDLox and complex LDLox/anti-LDLox in activation the regulatory activity of PDI interconnected to Nox2 in inflammatory macrophages. Protein disulfide isomerase is an ubiquitously expressed enzyme that catalyses the rearrangement of disulfide bonds in target proteins. Previous studies suggest that PDI, which is a chaperone involved in protein trafficking and translocates to the cell surface, may regulate the phagocytic NADPH oxidase complex (Nox2). LDLox and complex LDLox/ anti-LDLox-triggered superoxide anion release was correlated with the PDI reductase activity detected in macrophages, as determined by oxygen consumption and cleavage of a fluorescent probe, respectively. Assays with the known PDI inhibitors bacitracin and dithionitrobenzoic acid were performed to confirm their ability to decrease the macrophages respiratory burst.

**Keywords:** Atherosclerosis. Low density lipoprotein. Antibodies. NADP.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> LDLox sendo capturada por receptores <i>scavenger</i> presentes em macrófagos originando células espumosas -----	13
<b>Figura 2-</b> Representação esquemática de uma lipoproteína de baixa densidade (LDL) -----	15
<b>Figura 3-</b> Reação em cadeia da peroxidação lipídica -----	16
<b>Figura 4-</b> Modificação oxidativa da LDL -----	17
<b>Figura 5-</b> Estrutura e ativação do complexo enzimático NADPH oxidase no fagócito-----	24
<b>Figura 6-</b> Atividade catalítica na formação e rompimento e na isomerização de pontes dissulfeto intra-moleculares catalisadas por PDI -----	26

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

•NO	Óxido nítrico
•OH	Radical hidroxil
Anti - LDLox	Anticorpo anti Lipoproteína de baixa densidade oxidada
Apo B-100	Apolipoproteína B-100
CD36	Receptor <i>scavenger</i> CD36
CE	Células espumosas
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de cobre
DC	Doenças cardiovasculares
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
DC	Doenças cardiovasculares
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMG CoA	Hidroximetilglutaril coenzima A
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLox/oxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
MDA	Malondialdeído
NADPH	Dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina reduzida
NOS	Óxido nítrico sintases
NOX2	NADPH oxidase fagocítica
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	Radical ânion superóxido
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PBS	Salina tamponada com fosfato
PMN	Polimorfonucleares
PUFAS	Ácidos graxos poliinsaturados
RE	Retículo endoplasmático

TBARS

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TG

Triglicerídeos

## SUMÁRIO

<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>12</b>
1.1 Aterosclerose.....	12
1.2 Hipóteses da modificação oxidativa da LDL .....	14
1.3 LDL oxidada e anticorpo anti LDL oxidada na aterosclerose.....	18
1.4 Produção de anticorpo anti-LDLox para dosar LDLox sanguíneo .....	19
1.5 Estresses oxidativo e aterosclerose .....	21
1.6 NADPH oxidase e aterosclerose .....	22
1.7 NADPH oxidase e PDI.....	25
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>28</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
4.1 ARTIGO .....	30
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>58</b>

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Aterosclerose

As doenças cardiovasculares (DC) continuam sendo um problema de saúde mundial, responsáveis por mais de 17,3 milhões de mortes em todo o mundo. No Brasil as DC representam a principal causa de morte totalizando quase 30% do total de todos os óbitos registrados no país (WHO, 2008). Dentre as DC, a aterosclerose recebe uma especial atenção.

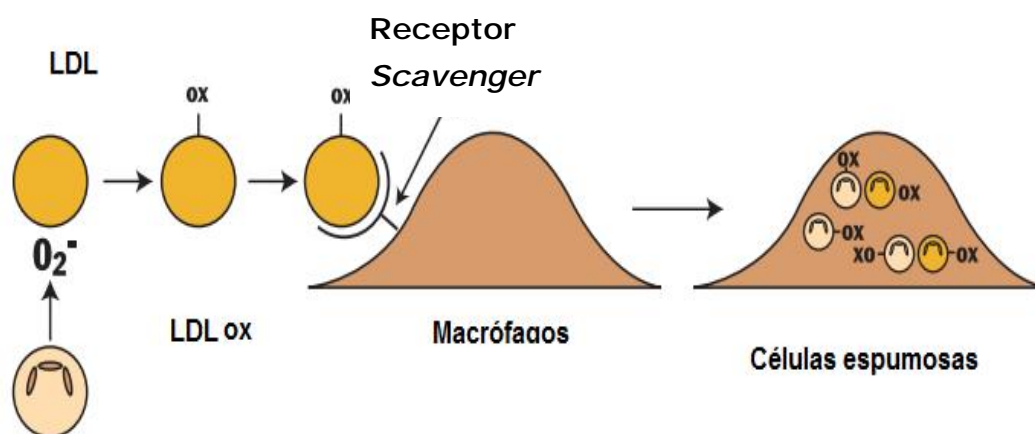
A aterosclerose é definida como uma doença inflamatória crônica caracterizada pela formação de placas de constituição fibrosa e lipídica (ateromas), que afetam as paredes das artérias de grande e médio calibre. Isto resulta na diminuição do diâmetro dos vasos sanguíneos, podendo levar à obstrução dos mesmos e, conseqüentemente, ocasionando as principais complicações cardíacas, tais como, o infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral (AVC) (BERLINER et al., 1995; TSOMPANIDI et al., 2009; LIBBY et al., 2010; GHOSH et al., 2010).

As formações das placas ateroscleróticas ocorrem devido ao aumento da permeabilidade do endotélio, infiltração de monócitos, acúmulo lipídico, inflamação, estresse oxidativo e agregação plaquetária nas paredes das artérias (ROSS, 1999; LUSIS, 2000; JESSUP et al., 2002).

A hipercolesterolemia, particularmente os altos níveis de LDL (lipoproteína de baixa densidade), é um fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose. Os altos níveis de LDL acarretam a disfunção endotelial e, ao penetrar no endotélio, a LDL tem a capacidade de oxidar. Estas características vêm sendo consideradas cruciais para a iniciação e progressão da aterosclerose (FLAVAHAN, 1992; BLAHA et al., 2008).

A fase inicial da aterosclerose é caracterizada pelo aparecimento das estrias gordurosas (*fatty streaks*). As partículas de LDL atravessam as células endoteliais intactas por transporte vesicular, as quais não requerem receptores. Altos níveis de LDL sanguíneo resultam em um aumento da quantidade desta lipoproteína na íntima dos vasos. No interior dos vasos, a LDL sofre

modificação oxidativa, estimulando a liberação de fosfolípides bioativos que ativam as células endoteliais. As células endoteliais ativadas expressam as moléculas de adesão leucocitária (VCAM-1). Após a adesão da LDLox (lipoproteína de baixa densidade oxidada) no endotélio, ocorre o recrutamento dos monócitos (ROSS, 1999). Os monócitos migram para a camada íntima onde se diferenciam em macrófagos. Os macrófagos possuem receptores específicos (principalmente *scavenger* CD36) localizados na superfície, e são responsáveis por capturarem as moléculas de LDLox. Tais receptores não sofrem regulação e acumulam LDLox ilimitadamente em seu interior, originando as células espumosas (CE ou foam cells). Este processo está sumariamente esquematizado na Figura 1. (MOREL, 1994; SCALIA; APPEL; LEFER, 1998; GALLE et al., 2006; NAKAJIMA; TAKAMITSU; TANAKA, 2006; POLI et al., 2009; GENG E JONASSON, 2011).



**Figura 1.** LDLox sendo capturada por receptores *scavenger* presentes em macrófagos originando células espumosas. Adaptado de Babior 2000.

As células espumosas secretam substâncias pró-inflamatórias, tais como citocinas e quimiocinas que intensificam a resposta inflamatória no local da lesão, e facilitam a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) sendo responsáveis pela progressão da doença (LIBBY, 2002; BAIRD; HAMPTON; GIESEG, 2004).

A formação de células espumosas continua e inicia-se, então, a necrose dos macrófagos, dando origem às lesões em desenvolvimento caracterizadas

pela presença de lipídios extracelulares no centro da lesão. O estágio avançado da doença ocorre com a formação das lesões maduras caracterizadas por áreas calcificadas com ulceração visível. As placas ateroscleróticas maduras podem ser classificadas como estáveis ou vulneráveis à ruptura, também conhecidas como instáveis. As placas estáveis geralmente possuem um núcleo com pequena quantidade de lipídio, uma densa cápsula fibrosa, e poucas células inflamatórias, enquanto que placas vulneráveis contêm em seu núcleo grande quantidade de lipídio e uma capa fibrosa fina. Estas diferenças morfológicas sugerem que placas vulneráveis sejam mais propensas a ruptura (LUSIS, 2000; STOCKER E KEANEY, 2004).

A ruptura das placas instáveis é responsável pela formação de trombos, um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose. Diversos relatos demonstram que a ruptura da placa é responsável por aproximadamente 75% dos infartos fatais (HANSSON E LIBBY, 2006; KUMAR E CANNON, 2009).

## 1.2 Hipóteses da modificação oxidativa da LDL

A LDL é a principal lipoproteína plasmática transportadora de colesterol. Cada partícula de LDL tem densidade entre 1,019 ~ 1,063 g/mL, com diâmetro médio de 22 nm, apresenta uma massa que excede 3.000 kD e tem cerca de 1.500 moléculas de ésteres de colesterol em seu núcleo. Há muito pouco triglicerídeo no núcleo das partículas normais de LDL. Quantidades consideráveis de tocoferol, carotenóides e outros antioxidantes lipofílicos plasmáticos também estão presentes na constituição da LDL. A sua superfície consiste em colesterol livre, fosfolipídios (principalmente fosfatidilcolina e esfingomiélin) e uma única proteína, apolipoproteína (apo) B-100 que é composta por 4.536 resíduos de aminoácidos, como ilustrado na Figura 2 (SPOSITO et al., 2007; ABDALLA E SENA, 2008)

A suscetibilidade das partículas de LDL à oxidação pode ser avaliada *in vitro*, após a indução da peroxidação lipídica por azoiniciadores radiculares lipossolúveis (AMVN), hidrossolúveis (AAPH), ou, mais comumente, pelos íons

de cobre. O cobre (principalmente na forma de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ )) é amplamente utilizado em experimentos que objetivam demonstrar a oxidação de LDL, sendo que o metal de transição inicia as etapas de peroxidação lipídica por meio da redução dos hidroperóxidos lipídicos pré-formados nos ácidos graxos presentes na lipoproteína, gerando radical alcóxila (ABDALLA E SENA, 2008).



**Figura 2.** Representação esquemática de uma lipoproteína de baixa densidade (LDL). A partícula de LDL é formada por uma camada externa contendo fosfolípidios, colesterol livre e a proteína, Apo B-100 e por uma camada interna formada por Triacilgliceróis e ésteres de colesterol. Adaptado de LEHNINGER et al., 2006.

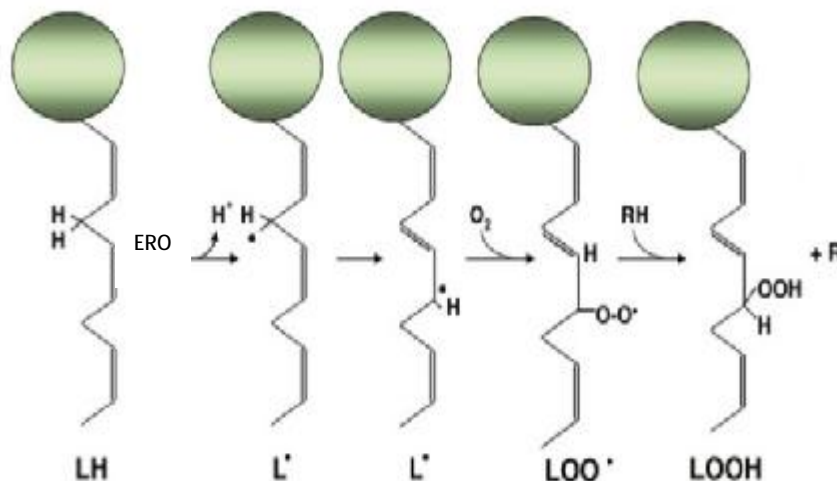
De acordo com a hipótese oxidativa descrita por Brown e Goldstein em 1983, a partícula de LDL deve ser submetida à modificação estrutural oxidativa para que se torne totalmente pró-aterogênica (STEINBERG; JOSEPH, 2002; RIZZO et al., 2009). Ao ser exposta a espécies reativas oxidantes, incluindo ERO/ERN produzidas por macrófagos, células endoteliais, células musculares lisas e outros tipos celulares, a LDL nativa se transforma em LDLox (HEINECKE, 1998; LEOPOLD E LOSCALZO, 2009; MELLO et al., 2011). Os mecanismos pelos quais ocorrem as modificações oxidativas das lipoproteínas *in vivo* ainda não estão totalmente esclarecidos, porém, um dos eventos iniciais na oxidação da LDL é a lipoperoxidação (CHERUBINI et al., 2005; YOSHIDA, 2010).

As partículas de LDL possuem ácidos graxos poliinsaturados presentes na forma livre ou esterificada (TG, fosfolípidios e ésteres de colesterol) que são



susceptíveis à oxidação. Ao ser oxidada, a LDL se torna citotóxica (YAMAGUCHI; KUNITOMO; HAGINAKA, 2002; YOSHIDA, 2010).

