

**UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO - UNIFENAS
DIRETORIA DE PESQUISAS E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM SAÚDE**

**INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE
LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE NA
INFLAMAÇÃO CARDIOVASCULAR, NA
RESISTÊNCIA INSULÍNICA E NO
HEMOGRAMA DE CAMUNDONGOS
KNOCKOUT PARA O GENE DO RECEPTOR DE
LDL (LDLr-/-)**

LUIZA BARBOSA MESSORA

**Alfenas – MG
2010**

**UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO - UNIFENAS
DIRETORIA DE PESQUISAS E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM SAÚDE**

**INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE
LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE NA
INFLAMAÇÃO CARDIOVASCULAR, NA
RESISTÊNCIA INSULÍNICA E NO
HEMOGRAMA DE CAMUNDONGOS
KNOCKOUT PARA O GENE DO RECEPTOR DE
LDL (LDLr-/-)**

LUISA BARBOSA MESSORA

Dissertação apresentada à Supervisão de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia

**Alfenas – MG
2010**

Messora, Luisa Barbosa.

Influência dos níveis plasmáticos de lipoproteína de alta densidade na inflamação cardiovascular, na resistência insulínica e no hemograma de camundongos *knockout* para o gene do receptor de LDL (LDLr^{-/-}). Luisa Barbosa Messora. – Alfenas: UNIFENAS, 2010.

82f.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia

Dissertação (Mestrado em Saúde) – Universidade José do Rosário Vellano.

1. HDL 2. Hiperlipidemia. 3. Inflamação 4. Hemograma I.Título

CDU: 615.15(043)

LUIA BARBOSA MESSORA

**INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE
LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE NA INFLAMAÇÃO
CARDIOVASCULAR, NA RESISTÊNCIA INSULÍNICA E NO
HEMOGRAMA DE CAMUNDONGOS *KNOCKOUT* PARA O
GENE DO RECEPTOR DE LDL (LDLr-/-)**

A banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a dissertação de Mestrado, elaborada por Luisa Barbosa Messori e sob a orientação do Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde.

Alfenas, de 2010.

Profª. Dra. Ana Maria Duarte Dias Costa
Banca examinadora

Profª. Dra. Silmara Paula G. de Lima
Banca examinadora

Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia
Orientador

"Nos dias de hoje, cada vez mais, acentua-se a necessidade de ser forte. Mas não há uma fórmula mágica que nos faça chegar à força sem que antes tenhamos provado a fraqueza."

Padre Fábio de Melo

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria possível. Aos meus pais, irmãos e ao Rogério, que foram profundos incentivadores de toda minha trajetória profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia, pela força, pelo apoio, incentivo e dedicação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Leandro dos Santos, pela amizade e pela ajuda na execução de alguns procedimentos práticos deste trabalho.

À professora Marlene Leite Godoy Vieira de Souza, pelo carinho, pela amizade, pela compreensão e incentivo a minha carreira profissional.

Aos funcionários do laboratório de pesquisa, pelo apoio e pelo carinho dado aos animais no Biotério para a realização deste trabalho.

Aos alunos do curso de enfermagem Ingrid, Vanessa e Eduardo, pelo auxílio em meus experimentos.

Aos professores do programa de pós-graduação da UNIFENAS, pelo carinho durante as aulas.

A todos os colegas de mestrado, com quem, passamos muitas sextas-feiras juntos.

Aos meus pais, pelo apoio, dedicação e amor. Esta conquista é nossa.

Aos professores da Banca Examinadora, pela dedicação e apoio nestas horas difíceis.

A todos os amigos da UNIFENAS que me acolheram em momentos de muito estresse.

À Dra. Maria do Rosário Vellano, reitora da UNIFENAS, pelo apoio e confiança.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema representativo de uma lipoproteína	19
Figura 2 - O metabolismo das lipoproteínas.....	20
Figura 3 - Fotomicrografias de cortes histológicos	61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Comparação dos níveis plasmáticos de glicose, insulina e lipídeos; do índice de Homa ($HOMA_{ir}$) e das relações do colesterol (LDL/HDL e CT/HDL) entre camundongos *wild type* (WT) e LDLr^{-/-} alimentados com dieta padrão (S) e com dieta hiperlipídica (HL) 60
- Tabela 2 - Comparação da porcentagem da área imuno-reativa para o CD40L no miocárdio, da área íntima, da área média, da porcentagem de colágeno na camada média-íntima e colágeno total na artéria aorta entre camundongos *wild type* (WT) e LDLr^{-/-} alimentados com dieta padrão (S) e com dieta hiperlipídica (HL)..... 61
- Tabela 3 - Comparação da contagem total e diferencial de leucócitos (leucócitos/mm³) entre camundongos *wild type* (WT) e LDLr^{-/-} alimentados com dieta padrão (S) e com dieta hiperlipídica (HL) 62
- Tabela 4 – Comparação dos parâmetros hematológicos do eritrograma e da contagem de plaquetas entre camundongos *wild type* (WT) e LDLr^{-/-} alimentados com dieta padrão (S) e com dieta hiperlipídica (HL)..... 63