As reações catalisadas pelas ERO/ERN, no processo de peroxidação lipídica, são realizadas em três etapas, sendo elas: iniciação, propagação e término (Figura 3).



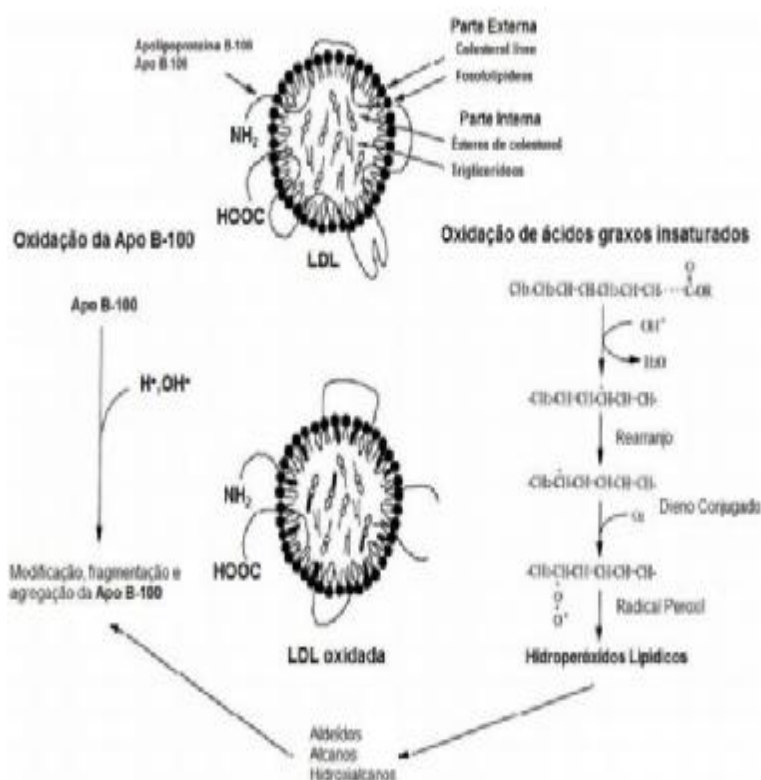
**Figura 3.** Reação em cadeia da peroxidação lipídica. Adaptado de LEOPOLD et al. 2009.

Na fase de iniciação, o hidrogênio do ácido graxo insaturado (LH) do fosfolipídio de membrana é removido por uma ERO produzindo o lipídio na forma radicalar ( $L^{\bullet}$ ). Em seguida, na fase de propagação,  $L^{\bullet}$  formado na reação anterior reage com o oxigênio molecular, formando o radical peróxido ( $LOO^{\bullet}$ ), o qual pode dar início a um novo processo de remoção de hidrogênio de uma nova molécula de ácido graxo gerando mais um radical  $L^{\bullet}$  e hidroperoxido (LOOH) (ABDALLA E SENA, 2008; LEOPOLD E LOSCALZO, 2009).

Produtos da peroxidação lipídica são amplamente aceitos como marcadores do estresse oxidativo. A lipoperoxidação, inicialmente, leva à formação de dienos conjugados, os quais reagem com o oxigênio molecular originando os hidroperoxidos. Estes últimos, por serem compostos instáveis, podem decompor-se em diversos aldeídos, tais como, malondialdeído (MDA), 4-hidroxinonenal (HNE) e cetonas. Foi demonstrado previamente que pacientes infartados possuem os níveis sanguíneos de MDA mais elevados que aqueles

encontrados em pacientes livres de doenças coronarianas (CHERUBINI et al., 2005).

Os produtos formados na lipoperoxidação são responsáveis pelas modificações oxidativas ocorridas na apo B-100 (TANAKA; IGUCHI; TAKETANI et al., 1999). Os aldeídos reagem com o resíduo de lisina da apo B, aumentando a carga negativa da LDLox. Este aumento na carga negativa da apo B-100 resulta em uma elevação no reconhecimento pelo receptor *scavenger* CD 36 dos macrófagos, levando ao acúmulo de LDLox por estas células e originando as células espumosas, resultando na lesão inicial da aterosclerose (YAMAGUCHI; KUNITOMO; HAGINAKA, 2002) (Figura 4).



**Figura 4.** Modificação oxidativa da LDL. O dano oxidativo na LDL afeta componentes parte protéica e lipídica da molécula. A oxidação da LDL inicia-se pela peroxidação lipídica (fosfolípidios e ésteres de colesterol), resultando na formação de dienos conjugados e hidroperóxidos lipídicos ocasionando à modificação, fragmentação e agregação da apo B-100. Adaptado de YAMAGUCHI et al. 2002.

### 1.3 LDL oxidada e anticorpo anti LDL oxidada na aterosclerose

A modificação oxidativa da LDL leva a formação de epítomos imunogênicos que estimulam a formação de anticorpos anti-LDLox que podem ser detectados no soro sanguíneo (FUKUMOTO et al., 2000).

Os linfócitos B são as células responsáveis pela síntese dos anticorpos anti-LDLox. Porém, a função dos anticorpos anti-LDLox ainda é contraditória (HANSSON, 2005).

Diversos estudos relatam que o processo de aterogênese é modulado pela resposta imunológica a LDLox. Nestes estudos foram encontrados resultados contraditórios. Alguns autores sugerem que um elevado título de anticorpo anti-LDLox esteja presente em pacientes com aterosclerose avançada, sendo considerado um marcador do estágio avançado da doença (COLLEN, 2001). Foi observado um efeito pró-aterogênico do anticorpo anti-LDLox tipo IgG, pois os complexos formados entre estes anticorpos específicos e a LDLox desencadearam uma resposta inflamatória ao se ligarem em receptores dos macrófagos, contribuindo, com isso, para formação do ateroma (SHOENFELD et al., 2004).

Outros estudos apóiam o conceito de que a resposta imune a LDLox possa ser anti-aterogênica, e a presença do anticorpo anti-LDLox, especificamente o tipo IgM, ocorra no estágio inicial da aterosclerose, contribuindo para manutenção de baixos níveis de LDLox no plasma (FUKUMOTO et al., 2000). Adicionalmente, também foi observado que anticorpos anti-LDLox presentes nas lesões ateroscleróticas iniciais são responsáveis por bloquearem a captação de LDLox pelos macrófagos, prevenindo o acúmulo de LDLox e a formação de CE. Estes autores acreditam que a presença do anticorpo anti-LDLox desempenhe uma função imunoprotetora contra o desenvolvimento da aterosclerose (PENGO, 2008; GARRIDO-SÁNCHEZ et al., 2009; LOBO et al., 2011).

Outros relatos sugerem uma fraca associação entre a presença de anticorpos anti-LDLox e a mortalidade observada nas DC (ERKKIL et al., 2005).

#### 1.4 Produção de anticorpo anti-LDLox para dosar LDLox sanguíneo

A LDLox possui um papel imunogênico no processo da aterosclerose e, por ser considerada um autoantígeno formado na lesão aterosclerótica, desencadeia a produção de anticorpos anti-LDLox, que podem ser encontrados no sangue e nas lesões de pacientes com aterosclerose (FUKUMOTO et al., 2000, HANSSON et al., 2002).

Anticorpos monoclonais e policlonais tem sido produzidos em camundongos e utilizados em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para dosar a LDLox (KIM et al., 1997; TSIMIKAS et al., 2000; HULTHE E FAGERBERG, 2002; BEVAN et al., 2003, WANG, et al., 2007; LOBO et al., 2011). Assim, o uso de anticorpos anti-LDLox representam uma importante ferramenta para avaliar a possível conexão entre LDLox no plasma e o processo aterosclerótico, estabelecendo uma relação entre a LDLox e a progressão da aterosclerose através de um diagnóstico não invasivo, quando comparado com outras ferramentas diagnósticas (DAMASCENO et al., 2006).

Os anticorpos representam cerca de 20% das proteínas plasmáticas, sendo conhecidos como imunoglobulinas (Ig) e estão presentes no soro sanguíneo de todos os animais. Tais proteínas são produzidas pelo sistema imune, secretadas pelos linfócitos, e, *in vivo*, reconhecem especificamente um antígeno alvo. São ainda produzidos como ferramenta de pesquisa ou de diagnóstico, através de processos específicos que originam anticorpos heterogêneos, formados por diferentes clones de diferentes células, chamados anticorpos policlonais. Já os provenientes de um único clone de célula, são chamados anticorpos monoclonais (HARLOW E LANE, 1988).

Na maioria dos animais superiores existem cinco classes distintas de moléculas de imunoglobulinas sendo conhecidas como: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, diferenciando-se uma das outras em tamanho, carga, composição de aminoácidos e conteúdo de carboidratos. A IgG é o anticorpo predominante nas respostas secundárias e constitui uma importante defesa do organismo, e, por este motivo, foi o anticorpo escolhido para produção do anti-LDLox neste trabalho. Os anticorpos são formados por duas cadeias leves e duas pesadas, ligadas entre si por pontes dissulfeto. Os termos leve e pesada referem-se à

massa molecular de cada cadeia protéica, sendo que as leves possuem massa molecular de 25 kDa, e as pesadas de 50 a 77 kDa (HUSE; BOHME; SCHOLZ., 2002, NUNES, 2005).

A produção de imunoglobulinas pode ser ativada em animais, tais como mamíferos (coelhos, camundongos, ovelhas e cabras), após a inoculação de um antígeno. O título dos anticorpos aumenta com os reforços de aplicação do antígeno específico, ao longo do tempo (HARLOW E LANE, 1988; NUNES, 2005).

Na imunização dos animais, a mistura do antígeno com veículo adjuvante, aumenta a resposta imune, favorecendo a produção de anticorpos e retardando a liberação do antígeno no organismo do animal, garantindo, dessa forma, a produção de anticorpos por um período mais prolongado. O adjuvante de Freund's é o mais utilizado para tal procedimento (COX E COULTER, 1997).

Na primeira imunização de um animal, para a produção de anticorpos, geralmente se utiliza adjuvante completo de Freund e nos reforços posteriores, o adjuvante incompleto de Freund. O uso de adjuvantes permite que menores quantidades de antígeno sejam usadas e a resposta a produção do anticorpo seja mais persistente. Normalmente usa-se adjuvante de Freund que é uma emulsão oleosa preparada com óleos não metabolizáveis formando um depósito que protege o antígeno de ser rapidamente catabolizado. Quando a mistura contém células mortas de *Mycobacterium tuberculosis* é dito Adjuvante Completo de Freund, se não contém é dito incompleto (BEVAN et al., 2003; WANG et al., 2007; LOBO et al., 2011). A obtenção dos anticorpos consiste no isolamento de proteínas no soro dos animais. Nos mamíferos, retira-se sangue dos animais para obtenção do soro contendo os anticorpos, seguindo-se etapas de purificação dos mesmos (HARLOW E LANE, 1988). Neste trabalho o anticorpo da classe IgG foi purificado utilizando a técnica de cromatografia por afinidade .

## 1.5 Estresses oxidativo e aterosclerose

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre o balanço pró-oxidante e antioxidante em favor da situação pró-oxidante, levando a um dano oxidativo que compromete a resposta redox celular. Assim, o estresse oxidativo pode ser ocasionado por uma diminuição dos sistemas antioxidantes e/ou por um aumento da produção de ERO/ERN (HALLIWELL, 1999, CHERUBINI et al., 2005).

As ERO, tais como: radical ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil são geradas em células aeróbicas durante a redução de oxigênio molecular por reações enzimáticas, cadeia transportadora de elétrons e autooxidação de inúmeras substâncias (BABIOR, 1999; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2006; BEDARD E KRAUSE, 2007).

O excesso de ERO ou ERN em situações de estresse oxidativo ou nitrosativo, pode induzir modificações oxidativas do DNA, proteínas, lipídeos, apoptose de células vasculares, e aumento da expressão e ativação de genes redox-sensíveis, tais como receptores para LDLox (KALIORA; DEDOUSSIS; SCHMIDT, 2006), favorecendo desta forma a progressão da aterosclerose e das doenças cardiovasculares.

A geração das ERO ou ERN é devida à ação de vários sistemas enzimáticos dentre eles: xantina oxidase, citocromo P450, fontes mitocondriais (cadeia transportadora de elétrons), óxido nítrico sintases (NOS), e de especial interesse nessa revisão, o sistema NADPH oxidase (Nox2) (ZHUKOV E ARCHAKOV, 1982; GORSKY; KOOP; COON, 1984; BLANCK et al., 1991; ZHUKOV E INGELMAN-SUNDBERG, 1999; HARRISON et al., 2003).

Como mecanismo de proteção ao estresse oxidativo e aos danos promovidos por este processo, o organismo apresenta sistemas de defesa antioxidantes, tais como as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (Gr), glutathione transferase (GST), catalase, tioredoxina reductase (Txr) e as enzimas que catalisam reações geradoras de equivalentes redutores nos compartimentos citosólico e mitocondrial: glicose 6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogluconolactona e transidrogenases. Distúrbios nestes sistemas de defesa podem levar ao

acúmulo de ERO/ERN e acelerar o desenvolvimento da aterosclerose (HILL E SINGAL, 1996 HARRISON et al., 2003).

## 1.6 NADPH oxidase e aterosclerose

Alguns estudos sugerem uma correlação entre a LDLox e a enzima NADPH oxidase vascular (RUECKSCHLOSS et al., 2001; AZUMI et al., 2002). A LDLox induz a ativação da NADPH oxidase levando a geração de  $O_2^{\bullet-}$  pelas células endoteliais e musculares lisas, intensificando o processo de disfunção endotelial e vascular (GALLE et al., 2006). Estudos demonstraram que, quando células endoteliais, artérias isoladas e outras células sanguíneas foram expostas a LDLox a formação de  $O_2^{\bullet-}$  foi aumentada (GALLE et al., 1995).

Neste trabalho foi verificada a existência de uma possível correlação entre a LDLox e o complexo formado entre o anticorpo anti-LDLox e a LDLox na ativação da NADPH oxidase fagocítica (Nox2).

As enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases constituem um grupo de complexos transmembrana, presentes em células de origem mesodérmica, incluindo os fagócitos, que catalisam a produção de  $O_2^{\bullet-}$  pela redução de um elétron do oxigênio, usando NADPH como doador de elétrons. O  $O_2^{\bullet-}$  gerado pela NADPH oxidase é a primeira espécie reativa formada e serve como ponto de partida para a produção de uma vasta variedade de oxidantes, incluindo ERO/ERN. Estes oxidantes são utilizados pelos fagócitos como uma resposta de defesa contra agentes estranhos ao organismo, ou seja, possuem ação anti-patogênica, e, portanto, essencial para a sobrevivência. Porém, em excesso, as ERO/ERN podem causar danos ao organismo, e por este motivo a produção destas espécies reativas precisa ser controlada para que só ocorra quando e onde necessário (BABIOR, 1999; JONES; HANCOCK; MORICE, 2000; BEDARD E KRAUSE, 2007).

A produção de ERO/ERN inicia-se quando o fagócito é estimulado, originando uma série de alterações metabólicas coordenadas, aproximadamente 30 segundos após a estimulação. A ativação do processo de

fagocitose estimula no fagócito o evento referido na literatura como *burst* oxidativo ou respiratório, o qual é caracterizado pelo aumento do consumo de oxigênio, aumento da glicólise anaeróbica, mobilização de cálcio intracelular e produção de ERO/ERN (BABIOR, 2004; SEGAL, 2008).

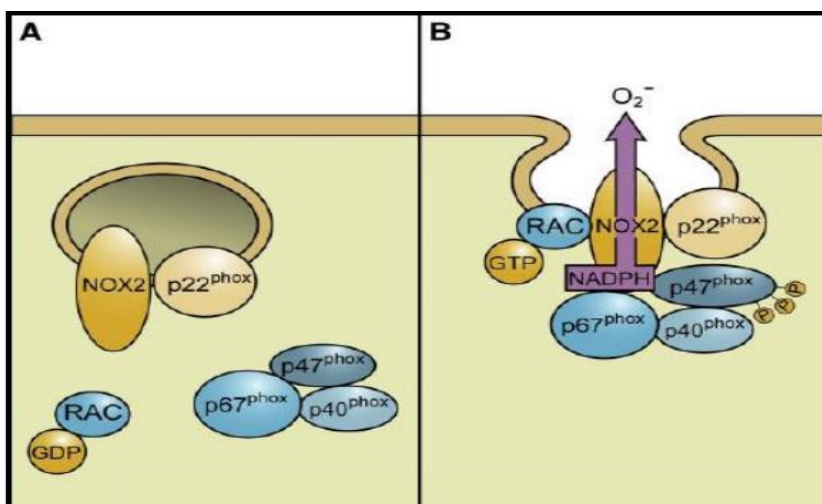
O sistema Nox2 é composto por vários componentes protéicos localizados no citosol e na membrana de vesículas secretoras e grânulos específicos (p40<sup>PHOX</sup>, phox de “phagocyte oxidase”, p47<sup>PHOX</sup>, p67<sup>PHOX</sup>, p22<sup>phox</sup> e gp91<sup>PHOX</sup>) e uma GTPase (Rac1 ou Rac2). A separação destes dois grupos de componentes em compartimentos distintos garante a regulação do complexo enzimático. Nas células em repouso, três destes componentes estão no citosol (p40<sup>PHOX</sup>, p47<sup>PHOX</sup> e p67<sup>PHOX</sup>) e os outros (p22<sup>phox</sup> e gp91<sup>PHOX</sup>) estão localizados na membrana de grânulos. Esses últimos constituem o citocromo b<sub>558</sub>. (HARPER; CHAPLIN; SEGAL, 1985; ROYER-POKORA et al., 1986; PARKOS et al., 1988; YAMAGUCHI et al., 1989; TEAHAN et al., 1990).

As duas subunidades p22<sup>phox</sup> e gp91<sup>PHOX</sup> são proteínas integrais de membrana, sendo que gp91<sup>PHOX</sup> contém os componentes responsáveis pela transferência de elétrons. A porção C-terminal dessa proteína está voltada para o lado citosólico da membrana e contém os sítios de ligação para FAD (Flavina Adenina Dinucleotideo) e NADPH. A porção N-terminal da proteína forma uma sequência de seis domínios em  $\alpha$  - hélice aos quais está ancorado um par de grupos heme (LAMBETH; KAWAHARA; DIEBOLD, 2007). Os grupos heme estão orientados perpendicularmente a ambos os lados da membrana, formando um conduto à passagem dos elétrons oriundos do NADPH citosólico em direção ao O<sub>2</sub> extracelular ou intra-fagosômico (ISOGAI; IZUKA; SHIRO, 1995). A subunidade p22<sup>PHOX</sup> apresenta na porção C-terminal uma região rica em prolina (RRP) que interage com o p47<sup>PHOX</sup> fosforilado, evento indispensável à ativação do complexo enzimático (LAMBETH; KAWAHARA; DIEBOLD, 2007). O citocromo b<sub>558</sub> desempenha uma função regulatória e suas subunidades estão inativas na célula em repouso. A ativação celular ocorre quando a célula é exposta a estímulos fisiológicos (bactérias e fungos), moléculas indutoras de quimiotaxia (anticorpos e lipídeos bioativos) ou agentes não fisiológicos como ésteres de forbol e ácidos graxos que levam à fosforilação da proteína p47<sup>PHOX</sup> presente no citosol e todo o complexo migra do citosol para a membrana, onde se associa ao citocromo b<sub>558</sub> (BABIOR,



1999; GROEMPING E RITTINGER, 2005; SUMIMOTO; MIYANO; TAKEYA, 2005).

Uma vez montado o complexo enzimático, os dois grupos heme localizados na subunidade gp91<sup>phox</sup> realizam a transferência de elétrons do NADPH citosólico para o oxigênio molecular, resultando na geração de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (CROSS, 1999). A Figura 5 ilustra a ativação do complexo Nox2, destacando-se a liberação do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> no fagossoma.



**Figura 5.** Estrutura e ativação do complexo enzimático NADPH oxidase no fagócito. Em repouso, os componentes da NADPH oxidase estão no citosol e membrana. Ativadas, o complexo formado pelas unidades citosólicas associa-se ao citocromo b<sub>558</sub>, possibilitando a transferência de elétrons do NADPH citosólico para o oxigênio molecular, o que resulta na geração de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Adaptado de BEDARD E KRAUSE, 2007.

As ERO produzidas pela NADPH oxidase constituem importantes reguladores de vias de sinalização celular, através da modulação da atividade de quinases e fosfatases ou através da regulação da transcrição gênica, dependendo da natureza das células e do ativador utilizado (JESIATIS et al., 1991; BRIGAGÃO E COLEPICOLO, 1996; BRIGAGÃO; BARROSO; COLEPICOLO, 2000).

Embora o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> não seja uma espécie oxidante forte, reações subsequentes deste radical levam à produção de ERO mais eficientes. No fagossoma ele é rapidamente convertido em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por dismutação. Na presença de sais de ferro, o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formam o radical hidroxila (HO<sup>•</sup>), que é extremamente reativo, sendo capaz de causar danos em fitas de DNA,

inativar diferentes enzimas, iniciar a lipoperoxidação de membranas. Além disso, o  $O_2^{\bullet-}$  pode sofrer protonação em meio ácido, originando a forma altamente reativa o radical hidroperoxil ( $HO_2^{\bullet}$ ). A mieloperoxidase (MPO), enzima que é liberada no fagossoma durante a fagocitose, catalisa a produção de ácido hipocloroso (HOCl), a partir da reação de  $H_2O_2$  com ânions cloro. Este ácido, altamente reativo, é capaz de oxidar diferentes biomoléculas (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2007).

### 1.7 NADPH oxidase e PDI

O mecanismo que governa a regulação da produção de ERO através da Nox é, ainda, objeto de várias pesquisas. Recentemente, foi mostrado que a Nox vascular é regulada por reagentes específicos de grupos tiol, mais especificamente pela PDI (JANISZEWSKI et al., 2000; JANISZEWSKI et al., 2006).

A proteína disulfeto isomerase (PDI) é membro da super família da tioredoxina, encontradas no lúmen do retículo endoplasmático (RE) em células eucarióticas (GOLDBERGER; EPSTEIN; ANFINSEN, 1963). Essa proteína é organizada em cinco domínios (a, b, b', a', e c), sendo composta por dois domínios catalíticos tioredoxina, a e a', que são separados por dois domínios não catalíticos, b e b' e por um domínio C-terminal ligado a uma sequência KDEL, que é um tetrapeptídeo (Lys-Asp-Glu-Leu), responsável por sinalizar a retenção ou recuperação da proteína no RE (DARBY; KEMMINK; CREIGHTON, 1996).

Cada sítio ativo contém dois resíduos de cisteínas na sequência WCGHCK, responsáveis pela atividade da PDI (EDMAN et al., 1985; DARBY; KEMMINK; CREIGHTON, 1996; XIAO et al., 2001). Esta proteína apresenta múltiplas atividades, tais como chaperona e oxidoreductase.

A atividade de chaperona molecular, durante a qual PDI assiste ao enovelamento de cadeias polipeptídicas nascentes, é essencial para evitar o enovelamento protéico incorreto (DOBSON, 2001). Já a atividade de oxidoreductase, quando PDI exerce catálise na formação, redução e

isomerização de pontes dissulfeto intra- e/ou inter-moleculares, é atribuída ao domínio CXXC, característico das enzimas da família das ditiol/dissulfeto oxidoreduases. A PDI é a única proteína da superfamília tiorredoxina que catalisa reações de isomerização, ou seja, reorganizam o posicionamento de pontes dissulfeto através de repetidos ciclos de oxidação e redução (NOIVA, 1999; WILKINSON E GILBERT, 2004; ELLGAARD E RUDDOCK, 2005)

A atividade catalítica ocorre tanto na formação ou quebra quanto na isomerização de pontes dissulfeto em diferentes substratos (Figura 6). No primeiro caso, a PDI sofre uma mudança em seu estado de óxido-redução, enquanto que, no segundo evento enzimático, que requer a enzima com os resíduos de cisteínas em estado reduzido, não resulta em nenhuma oxidação na estrutura da PDI.



**Figura 6.** Atividade catalítica na formação e rompimento e na isomerização de pontes dissulfeto intra-moleculares catalisadas por PDI. Adaptado de Wilkinson 2004.

Estresse do retículo endoplasmático (RE) causa liberação de PDI, que pode dirigir-se à membrana plasmática, com conseqüentes alterações significativas em diferentes funções celulares. Este fato é claramente mostrado em células tratadas com tunicamicina, composto capaz de determinar estresse de RE através do bloqueio de glicosilação protéica (FUJITA et al., 2002) ou com taspigargina, que atua como potente liberador de cálcio intracelular estressando o RE (OHUCHI et al., 1988).

Dois fatores são essenciais para a função chaperona do retículo. O primeiro é a manutenção de um ambiente oxidativo intra-reticular, o qual depende dos níveis de GSH/GSSG e da atividade de tiol oxidoredutases. Em segundo lugar, a manutenção de altas concentrações de cálcio intra-reticular é essencial a todas as etapas do processo secretor.

A atividade chaperona de PDI foi recentemente mostrada como essencial à entrada rápida de  $\bullet\text{NO}$  em plaquetas, o que liga diretamente a atividade desta enzima ao evento de agregação plaquetária (SUSANNAH et al., 2007). No citado trabalho, bacitracina, óxido de fenilarsina (PAO) e anticorpo anti-PDI RL90, compostos inibidores de PDI, foram capazes de inibir o acúmulo plaquetário de cGMP em resposta a vários doadores de  $\bullet\text{NO}$ , alterando a sinalização bioquímica mediada por mecanismo radicalar.

Relatos consistentes na literatura mostram uma das isoformas vasculares de NADPH oxidase, Nox1, diretamente relacionada à expressão e atividade de PDI. Células vasculares de músculos lisos de coelho transfectadas com cDNA para superexpressão de PDI produziram mais que o dobro do nível basal de ERO através de catálise de Nox1. Ainda, a expressão de componentes de outra isoforma vascular, Nox4, foi aumentada paralelamente à superexpressão induzida de PDI (FERNANDES et al., 2009).

## 2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, há uma grande busca a métodos de diagnóstico não invasivo visando às doenças coronarianas. Recentemente, o fato de que o nível plasmático de LDL oxidada foi relatado em diferentes pesquisas como a melhor correlação existente com risco de desenvolvimento de aterosclerose, levantou a hipótese do uso desse marcador como meio de diagnóstico laboratorial.

O desenvolvimento de metodologias aplicáveis para tal uso deve obedecer a alguns requisitos; (i) permitir quantificar o produto majoritário formado durante a oxidação de LDL, o qual deve ser estável e não ser formado por artefato durante a coleta e/ou estocagem da amostra; (ii) necessita ser um método reprodutível, com baixo coeficiente de variação; (iii) o método deve ser específico, sem interferência de outras biomoléculas; (iv) o método deve apresentar robustez; (v) deve apresentar sensibilidade para detecção do nível basal (“steady-state”) do analito e (vi) ter custo acessível para apresentar competitividade no mercado.

Esta proposta, que alia a pesquisa básica ao desenvolvimento de produtos competitivos se apresenta como um desafio, o qual poderá resultar em uma interação universidade/empresa que vem sendo estimulada por vários setores. Esse trabalho constitui-se termo aditivo de convênio específico entre a Unifal-MG e a empresa Biotécnica Indústria e Comércio Ltda., sediada no Município de Varginha, MG, a qual proporcionou uma colaboração crucial no desenvolvimento dessa proposta, visando futura comercialização do produto.

### 3. OBJETIVOS

O objetivo central deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para produção de anticorpos anti-LDLox que apresentasse uma execução simples e reproduzível em larga escala para futuramente propiciar o desenvolvimento de um “kit” para uso laboratorial na determinação de LDLox.

Especificamente, visamos:

- (i) Induzir modificação oxidativa in vitro de LDL humano com sistemas químicos dependentes de metal de transição e dependentes de peróxidos orgânicos/peroxidases;
- (ii) Determinar o índice de oxidação de LDL humano induzido por cobre;
- (iii) Avaliar a estabilidade do LDL humano oxidado in vitro;
- (iv) Produzir anticorpos policlonais contra LDL humano oxidado em larga escala, que possam ser utilizados na fabricação de um kit para rotina em análises clínicas;
- (v) Testar a ação da LDLox e do complexo LDLox/anticorpo anti-LDLox na ativação de macrófagos inflamatórios.

## **4. RESULTADOS**

Em concordância com o Capítulo IX, Artigo 22 das Normas Acadêmicas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, a dissertação está apresentada como uma revisão de literatura, e a Metodologia desenvolvida, bem como Resultados e Discussão, constam do artigo originado do projeto de Mestrado.

### **4.1 ARTIGO**

O artigo mostra os resultados dos processos de produção e purificação de anticorpos anti-LDL oxidada, bem como o efeito dos mesmos sobre a ativação de macrófagos.

O artigo foi submetido ao periódico *Vascular Pharmacology*, ISSN: 1537-1891, fator de impacto 2,460.

Oxidized LDL elicits protein disulfide isomerase reductase activity temporally associated with respiratory burst in macrophages

Talita A. Guimarães<sup>a</sup>, Agda Andrade<sup>b</sup>, Maísa R. P. L. Brigagão<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brazil

<sup>b</sup>Biotécnica Indústria e Comércio Ltda., Varginha, MG, Brazil

Corresponding author:

Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Instituto de Ciências Exatas

37130.000 Alfenas MG Brazil

Phone +55-35-3299-1262

Fax +55-35-3299-1384

E-mail [maisa.brigagao@unifal-mg.edu.br](mailto:maisa.brigagao@unifal-mg.edu.br)



**Abstract**

Atherosclerosis is an inflammatory disease whose progression is strongly associated to oxidative stress. Oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) is thought to have a central role in atherosclerosis development, mainly due to induction of foam cell formation from its accumulation in macrophages. Despite antibodies against ox-LDL (anti-ox-LDL) have been demonstrated in human sera, there is no consensus of its significance. To elucidate the immunogenic implication of anti-ox-LDL production, we explored the hypothesis that, as much as ox-LDL, it elicits oxidant production via NADPH oxidase activity by inflammatory macrophages. Ox-LDL alone triggered significant superoxide anion release by macrophages ( $39.7 \pm 1.14$  nmol/min/ $10^6$  cells) compared to dormant phagocytes ( $1.2 \pm 0.4$  nmol/min/ $10^6$  cells), while complex ox-LDL/anti-ox-LDL antibodies elicited stronger NADPH oxidase activity ( $107 \pm 1.16$  nmol/min/ $10^6$  cells). Protein disulfide isomerase (PDI) has been previously shown as a chaperone involved in protein translocation of NADPH oxidase components to the phagocytic membrane surface. So, we determined its reductase activity under identical stimuli. Using a fluorescent probe cleavage, we were able to demonstrate that either free or anti-ox-LDL-bounded ox-LDL prompts a vigorous PDI thiol reductase activity, event inhibited by ditionitrobenzoic acid and bacitracin. These results suggest that ox-LDL alone or anti-ox-LDL-complexed trigger PDI activity on macrophage membrane temporally correlated to NADPH activity.

**Keywords:** Atherosclerosis, low density lipoprotein; antibodies, NADP.

## 1. Introduction

Atherosclerosis is the most common cause of death in the Western world (Berliner et al., 1995; Tsompanidi et al., 2009; Libby et al., 2010, Ghosh et al., 2010). The arterial disease process is governed by immune-mediated inflammatory mechanisms (Geng and Jonasson, 2011). Hypercholesterolemia, especially high levels of low-density lipoprotein (LDL), seems to be an important risk factor accounting for severe atherosclerotic diseases (Flavahan 1992; Blaha et al., 2008). In the endothelium, LDL suffers oxidative attack by reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS), generating the lipoprotein oxidized form ox-LDL (Ross, 1999).

Additionally, enhanced serum levels of ox-LDL, as well as antibodies against its epitopes (anti-ox-LDL), are accepted predictors for endothelial dysfunction and coronary heart disease (Galle et al., 2006). However, binding of anti-ox-LDL antibodies to ox-LDL and generating of corresponding immune complexes, has not a well established immunogenic role (Fukumoto et al., 2004, Erkkil et al., 2005).

Oxidative stress, an imbalance between prooxidants and antioxidants that favors ROS/RNS deleterious action, has been identified as a risk factor for establishment and worsening of atherosclerosis, not only due to oxidants production by endothelial, vascular smooth muscle, and adventitial cells, but also by macrophages. These inflammatory cells produce superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ) when exposed to ox-LDL through activation of NADPH oxidase activity (Galle et al., 2006).

This oxidase complex, found in professional phagocytes (isoform Nox2), is triggered by diverse stimuli that promote the translocation of cytosolic components to the phagosome membrane, followed by engagement with granule-bound subunits and Rac GTPases. Activation of Nox2 results in the respiratory burst, a cellular event

characterized by a rapid, cyanide-insensitive increase in phagocyte oxygen uptake, ROS/RNS release, glucose consumption and intracellular calcium levels adjustment (Lambeth et al., 2008).

Protein disulfide isomerase (PDI) is an ubiquitously expressed enzyme that is widely distributed in eukaryotic tissues at relatively high concentrations in the endoplasmic reticulum (ER) (Molinari, 2007). A central organelle in the cellular secretory pathway, the ER is enriched in enzymes that assist the folding process and is dedicated to proper protein assembly, trafficking and secretion (McCracken and Brodsky, 2005; Ruddock and Molinari, 2006; Shimizu and Hendershot, 2007). This chaperone traffic from ER to membrane is associated with several NADPH oxidase isoforms, including Nox1, Nox4 and Nox2 in native vascular smooth muscle cells (VSMC) and in HEK293-Nox transfected cells (Janiszewski et al., 2005, 2006). Similar association and functional interactions have been recently identified in macrophages and neutrophils (Laurindo et al., 2008; Paes et al., 2011). So, we intended to verify whether the Nox2 complex found in macrophages is activated by ox-LDL/anti-ox-LDL immune complex in the same way that ox-LDL alone. Also, it was explored the parallel PDI reductase activity found in macrophage associated to phagocytes activation.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Chemicals**

LDL was purchased from Creative Laboratory Products, sodic azide, 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP), and 2-thiobarbituric acid (TBA) were purchased from Sigma. Freund's complete/incomplete adjuvants were acquired from Laborclin. Reduced

and oxidized glutathione, Sephadex G-25, dithiothreitol (DTT) were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Eosin 5-isothiocyanate was acquired from Invitrogen Molecular Probes.  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were purchased from Vetec Ltda. All other chemical reagents used were of analytical grade.

## 2.2. Oxidation of native LDL

Native human LDL (1g) was oxidized by incubation in phosphate buffered saline solution (PBS, pH 7.4) with 5  $\mu\text{M}$  copper sulfate (37°C, 3 h), as previously described (Ermak et al., 2008). The LDL oxidation extended was monitored by conjugated diene (CD) formation (spectrophotometrically determined,  $\lambda_{324\text{nm}}$ ) and malondialdehyde (MDA) appearance (measured by high performance liquid chromatography -HPLC- coupled to a fluorescent detector,  $\lambda_{\text{exc}}=515\text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emi}}=553\text{ nm}$ , according to Ziouzenkova and collaborators (1998). CD and MDA measurements were done immediately after  $\text{CuSO}_4$  addition, and every 10 minutes during the first hour of incubation. After this period, aliquots were taken for analysis from incubation media every 15 minutes until to complete 2 hours of reaction. At the end of incubation, the reaction was stopped by addition of 1mM EDTA (Bevan et al., 2003) and passed through a membrane filter (0.22  $\mu\text{m}$ ) in sterile conditions. The samples, after extensive dialysis against PBS (24 h) to remove excess  $\text{CuSO}_4$ , were kept at 4°C and protected from light until following assays (Deng et al., 2009).

Integrity of obtained ox-LDL were evaluated by classical electrophoresis performed as described by Laemmli (29) followed by western blotting detection with commercial primary anti-LDL (copper oxidized) antibody (Abcam, dilution 1:5,000)

and secondary peroxidase conjugate antibody (1:5,000), using ECL® detection reagents (GE Healthcare).

### **2.3. Preparation of polyclonal anti-ox-LDL antibodies**

Goats were obtained from local breeding of Biotecnica Indústria e Comércio, Varginha, MG, Brazil. The experiments were performed after approval from Ethics Committee in accordance with an institutional authorized protocol based on the directive 2010/63/European Union.

A polyclonal antiserum was prepared by immunization of goats. Previous prepared ox-LDL (60 µg) was emulsified (Freund's complete adjuvant) and injected subcutaneously in goats, followed by an initial cycle of antigen application (increasing concentrations up to 630 µg, Freund's incomplete adjuvant) every 21 days. A final cycle of subcutaneous injections was performed with decreasing ox-LDL concentrations (630 to 60 µg). Tests bleed were taken at initial day and every 21° day after each boost antigen. Immunodifusion assays for antibody production were performed after each serum goat sample collection by determination of anti-ox-LDL titer (Bevan et al., 2003). All followed experiments were performed when antibody titer reached 1:32.

### **2.4. Anti-ox-LDL antibodies partial purification**

#### **2.4.1. Ammonium sulphate precipitation and glutaraldehyde binding IgG partial purification**

Equal volumes of goat serum and ammonium sulfate saturated solution (50% m/v) were gently mixed (4°C, 12 h). After centrifugation (10,000xg, 20 min), pellet was washed twice with the same saturated solution and the final precipitate was dissolved in distilled water and dialyzed against phosphate buffered saline solution (10 mM PBS plus 0.15 M NaCl, pH 7.2).

Ox-LDL and bovine serum albumin (1:4) dissolved in 0.5M Tris, pH 7.4, was added to 2.5% m/v glutaraldehyde. After 3 hours at room temperature, the resulting gel received an addition of 1M Tris, pH 7.4. Subsequent to centrifugation (4,000xg, 10min, twice), 0.2M glycine-HCl pH 2.8 were added, the solution was centrifuged again and neutral pH value achieved by adding 1M Tris, pH 7.4, and exhaustively washed with distilled water. 1M ethanolamine, pH 7.4, was added and reaction medium remained for 12 h at 4°C. When absorbance (280 nm) from washed solution (1M Tris, pH 7.4) reaching value equal to or less than 0.05, the formed gel received the goat serum previously treated with ammonium sulfate solution (item 2.4.1.) under constant stirring (1 h). After centrifugation (4,000xg, 10min, 4°C), the obtained supernatant, rich in anti-ox-LDL antibodies, was quantified to determine IgG concentration (280nm), such molar extinction coefficient ( $\epsilon=1.35M^{-1}.cm^{-1}$ ) was obtained from commercial IgG. Protein concentration was achieved with use of Biotécnica Indústria e Comércio Ltda. specific kit, using Cobas Mira Plus apparatus. Final sample received sodium azide (0.09% m/v) and immunodiffusion assays for antibody detection were performed (Bevan et al., 2003). Aliquots were removed to electrophoresis and western blotting assays to confirm anti-ox-LDL antibodies purification.

#### **2.4.2. IgG purification by affinity chromatography**

IgG partial purification through affinity chromatography was performed on a G Protein Sepharose 4 (fast flow, GE Healthcare). Equilibration buffer was 0.02M sodium phosphate, pH 7.5, and eluting buffer was 0.1M glycine (pH 2.7). The column (20 cm x 16 mm) was washed with equilibration buffer, and after sample application, elution was performed (10 ml.min<sup>-1</sup>). The collected fractions (AKTA Prime Plus GE Healthcare) displaying high absorbance value (340 nm) were pooled and neutralized (1M Tris-HCl, pH 7.0) and received sodium azide (0.09% m/v).

Following these processes, aliquots from obtained samples were subjected to previous described methodology using glutaraldehyde and IgG levels and total protein determination were performed in identical way. Also, immunodiffusion assays for antibodies detection were done (Bevan et al., 2003) and electrophoretic analysis and detection by western blotting were done.

## **2.5. Inflammatory macrophage preparation**

Swiss male mice (25-28 g, 6-8 weeks age) were obtained from local breeding of Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brazil. The animals were housed in plastic cages, and water and food were available *ad libitum*. The experiments were performed after approval from Ethics Committee in accordance with an institutional authorized protocol based on the directive 2010/63/European Union.

Inflammatory macrophage were obtained and purified as previously described (Brigagão and Colepicolo, 1996). Briefly, the animals were injected intraperitoneally with 1.0 ml of 12% (w/v) sterile sodium caseinate and, after 4 days the peritoneal cells were harvested with ice-cold phosphate buffered saline (PBS). Subsequent to centrifugation (1,000xg, 10 min), pelleted cells were resuspended in D-PBS-G (1.35

mg/ml D-glucose), and the number of cells was determined by counting in an AO Spencer hemacytometer chamber. All experiments were performed with cell suspensions containing  $1 \times 10^6$  macrophages/ml and cellular viability was checked with Trypan blue exclusion.

## **2.6. Macrophage Nox2 activity assay**

Inflammatory macrophage Nox2 activity was spectrophotometrically determined through cytochrome *c* reduction (550 nm) as previously described (Cohen and Chovaniec, 1987). The reaction was monitored during 2 min and data from the initial 60 s were used to calculate  $O_2^{\bullet -}$  production utilizing  $\epsilon = 21,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Cells were incubated (37°C, 15 min) with subsequent addition of Nox2 stimulation (native human LDL, ox-LDL or complex ox-LDL/anti-ox-LDL;  $50 \mu\text{g}/10^6$  macrophages). Controls were performed in all experiments using macrophages in a dormant state incubated with vehicle alone.

## **2.7. Complex oxLDL/antibody anti-oxLDL action on the reductase activity of PDI on macrophages suspensions**

### **2.7.1. Preparation of fluorescent probe to measure thiol reductase activity**

The assays were performed using a previously described probe (Raturi et al., 2007). Briefly, oxidized glutathione (GSSG) was incubated with molar excess (10 times) of eosin 5-isothiocyanate in potassium phosphate buffer (100 mM, 2 mM EDTA, pH 8.8) for 8 h at room temperature. The non-fluorescent dimer dieosin glutathione disulfide



(Di-E-GSSG) synthesized was chromatographic purified (100 mm x 10 mm Sephadex G-25 column, elution buffer potassium phosphate 0.1 M, 2mM EDTA, pH 7.00, flow rate 1ml.min<sup>-1</sup>). Aliquots eluted with high absorbance values (521 nm) were pooled together (aliquots 5 to 10) and Di-E-GSSG quantified ( $e = 88,000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). The obtained Di-E-GSSG and used as a pseudosubstrate for thiol reductase activity estimation.

To monitor Di-E-GSSG enzymatic cleavage, a standard plot was generated with commercial purified bovine liver PDI, such appearance of fluorescent monomer eosin reduced glutathione (E-GSH), due to vicinal eosin moieties separation by reduction of disulfide bonds founded in Di-E-GSSG was monitored ( $\lambda_{\text{exc}}=521\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{emi}}=542\text{nm}$ ). Experiments were performed on a Varian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer and the results were expressed as nM of E-GSH produced per minute (Raturi et al., 2007).

### **2.7.2. Macrophage thiol reductase activity**

Macrophage suspensions ( $10^6/\text{ml}$ ) on D-PBS-G buffer plus 5  $\mu\text{M}$  DTT to keep thiol reductase on reduced state were maintained on resting state or triggered with the same stimuli used to elicit Nox2 activity (item 2.6.1.). Additions of bacitracin (2mM) or ditionitrobenzoic acid (DTNB, 2.5mM) to cellular medium incubation (10 min, 37°C) were done to assess the thiol reductase specificity. Assays were performed immediately after Di-E-GSSG (150nM) addition to macrophage suspensions, in which the fluorescence intensity was scanned and quantified exactly as described on item 2.7.1.

### **2.8. Statistical analysis**

All data were expressed as mean values  $\pm$  standard deviation (S.D.) from three independent experiments. The comparisons among the different groups were performed by ANOVA followed by Tukey *t* test. A *p* value less than 0.05 was accepted as statistically significant.

### **3. Results**

#### **3.1. Chemical oxidation of native human LDL**

Copper-induced ox-LDL production was monitored by CD and MDA appearance. These markers of lipid peroxidation increased up to 120 min, reaching then the stabilization. The integrity of this obtained ox-LDL was confirmed by western blotting detection with commercial antibodies, which reacted slightly with native human LDL (data not shown).

#### **3.2. Polyclonal anti-ox-LDL antibodies purification**

Purification was performed by 50% saturated ammonium sulphate solution followed by glutaraldehyde technique separation. Also, affinity chromatography, with or without additional glutaraldehyde binding methodology. Purification anti-ox-LDL antibodies was analyzed by electrophoresis and confirmed by western blotting. Figure 1 A shows that chromatographic method followed by glutaraldehyde binding methodology was the most efficient. As shown in Figure 1 B, the partially purified anti-

ox-LDL antibodies were able to recognize ox-LDL, with a slow signal due to native human LDL.

### **3.3. Macrophage respiratory burst quantified by superoxide anion release**

The action of native human LDL, ox-LDL and oxLDL/anti-ox-LDL complex on macrophage respiratory burst was evaluated. Table 1 shows that native human LDL was unable to elicit superoxide anion release, while ox-LDL triggers strong Nox2 activity ( $39.7 \pm 1.14$  nmol/min/ $10^6$  cells). Significantly, the immune complex ox-LDL/anti-ox-LDL prompted a greater oxidase response ( $107 \pm 1.16$  nmol/min/ $10^6$  cells), almost three times that due ox-LDL. It is important to notice that increase of any stimuli concentration caused variation on the superoxide anion release by macrophages, pointing to a maximum stimulation of macrophage Nox2 system in these conditions

### **3.4. PDI activity on macrophages suspensions**

The pseudosubstrate Di-E-GSSG is a recently introduced fluorescent probe for monitoring disulfide reductase activity. The fluorescent moieties of Di-E-GSSG are covalently attached to the two *N*-terminal residues of GSSG resulting in fluorescence self-quenching (FSQ) and rendering the molecule relatively non-fluorescent. Upon addition of reduced thiol reductase, Di-E-GSSG disulfide bond is cleaved releasing proximity constraints and enhancing fluorescence (Raturi et al. 2007). As shown in Figure 2, the probe alone elicited a weak fluorescence, probably due to non-complexed eosin. Also, it is clear that dormant macrophages present thiol reductase activity, although it corresponds to an insubstantial enzymatic cleavage of Di-E-GSSG.

However, when macrophage suspensions were incubated with native LDL, thiol reductase activity was weakly increase, even it was'nt statistically significant when compared to dormant cells. Remarkably, ox-LDL triggers a strong thiol reductase activity, about 1.5 times that found in unstimulated macrophages and the immune complex ox-LDL/anti-ox-LDL was able to elicit the larger detectable enzymatic activity, reaching three times thiol disulfide bound cleavage. To test thiol reductase activity, DTNB and bacitracin, two PDI inhibitors have been added to medium assays, whose results are showed in Figure 3. Both compounds led to decreased of E-GSH appearance from Di-E-GSSG rupture, pointing to enzyme PDI as the main responsible by thiol reductase activity.

#### **4.Discussion**

Atherosclerotic plaques contain almost all the major cellular components of the innate and adapted immune systems, such as lymphocytes, macrophages and dendritic cells, which recognize and react with atherogenic antigens, e.g., oxLDL (Geng and Jonasson, 2011). Ox-LDL is a proatherogenic lipoprotein, accumulating in the vascular wall and contributing to the pathogenesis of vascular dysfunction early in the development of atherosclerosis. Enhanced serum levels of ox-LDL, as well as antibodies against its epitopes, are predictive for endothelial dysfunction and coronary heart disease. ROS/RNS over production is a central factor in the worsening of this pathological condition, mainly via activation of the diverse NADPH oxidase isoforms (Galle, et al., 2006, Rueckschloss, et al., 2001, Azumi et al., 2002 ).

Ox-LDL seems to be an immunogenic molecule that stimulates the induction of anti-ox-LDL antibodies (Fukumoto et al., 2000; Geng and Jonasson, 2011). These antibodies are exceptional among the autoantibodies prevalent in atherosclerosis: on the one hand, a correlation was found between the existence and titers of anti-ox-LDL antibodies and the extent of atherosclerosis and inflammatory variables (Collen, 2001). Complexes ox-LDL/IgG significantly enhanced ox-LDL uptake by macrophage and suggest that autoantibodies cross-reactive with ox-LDL may provide a pathogenic mechanism for accelerated atherosclerosis (Shoenfeld et al., 2004). On the other hand, experimental data indicate that anti-ox-LDL antibodies may be protective (Shoenfeld et al., 2004; Fukumoto et al., 2000, Pengo, 2008; Garrido-Sánchez et al., 2009; Lobo et al., 2011).

Phagocytic Nox2 is an important source of oxidants in inflammatory conditions (Rueckschloss et al., 2001, Azumi et al., 2002). The oxidase activity is triggered through assembly of diverse components that migrates from cytosol and granules to phagosomal membrane. Among the different compounds described as Nox2 and analogous oxidases inhibitors, are thiol oxidants, such as *N*-ethylmaleimide and phenylarsine oxide, a sulfhydryl reagent for thiol groups, such inhibition mechanism is preventing assembly of the oxidase complex (El-Benna et al., 2010).

The chaperone PDI, which has on the active site the CXXC sequence, acts as an effective modulator of the thiol redox state of cell membranes (Siems et al., 1997; Wilkinson and Gilbert, 2004; Santos et al., 2009; Margaritis et al., 2010). In this place, to where PDI migrates from ER after signal peptide KDEL cleavage, the protein presents remarkable reductase activity (Raturi et al., 2007). Our goal was to investigate the interaction between PDI reductase activity and Nox2 activities in macrophages stimulated by ox-LDL and the immune complex ox-LDL/anti-ox-LDL antibodies.

The regulation of Nox2 activity is made possible primarily by two distinct mechanisms: (i) separation of the oxidase subunits into distinct subcellular compartments during the resting state and (ii) modulation of reversible protein-protein interactions between them (Groemping and Rittinger, 2005). Therefore, factors that affect the assembly of subunits and conformational changes to their structure have a central role in the control of the respiratory burst.

Previous reports have shown by western blot analysis that PDI in macrophages is closely associated with the phagosome membrane, where the Nox2 subunit cytochrome  $b_{558}$  is found. In smooth muscle cells, PDI was also found in the membrane fraction, and immunofluorescence assays disclosed a spatial colocalisation of PDI and NADPH oxidase subunits (Santos et al., 2009). We therefore investigated macrophages membrane PDI activity by probing the reductase action of this chaperone.

We show here that ox-LDL and the complex ox-LDL/anti-ox-LDL trigger robust macrophage respiratory burst. Parallel, the reductase PDI activity, that occurs discretely on dormant macrophages, is strongly elicited by the same stimuli, suggesting matched events in phagocytes. Dithiol oxidoreductases, especially those belonging to the thioredoxin superfamily, are known to be important in redox signalling mechanisms (Arrigo, 1999; Clissold and Bicknell, 2003; Wilkinson and Gilbert, 2004). Within the thioredoxin superfamily, PDI and their analogues catalyse isomerisation reactions, rearranging the positions of disulfide bonds through repeated cycles of oxidation and reduction (Ferrari and Soling, 1999; Noiva, 1999; Ellgaard and Ruddock, 2005). Leukocytes, despite their short half-life and low levels of ribosomes and ER, abundantly express PDI and release it in soluble form when stimulated (Bassuk et al., 1990).

It is important to note that the two macrophages responses, respiratory burst and PDI activity, emerged synchronously in response to ox-LDL alone or to complex ox-LDL/anti-ox-LDL .

It is well known that the respiratory burst elicits intracellular production of radical species that act as second messengers to elicit specific biochemical pathways implicated in the triggering and maintenance of Nox2 activity (Dahlgren and Karlsson, 1999). This specific event might be responsible by changes in redox state in stimulated macrophages, allowing PDI release from ER to membrane, in order to sustained Nox2 assembly.

In summary, our results show that ox-LDL and immune complex ox-LDL/anti-ox-LDL antibodies stimulate Nox2 activity and PDI reductase activity on macrophages phagocytic membrane, point out to synchronized events. Taken together, these results point to an immunogenic action of ox-LDL alone or complexed to respective antibodies that resulting in worsening of oxidative stress state linked to atherosclerosis.

#### Acknowledgments

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). M.R.P.L. Brigagão is member of the INCT de Processos Redox em Biomedicina-Redoxoma (CNPq Process: 573530/2008-4). T.A. Guimarães was a depositary of a partial scholarship from CAPES and FAPEMIG.

## REFERENCES

- Arrigo, A.P., 1999. Gene expression and the thiol redox state. *Free Rad. Biol. Med.* 27, 936-944.
- Azumi, H.; Inoue, N.; Ohashi, Y.; Terashima, M.; Mori, T.; Fujita, H.; Awano, K.; Kobayashi, K.; Maeda, K.; Hata, K.; Shinke, L.; Kobayashi, S.; Hirata, K.; Kawashima, S.; Itabe, H.; Hayashi, Y.; Imajoh-Ohmi, S.; Itoh, H.; Yokoyama, M., 2002. Superoxide Generation in Directional Coronary Atherectomy Specimens of Patients With Angina Pectoris : Important Role of NAD(P)H Oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22, 1838-1844.
- Bassuk, J.A., Capodici, C., Berg, R.A., 1990. Protein disulphide isomerase from human peripheral blood neutrophils. *J. Cell. Physiol.* 144, 280-286.
- Bevan, R. J.; Durand, M. F.; Hickenbotham, P. T.; Kitas, G. D.; Patel, P. R.; Podmore, I. D.; Griffiths, H. R.; Waller, H. I.; Lunec., 2003. Validation of a novel Elisa for measurement of MDA – LDL in human plasma. *Free Radical Biology & Medicine.* 35, 517-527.
- Berliner, J. A.; Navab, M.; Fogelman, A. M.; Frank, J. S.; Demer, I. I.; Edwards, P. A.; Watson, A. D.; Lusis, A. J., 1995. Atherosclerosis: Basic Mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation.* 91, 2488-2496.
- Blaha, M. J.; Blumenthal, R. S.; Brinton, E. A.; Terry, A.; Jacobson, T. A., 2008. The importance of non-HDL cholesterol reporting in lipid management. *Journal of Lipidology.* 2, 267-273.
- Brigagão, M.R.P.L., Colepicolo, P., 1996. Oscillations in superoxide anion release by polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by human saliva. *Biol. Rhythm Res.* 27, 261-268.



- Cohen, H.J., Chovaniec, M.E., 1987. Superoxide generation by digitonin-stimulated guinea pig granulocytes: a basis for a continuous assay monitoring superoxide production and for the study of the activation of the generating system. *J. Clin. Invest.* 61, 1081–1087.
- Collen, D., 2003. Antibodies against oxidized LDL for non-invasive diagnosis of atherosclerotic vascular disease. *European Heart Journal.* 22, 1517-1518.
- Clissold, P.M., Bicknell, R., 2003. The thioredoxin-like fold: hidden domains in protein disulfide isomerases and other chaperone proteins. *BioEssays.* 25, 603-611.
- Dahlgren, C., Karlsson, A., 1999. Respiratory burst in human neutrophils. *J. Immunol. Methods.* 232, 3–14.
- Deng, T.; Zhang, L.; Ge, Y.; Lu, M.; Zheng, X., 2009. Redistribution of intracellular calcium and its effect on apoptosis in macrophages: Induction by oxidized LDL. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 63, 267-274.
- El-Benna, J., Dang, P.M.C, Périani, A., 2010. Peptide-based inhibitors of the phagocyte NADPH oxidase. *Biochem. Pharmacol.* 80, 778–785
- Ellgaard, L., Ruddock, L.W., 2005. The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep.* 6, 28–32.
- Ermak, N.; Lacour, B.; Druke, T. B.; Vicca, S., 2008. Role of reactive oxygen species and Bax in oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis of human monocytes. *Atherosclerosis.* 200, 247–256.
- Erkkil, A. T.; Narvanen, O. B.; Lehto, S.; Usitupa, M. I. J.; Herttuala, S., 2005. Antibodies against oxidized LDL and cardiolipin and mortality in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 183, 157–162.
- Ferrari, D.M., Soling, H.D., 1999. The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem. J.* 339, 1-10.

- Flavahan, N. A., 1992. Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. *Circulation*. 85,1927-1938.
- Fukumoto, M.; Shoji, T.; Emoto, M.; Kawagishi, T.; Okuno, Y.; Nishizawa, Y., 2000. Antibodies Against Oxidized LDL and Carotid Artery Intima-Media Thickness in a Healthy Population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20, 703-707.
- Galle, J.; Hansen-Hagge, T.; Wanner, C.; Seibold, S., 2006. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. *Atherosclerosis*. 185, 219-226.
- Garrido-Sánchez, I.; Chinchurreta, P.; García-Fuentes, E.; Mora, M.; Tinahones, F. J., 2009. A higher level of IgM anti-oxidized is associated with a lower severity of coronary atherosclerosis in patients on statins. *International Journal of Cardiology*. 2, 1-2.
- Geng, Y. J.; Jonasson, L., 2011. Linking immunity to atherosclerosis: Implications for vascular pharmacology — Atribute to Göran K. Hansson. *Vascular Pharmacology*.
- Ghosh, S.; Zhao, B.; Bie, J.; Song, J., 2010. Macrophage cholesteryl ester mobilization and atherosclerosis. *Vascular Pharmacology*. 52, 1–10.
- Groemping, Y., Rittinger, K., 2005. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem. J*. 386, 401-416.
- Janiszewski, M., Lopes, L.R., Carmo, A.O., Pedro, M.A., Brandes, R.P., Santos, C.X., Laurindo, F.R., 2005. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem*. 280, 40813-40819.
- Janiszewski, M; Schröder, K; Busse, R; Laurindo, F; Brandes, R.P., 2006. Protein disulfide isomerase is a central regulator of NADPH oxidase activity. *Vascular Pharmacology*. 45, A10.01, e71–e78.

Lambeth, J. D.; Kawahara, T.; Diebold, B., 2007. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 319.

Laurindo, F.R., Fernandes, D.C., Amanso, A.M., Lopes, L.R., Santos, C.X., 2008. Novel Role of Protein Disulfide Isomerase in the Regulation of NADPH Oxidase Activity: Pathophysiological Implications in Vascular Diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1101–1113.

Libby, P.; Okamoto, Y.; Rocha, V. Z.; Folco, E., 2010. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J.* 74, 213-220.

Lobo, J. C.; Mafra, D.; Farage, N. E.; Faulin, T. E. S.; Abdalla, D. S. P.; Nóbrega, A. C. L.; Torres, J. P. M., 2011. Increased electronegative LDL and decreased antibodies against electronegative LDL levels correlate with inflammatory markers and adhesion molecules in hemodialysed patients. *Clinica Chimica Acta.* 412, 1788–1792.

Margaritis, A., Priora, R., Frosali, S., Di Giuseppe, D., Summa, D., Coppo, L., Di Stefano, A., Di Simplicio, P., 2010 The role of protein sulfhydryl groups and protein disulfides of the platelet surface in aggregation processes involving thiol exchange reactions. *Pharmacol. Res.* doi:10.1016/j.phrs.2010.09.004.

McCracken, A. A., Brodsky, J.L., 2005. Recognition and delivery of ERAD substrates to the proteasome and alternative paths for cell survival, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 300, 17–40.

Molinari, M., 2007. N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal, *Nat. Chem. Biol.* 3, 313–320.

Noiva, R., 1999. Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 10(5), 481-493.

Paes, A. M., Veríssimo, S. F., Guimaraes, L. L. ; Bautista, A. C., Takiuti, J. T., Santos, C. X. C ; Janiszewski, M., Laurindo, F. R. M., Lopes, L. R. 2011. Protein disulfide

isomerase redox-dependent association with p47phox. Evidence for an organizer role in leukocyte NADPH oxidase activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 90, 799-810.

Pengo, V., 2008. Antibodies to oxidized LDL/ $\beta$ 2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome patients with venous and arterial thromboembolism. *Thromb Res.* 122, 556-559.

Raturi, A., Mutus, B., 2007. Characterization of redox state and reductase activity of protein disulfide isomerase under different redox environments using a sensitive fluorescent assay. *Free Rad. Biol. Med.* 42, 62-70

Ross, R., 1999. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 340, 115-126.

Ruddock, L.W., Molinari, M., 2006. N-glycan processing in ER quality control, *J. Cell. Sci.* 119, 4373–4380.

Rueckschloss, U.; Galle, J.; Holtz, J.; Zerkowski, H. R.; Morawietz, H., 2001. Induction of NAD(P)H Oxidase by Oxidized Low-Density Lipoprotein in Human Endothelial Cells : Antioxidative Potential of Hydroxymethylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitor Therapy. *Circulation.* 104, 1767-1772.

Santos, C.X.C., Stolf, B.S., Takemoto, P.V.A., Amanso, A.M., Lopes, L.R., Souza, E.B., Goto, H., Laurindo, F.R.M., 2009. Protein disulfide isomerase (PDI) associates with NADPH oxidase and is required for phagocytosis of *Leishmania chagasi* promastigotes by macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 86, 989-998.

Shimizu, Y., Hendershot, L.M., 2007. Organization of the functions and components of the endoplasmic reticulum, *Adv. Exp. Med. Biol.* 594,37–46.

Shoenfeld, Y., Wu, R., Dearing, L.D., Matsuura, E., 2004. Are anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies pathogenic or protective? *Circulation.* 110, 2552-2558.

Siems, W.C., Capuozzo, E., Verginelli, D., Salerno, C., Crifó, C., Grune, T., 1997. Inhibition of NADPH oxidase-mediated superoxide radical formation in PMA-

stimulated human neutrophils by 4-hydroxynonenal-binding to –SH and -NH<sub>2</sub> groups, Free Rad. Res. 27, 353-358.

Tsompanidi, E. M.; Brinkmeier. M. S.; Fotiadou. E. H.; Giakoumi. S. M.; Kypreos. K. E., 2009. HDL biogenesis and functions: Role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. Atherosclerosis. 208, 3-9.

Wilkinson, B., Gilbert, H.F., 2004. Protein disulfide isomerase. Biochim Biophys Acta. 1699, 35-44.

Ziouzenkova, O.; Sevanian, A.; Abuja, P.A.; Ramos.; Esterbauer, P. H., 1998. Copper Can Promote Oxidation of LDL by Markedly Different Mechanisms. Free Radical Biology and Medicine. 24, 607-623.

#### Figure Captations

Figure 1. Partial isolation and immune characterization of polyclonal anti-ox-LDL antibodies. A. Eletrophoretic analysis of antibody samples obtained from ammonium sulphate precipitation and glutaraldehyde methodology (lane 2); chromatographic isolation (lane 3); chromatographic isolation followed by glutaraldehyde methodology (lane 4); standard IgG (lane 5). Lane 1 refers to molecular weight markers (kDa). B. Western blotting analysis using as primary antibodies anti-ox-LDL (1:5,000) obtained from chromatographic isolation followed by glutaraldehyde methodology. Lane 1: human ox-LDL copper-oxidized (20 µg), Lane 2: native human LDL (20µg). Secondary antibody used was peroxidase labeled (1:5,000) and ECL® detection reagents (GE Healthcare).

Figure 2. Fluorescence emission ( $\lambda_{exc}=521nm$ ,  $\lambda_{emi}=542nm$ ) due to PDI activity on macrophage suspensions ( $10^6$  cells/ml). Experimental group 1 refers to fluorescent probe Di-E-GSSG alone. Cells were maintained on resting state (experimental group 2) or triggered with native LDL (experimental group 3), ox-LDL (experimental group 4) or complex ox-LDL/anti-ox-LDL antibodies (experimental group 5). All stimuli were used in identical concentrations ( $50\mu g/10^6$  native LDL, ox-LDL, complex ox-LDL/anti-ox-LDL antibodies/ macrophages) and the results were related to dormant cells and shown as mean  $\pm$ s.d. at least from three independent experiments performed in triplicate. \* $p<0.01$ . \*\* $p<0.05$ .

Figure 3. PDI inhibitor effect on fluorescence emission by macrophages suspensions. Phagocytes ( $10^6$  cells/ml) received bacitracin (2mM) or DTNB (2.5mM) additions before native, free or complexed ox-LDL. Cells were maintained on resting state or triggered with complex ox-LDL/anti-ox-LDL antibodies ( $50\mu g/10^6$  cells) after bacitracin or DTNB incubation (15 min,  $37^\circ C$ ) and Di-E-GSSG added to verify macrophage PDI activity. Experimental samples: .Di-E-GSSG (experimental group 1); Di-E-GSSG + cells (experimental group 2); .Di-E-GSSG + cells + complex ox-LDL/anti-ox-LDL antibodies (experimental group 3); Di-E-GSSG + cells + Bacitracin + complex ox-LDL/anti-ox-LDL antibodies (experimental group 4); Di-E-GSSG + cells + DTNB + complex ox-LDL/anti-ox-LDL antibodies (experimental group 5). Results were related to dormant cells and shown as mean  $\pm$ s.d. at least from three independent experiments performed in triplicate. \* $p<0.05$ . \*\* $p<0.01$

Table 1. Superoxide anion release by inflammatory macrophages under atherogenic stimuli. Native human LDL, ox-LDL alone or antibodies-complexed were used as triggering agents. NADPH oxidase activity was monitored through cytochrome *c* reduction (550 nm).

Macrophages stimuli (50 $\mu$ g/10 <sup>6</sup> cells)	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> release (nmol/min/10 <sup>6</sup> cells)
None	n.d.
Native LDL	2.8 $\pm$ 0.65
Ox-LDL	39.7 $\pm$ 1.14 <sup>a</sup>
Ox-LDL/anti-ox-LDL complex	107 $\pm$ 1.16 <sup>a</sup>

Results are expressed as mean $\pm$ s.d. from three experiments performed in triplicate. Statistical analysis were performed by comparing results from ox-LDL and from ox-LDL/anti-ox-LDL complex to native LDL. N.d.=not detectable. <sup>a</sup>  $p$ <0.01.

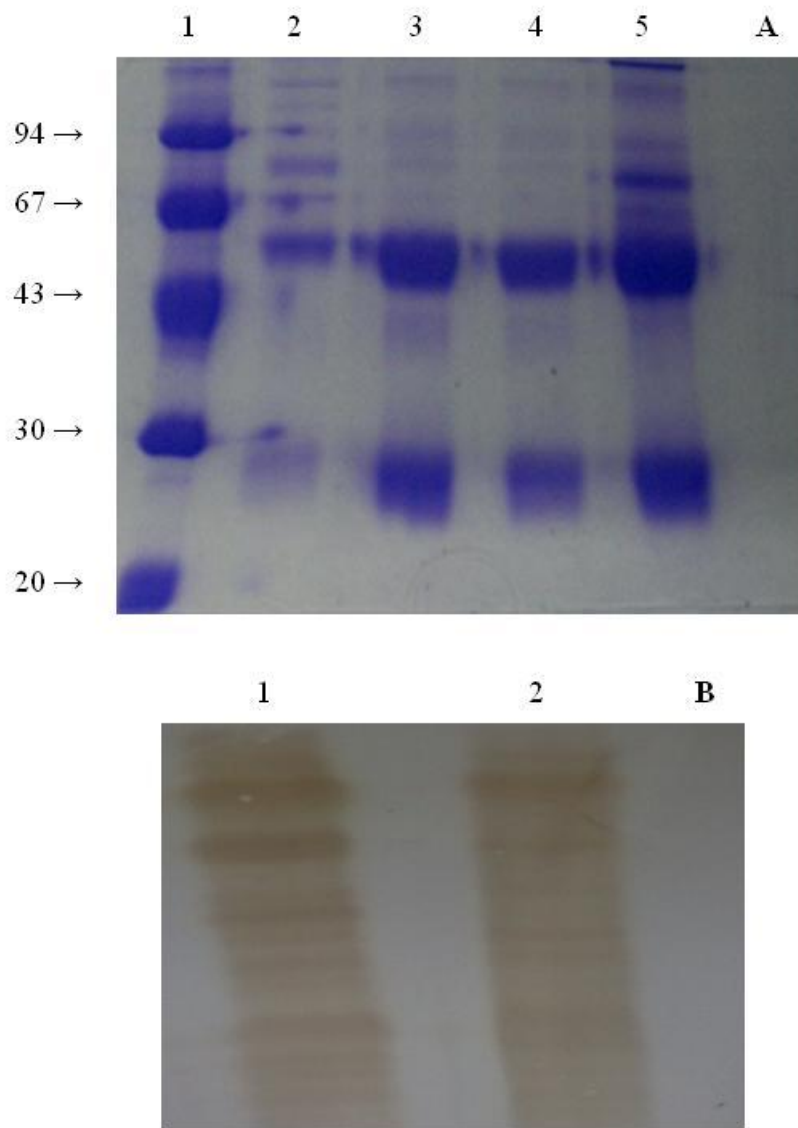


Figure 1.



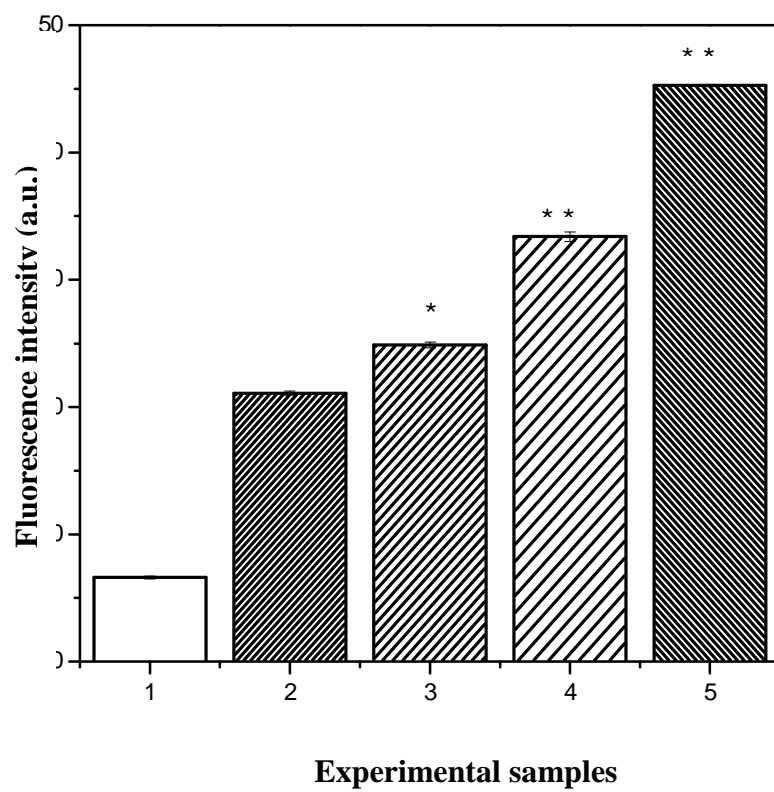


Figure 2.

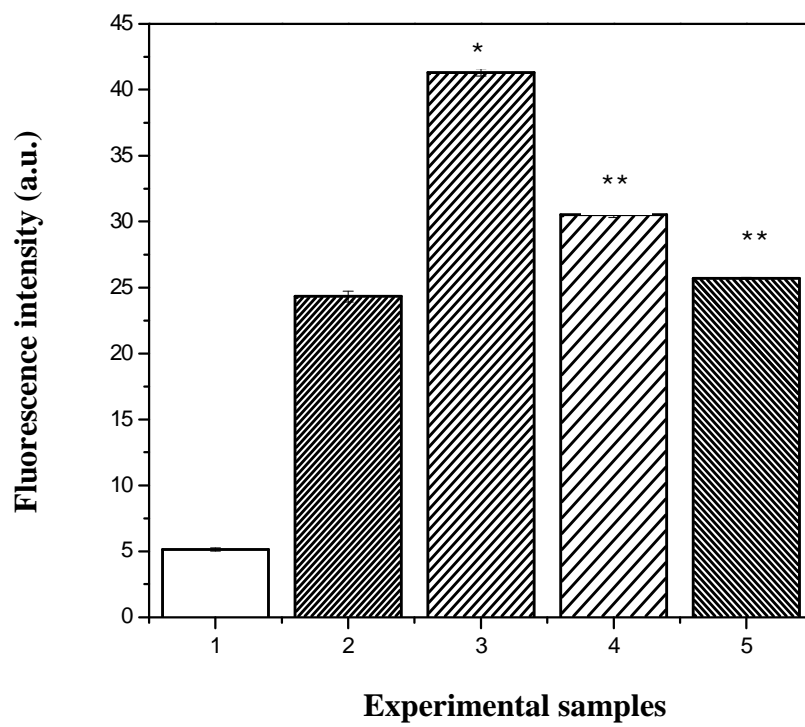


Figure 3.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, D. S. P.; SENA, K. C. M. S. Lipid peroxidation biomarkers in atherosclerosis. **Rev. Nutr**, v. 21, p. 749-756, 2008.

AZUMI, H.; INOUE, N.; OHASHI, Y.; TERASHIMA, M.; MORI, T.; FUJITA, H.; AWANO, K.; KOBAYASHI, K.; MAEDA, K.; HATA, K.; SHINKE, T.; KOBAYASHI, S.; HIRATA, K.; KAWASHIMA, S.; ITABE, H.; HAYASHI, Y.; IMAJOH-OHMI, S.; ITOH, H.; YOKOYAMA, M. Superoxide Generation in Directional Coronary Atherectomy Specimens of Patients With Angina Pectoris : Important Role of NAD(P)H Oxidase. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 22, p. 1838-1844, 2002.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, p. 1464-1476, 1999.

BABIOR, B. M. Phagocytes and Oxidative Stress. **The American Journal of Medicine**, v. 109, p. 33–44, 2000.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, p. 42-47, 2004.

BAIRD, K.; HAMPTON, M. B.; GIESEG, S. P. Oxidized LDL triggers phosphatidylserine exposure in human monocyte cell lines by both caspase-dependent and -independent mechanisms. **FEBS Letters**, v. 578, p. 169–174, 2004.

BEDARD, K.; KRAUSE, H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol Rev**, v. 87, p. 245 – 313, 2007.

BEVAN, R. J.; DURAND, M. F.; HICKENBOTHAM, P. T.; KITAS, G. D.; PATEL, P. R.; PODMORE, I. D.; GRIFFITHS, H. R.; WALLER, H. I.; LUNEC, J. Validation of a novel elisa for measurement of mda-ldl in human plasma. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, p. 517–527, 2003.

BERLINER, J. A.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A. M.; FRANK, J. S.; DEMER, L. L.; EDWARDS, P. A.; WATSON, A. D.; LUSIS, A. J. Atherosclerosis: Basic

Mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. **Circulation**, v. 91, p. 2488-2496, 1995.

BLAHA, M. J.; BLUMENTHAL, R. S.; BRINTON, E. A.; TERRY, A.; JACOBSON, T. A. The importance of non-HDL cholesterol reporting in lipid management. **Journal of Lipidology**, v. 2, p. 267-273, 2008.

BRIGAGÃO M. R. P. L.; COLEPICOLO, P. Oscillations in superoxide anion release by polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by human saliva. **Biol. Rhythm. Res**, v. 27, p. 269-280, 1996.

BRIGAGÃO, M. R. P. L.; BARROSO, A. S.; COLEPICOLO, P. Fluctuation of reactive oxygen species released by inflammatory cells. Driessche T.V. (Ed). In: **The Redox State and Circadian Rhythms**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000.

CHERUBINI, A.; RUGGIERO, C.; POLIDORI, M. C.; MECOCCHI, P. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radic Biol Med**, v. 39, p. 841-852, 2005.

COLLEN, D. Antibodies against oxidized LDL for non-invasive diagnosis of atherosclerotic vascular disease. **European Heart Journal**, v. 22, p. 1517-1518, 2001.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins patologia estrutural e funcional. 7. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2006.

COX, J. C.; COULTER, A. R. Adjuvants - a classification and review of their modes of action. **Vaccine**, v.15, p. 246-256, 1997.

CROSS, A. The participation of the hemes of flavocytochrome b245 in the electron transfer process in NADPH oxidase. **Blood**, v. 93, p. 4449, 1999.

DAMASCENO, N. R. T.; SEVANIAN, A.; APOLINÁRIO, E.; OLIVEIRA, J. J. M. A.; FERNANDES, I.; ABDALLA, D. S. P. Detection of electronegative low density lipoprotein (LDL<sup>-</sup>) in plasma and atherosclerotic lesions by monoclonal antibody-based immunoassays. **Clinical Biochemistry**, v. 39, p. 28-38, 2006.

DARBY, N. J.; KEMMINK, J.; CREIGHTON, T. E. Identifying and characterizing a structural domain of protein disulfide isomerase, **Biochemistry**, v. 35, p. 10517– 10528, 1996.

DOBSON, C.M. Protein folding and its linking with human disease. In: **Biochem.Soc. Symp**, p. 1-26, 2001.

EDMAN, J. C. et al. Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. **Nature**, v. 317, p. 267– 270, 1985.

ELLGAARD, L.; RUDDOCK, L. W. The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. **EMBO Rep**, v. 6, p. 28-32, 2005.

ERKKIL, A. T.; NARVANEN, O. B.; LEHTO, S.; USITUPA, M. I. J.; HERTTUALA, S. Antibodies against oxidized LDL and cardiolipin and mortality inpatients with coronary heart disease. **Atherosclerosis**, v. 183, p. 157–162, 2005.

ERMAK, N.; LACOUR, B.; DRUEKE, T. B.; VICCA, S. Role of reactive oxygen species and Bax in oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis of human monocytes. **Atherosclerosis**, v. 200, p. 247–256, 2008.

FERNANDES, D. C. et al. Protein disulfide isomerase overexpression in vascular smooth muscle cells induces spontaneous preemptive NADPH oxidase activation and Nox1 mRNA expression: Effects of nitrosothiol exposure. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 484, p.197–204, 2009.

FLAVAHAN, N. A. Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. **Circulation**, v.85, p.1927-1938, 1992.

FUKUMOTO, M.; SHOJI, T.; EMOTO, M.; KAWAGISHI, T.; OKUNO, Y.; NISHIZAWA, Y. Antibodies Against Oxidized LDL and Carotid Artery Intima-Media Thickness in a Healthy Population. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, p. 703-707, 2000.

GALLE, J.; BENGEN, J.; SCHOLLMAYER, P.; WANNER, C. Impairment of endothelium-dependent dilation in rabbit renal arteries by oxidized lipoprotein(a). Role of oxygen-derived radicals. **Circulation**, v. 92, p. 1582-1589,1995.

GALLE, J.; HANSEN-HAGGE, T.; WANNER, C.; SEIBOLD, S. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. **Atherosclerosis**, v. 185, p. 219-226, 2006.

GARRIDO-SÁNCHEZ, L.; CHINCHURRETA, P.; GARCÍA-FUENTES, E.; MORA, M.; TINAHONES, F. J. A higher level of IgM anti-oxidized is associated with a lower severity of coronary atherosclerosis in patients on statins. **International Journal of Cardiology**, v. 2, p. 1-2, 2009.

GENG, Y. J.; JONASSON, L. Linking immunity to atherosclerosis: Implications for vascular pharmacology — Attribute to Göran K. Hansson. **Vascular Pharmacology**, 2011.

GOLDBERGER, R. F.; EPSTEIN, C. J.; ANFINSEN, C. D. Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. **J. Biol. Chem**, v. 238, p. 628-635, 1963.

GORSKY, L. D.; KOOP, D. R.; COON, M. J. On the stoichiometry of the oxidase and monooxygenase reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. Products of oxygen reduction. **J. Biol. Chem**, v. 259, p. 6812– 6817, 1984.

GHOSH, S.; ZHAO, B.; BIE, J.; SONG, J. Macrophage cholesteryl ester mobilization and atherosclerosis. **Vascular Pharmacology**, v. 52, p. 1–10, 2010.

GROEMPING, Y. et al. Molecular basis of the phosphorylation-Induced Activation of the NADPH Oxidase. **Cell**, v. 113, p. 343-355, 2003.

HARLOW, E.; LANE, D. Antibodies: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory**, p. 726, 1988.

HALLIWELL, B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). **Free Radic Res**, v. 1, p. 261-272, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDG, J. M. C. **Free Radic. Biol. Med.** 4. ed. New York: Oxford University Press., 2007.

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

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

HARRISON, D.; GRIENDLING, K. K.; LANDMESSER, U.; HORNIG, B.; DREXLER, H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. **Am J Cardiol**, v. 91, p. 7-11, 2003.

HARPER, A. M.; CHAPLIN, M. F.; SEGAL, A. W. Cytochrome b-245 from human neutrophils is a glycoprotein. **Biochem. J**, v. 227, p. 783-788, 1985.

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

HILL, M. F.; SINGAL, P. K. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. **Am J Pathol**, v. 148, p. 291-300, 1996.

HUSE, K.; BOHME, H. J.; SCHOLZ, G. H. Purification of antibodies by affinity chromatography. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 51, p. 217-231, 2002.

HULTHE, J.; FAGERBERG, B. Circulating Oxidized LDL Is Associated With Subclinical Atherosclerosis Development and Inflammatory Cytokines (AIR Study). **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 22. P.1162-1167.2002.

ISOGAI, Y.; IZUKA, T.; SHIRO, Y. The mechanism of electron donation to molecular oxygen by phagocytic cytochrome b558. **J. Biol. Chem**, v. 270, p. 7853-7, 1995.

JANISZEWSKI, M; PEDRO, MA; SCHEFFER, RC; VAN ASSELDONK, JH; SOUZA, LC; DA LUZ, PL; AUGUSTO, O; LAURINDO, FR. Inhibition of vascular NADH/NAD(P)H oxidase activity by thiol reagents: lack of correlation with cellular glutathione redox status. **Free Radic Biol Med**, v. 29, p. 889-899, 2000.

JANISZEWSKI, M; SCHRÖDER, K; BUSSE, R; LAURINDO, F; BRANDES, R.P. Protein disulfide isomerase is a central regulator of NADPH oxidase activity. **Vascular Pharmacology**, v. 45, A10.01, p. e71-e78, 2006.

JESAITIS, A. J. et al. The Molecular Basis of Oxidative Damage by Leukocytes. **A.J., Dratz E.A.** (Ed) Montana: Big Sky, 1991.

JESSUP, W.; WILSON, P.; GAUS, K.; KRITHARIDES, L. Oxidized lipoproteins and macrophages. **Vascular Pharmacology**, v. 38, p. 239–248, 2002.

JONES, R. D.; HANCOCK, J. T.; MORICE, A. H. NADPH oxidase: a universal oxygen sensor? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p. 416–424, 2000.

KALIORA, A. C; DEDOISSIS, G. V. Z; Schmidt, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. **Atherosclerosis**, v. 187, p. 1–17, 2006.

KIM, J. G.; SABBAGH, F.; SANTANAM, N.; WILCOX, J. N.; Medford, R. M.; Parthasarathy, S. Generation of a polyclonal antibody against lipid peroxide-modified proteins. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 23, p. 251–259, 1997.

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

LAMBETH, J. D.; KAWAHARA, T.; DIEBOLD, B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. **Free Radic. Biol. Med**, v. 43, p. 319, 2007.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L.; Cox, M.M. Princípios de Bioquímica. São Paulo: **Sarvier**, p. 1232, 2006.

LEOPOLD, J. A.; LOSCALZO, J. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v.47, p.1673–1706, 2009.

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

LIBBY, P.; OKAMOTO, Y.; ROCHA, V. Z.; FOLCO, E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. **Circ J**, v. 74, p. 213-220, 2010.

LOBO, J. C.; MAFRA, D.; FARAGE, N. E.; FAULIN, T. E. S.; ABDALLA, D. S. P.; NÓBREGA, A. C. L.; TORRES, J. P. M. Increased electronegative LDL and



decreased antibodies against electronegative LDL levels correlate with inflammatory markers and adhesion molecules in hemodialysed patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, p. 1788–1792, 2011.

LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, p. 233-24, 2000.

MELLO, A. P. Q.; SILVA, I. T.; ABDALLA, D. S. P.; DAMASCENO, N. R. T. Electronegative low-density lipoprotein: Origin and impact on health and disease. **Atherosclerosis**, v. 215, p. 257–265, 2011.

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

NAKAJIMA, K.; TAKAMITSU, T.; TANAKA, A. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: The comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 367, p. 36 – 47, 2006.

NOIVA, R. Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. **Semin. Cell Dev. Biol**, v. 10, p. 481-93, 1999.

NUNES. G. S. Immunochemical methods for analysis of environmental contaminants: concepts, state of the art and perspectives. **Quim. Nova**, v. 28, p. 462-471, 2005.

OHUCHI, K. et al. Preparation of immunoaffinity mini-columns for the analysis of platelet activating factor (PAF) in biological samples. **Br. J. Pharmacol**, v. 94, p. 917, 1988.

PARKOS, C. A. et al. Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 85, p. 3319–3323, 1988.

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

POLI, G.; SOTTERO, B.; GARGIULO, S.; LEONARDUZZI, G. Cholesterol oxidation products in the vascular remodeling due to atherosclerosis. **Mol Aspects Med**, v. 30, p. 180-189, 2009.

RIZZO, M.; KOTUR-STEVLJEVIC, J.; BERNEIS, K.; SPINAS, G.; RINI, G. B.; JELIC-IVANOVIC, Z.; SPASOJEVIC-KALIMANOVSKA, V.; VEKIC, J. Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: a new look. **Transl Res**, v. 153, p. 217-223, 2009.

ROYER-POKORA, B. et al. Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. **Nature**, v. 322, p.32-38, 1986.

ROSS, R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. **N Engl J Med**, v. 340, p. 115-126, 1999.

RUECKSCHLOSS, U.; GALLE, J.; HOLTZ, J.; ZERKOWSKI, H. R.; MORAWIETZ, H. Induction of NAD(P)H Oxidase by Oxidized Low-Density Lipoprotein in Human Endothelial Cells : Antioxidative Potential of Hydroxymethylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitor Therapy. **Circulation**, v. 104, p. 1767-1772, 2001.

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

SEGAL, A.W. The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, p. 604-618, 2008.

SUMIMOTO, H.; MIYANO, K.; TAKEYA, R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 338, p. 677-86, 2005.

SHOENFELD, Y., WU, R., DEARING, L.D., MATSUURA, E. Are anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies pathogenic or protective? **Circulation**, v. 110, p. 2552-2558, 2004

SPOSITO, A. C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F. A.; BERTOLAMI, M. C.; AFIUNE NETO, A.; SOUZA, A. D.; LOTTENBERG, A. M.; CHACRA, A. P.; FALUDI, A. A.; LOURES-VALE, A. A.; CARVALHO, A. C.; DUNCAN, B.; GELONESE, B.; POLANCZYK, C.; RODRIGUES, C. R.; SCHERR, C.; KARLA, C.; ARMAGANIJAN, D.; MORIGUCHI, E.; SARAIVA, F.; PICHETTI, G.; XAVIER, H. T.; CHAVES, H.; BORGES, J. L.; DIAMENT, J.; GUIMARAES, J. I.;

NICOLAU, J. C., DOS SANTOS, J. E.; DE LIMA, J. J.; VIEIRA, J. L.; NOVAZZI, J. P.; FARIA NETO, J. R.; TORRES, K. P.; PINTO, A.; BRICARELLO, L.; BODANESE, L. C., INTROCASO, L.; MALACHIAS, M. V.; IZAR, M. C.; MAGALHAES, M. E.; SCHMIDT, M. I.; SCARTEZINI, M.; NOBRE, M.; FOPPA, M.; FORTI, N. A.; BERWANGER, O.; GEBARA, O. C.; COELHO, O. R.; MARANHÃO, R. C.; DOS SANTOS, R. D.; COSTA, R. P.; BARRETO, S.; KAISER, S.; IHARA, S.; CARVALHO, T.; MARTINEZ, T. L.; RELVAS, W. G., SALGADO, W. [IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology. **Arq Bras Cardiol.** v. 88, p. 2-19, 2007.

STEINBERG, D.; JOSEPH, L. Is the Oxidative Modification Hypothesis Relevant to Human Atherosclerosis? Do the Antioxidant Trials Conducted to Date Refute the Hypothesis? **Circulation**, v.105, p. 2107-11, 2002.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol Rev**, v. 84, p. 1381-1478, 2004.

SUSANNAH E. et al. Protein disulfide-isomerase mediates delivery of nitric oxide redox derivatives into platelets. **Biochem. J**, v. 403, p. 283–288, 2007.

TANAKA, K.; IGUCHI, H.; TAKETANI, S.; NAKATA, R.; TOKUMARU, S.; SUGIMOTO, T.; KOJO, S. Facile Degradation of Apolipoprotein B by Radical Reactions and the Presence of Cleaved Proteins in Serum. **J. Biochem**, v.125, p. 173-176, 1999.

TEAHAN, C. G. et al. Purification of the 47 kDa phosphoprotein associated with the NADPH oxidase of human neutrophils. **Biochem. J**, v. 267, p. 485-489, 1990.

TSIMIKAS, S.; SHORTAL, B. P.; WITZTUM, J. L.; PALINSKI, W. In Vivo Uptake of Radiolabeled MDA2, an Oxidation-Specific Monoclonal Antibody, Provides an Accurate Measure of Atherosclerotic Lesions Rich in Oxidized LDL and Is Highly Sensitive to Their Regression. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20. p. 689-698, 2000.

TSOMPANIDI, E. M.; BRINKMEIER, M. S.; FOTIADOU, E. H.; GIAKOUMI, S. M.; KYPREOS, K. E. HDL biogenesis and functions: Role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 208, p. 3-9, 2009.

WANG, J.; ZHANG, C.; GONG, J.; ZHU, Y.; FU, L.; WANG X.; LI, K. Development of new enzyme-linked immunosorbent assay for oxidized

lipoprotein(a) by using purified human oxidized lipoprotein(a) autoantibodies as capture antibody. **Clinica Chimica Acta**, v. 385, p. 73–78, 2007.

WHO Cardiovascular diseases. World Health Organization. 2008.

WILKINSON, B.; GILBERT, H. F. Protein disulfide isomerase. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1699, p. 35-44, 2004.

XIAO, R. et al. Combinations of protein-disulfide isomerase domains show that there is little correlation between isomerase activity and wildtype growth. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 27975–27980, 2001.

YAMAGUCHI, Y.; KUNITOMO, M.; HAGINAKA, J. Assay methods of modified lipoproteins in plasma. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 781, p. 313-330, 2002.

YAMAGUCHI, T. et al. Purification and some properties of the small subunit of cytochrome b558 from human neutrophils. **J. Biol. Chem**, v. 264, p. 112-118, 1989.

YOSHIDA, H.; KISUGI, R. Mechanisms of LDL oxidation. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, p. 1875–1882, 2010.

ZHUKOV, A. A.; ARCHAKOV, A. I. Complete stoichiometry of free NADPH oxidation in liver microsomes. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 109, p. 813– 818, 1982.

ZHUKOV, A.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Relationship between cytochrome P450 catalytic cycling and stability: fast degradation of ethanol- inducible cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in hepatoma cells reductase. **Biochem. J**, v. 340, p. 453– 458, 1999.