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcentagem

°C – Grau centígrado

ACAT – Acil coenzima A colesterol aciltransferase

ADP – Adenosina difosfato

AGL – Ácidos graxos livres

AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida

ANOVA – Análise de variância

Apo - Apoproteínas

ATP – Adenosina trifosfato

BcC – Capacidade funcional das células beta

CD40L – Ligante do receptor CD40

CETP – Proteína de transferência de éster de colesterol

CNP – Peptídeo C natriurético

CoA – Coenzima A

COX₂ – Ciclooxigenase 2

CT – Colesterol Total

DAC – Doença arterial coronariana

DCV – Doença cardiovascular

dL - Decilitro

DM2 – Diabete *mellitus* tipo 2

EC – Ésteres de colesterol

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EPM – Erro Padrão da Média

ET -1 – Endotelina 1

g - grama

Glut - Transportador de glicose

GPO - Glicerol-3-fosfato oxidase

Hb – Hemoglobina

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HMG-CoA – Hidroximetilglutaril coenzima A redutase

HOMA_{ir} - homeostasis model assessment
HVE – Hipertrofia ventricular esquerda
ICAM – Molécula de adesão intracelular
IDL – Lipoproteína de densidade intermediária
IKK – Inibidor Kappa β quinase
IL - Interleucina
INF- γ - Interferon gama
ip - Intraperitoneal
IRS 1 – Substrato do receptor de insulina
ISI – Índice de sensibilidade à insulina
KDa - kilodaltons
LCAT – Lecitina colesterol aciltransferase
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox – Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LDLr-/- - Deficiência para receptor de LDL
LPL – Lipase lipoprotéica
LTB4 – Leucotrieno
MAPK – Proteína quinase ativada por mitógenos
mg - Miligrama
mg/Kg – Miligrama por kilograma
MIP-1- α - Proteína inflamatória de macrófago 1 alfa
mL - Mililitro
mm³ – Milímetro cúbico
mmol/L – Milimol por litro
mU/L – Miliunidades por litro
NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NFKappa β - Fator nuclear Kappa β
Nm - Nanômetro
NO – Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintase
O₂⁻ - Ânion superóxido
PAF – Fator ativador de plaquetas
PAI – Ativador de plasminogênio

PGI₂ – Prostaglândina I₂
pH - Potencial hidrogeniônico
POD - Peroxidase
QM - Quilomícrons
RI – Resistência insulínica
rpm – Rotação por minuto
SMC – Células da musculatura lisa
SR-BI - Receptor classe B tipo 1
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
TRC – Transporte reverso do colesterol
U/L - Unidade por litro
VB – Variabilidade biológica
VCAM – Moléculas de adesão vascular
VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade
WT – Wild Type

RESUMO

MESSORA, Luisa Barbosa. **Influência dos níveis plasmáticos de lipoproteína de alta densidade na inflamação cardiovascular, na resistência insulínica e no hemograma de camundongos *knockout* para o gene do receptor de LDL (LDLr/-).** Orientador: Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia. Alfenas: UNIFENAS, 2010. Dissertação (Mestrado em Saúde).

Os camundongos LDLr/- são hiperlipidêmicos espontâneos e resistentes ao desenvolvimento de lesões neointimais. O presente estudo teve como objetivo determinar a influência dos níveis plasmáticos de lipoproteína de alta densidade na inflamação cardiovascular, na resistência insulínica e no hemograma de camundongos *knockout* para gene do receptor de LDL (LDLr/-). Foram utilizados 3 grupos experimentais de camundongos machos com 3 meses de idade: Grupo WT, camundongos selvagens; Grupo S, camundongos LDLr/- que receberam ração padrão; Grupo HL, camundongos LDLr/- que receberam ração hiperlipídica. Após 15 dias, o sangue foi coletado para análises plasmáticas dos lipídeos, glicose, insulina e para análises hematológicas. O índice de Homa foi calculado para determinar a resistência insulínica. O coração e aorta foram removidos e processados histologicamente. Cortes histológicos do coração foram processados imunoistoquimicamente com anticorpo anti-CD40L para avaliar processo inflamatório. Cortes histológicos das artérias foram corados com hematoxilina/eosina e picrosírius red para avaliar alterações morfológicas e morfométricas. Os camundongos S foram resistentes ao processo inflamatório, caracterizado por baixa imunorreatividade para o CD40L, com níveis plasmáticos de HDL elevados, e não desenvolveram resistência insulínica, mesmo com hiperlipidemia moderada em relação aos WT. Os camundongos HL apresentaram uma hiperlipidemia severa, aumento na imunorreatividade cardíaca para o CD40L, pronunciadas alterações morfológicas na parede da aorta e resistência insulínica, associadas a um decréscimo nos níveis plasmáticos do HDL em relação aos S. Os resultados mostraram uma associação negativa entre os níveis plasmáticos de lipoproteína de alta densidade e as contagens total e diferencial de leucócitos e plaquetas nos camundongos *knockout* para o gene do receptor de lipoproteína de baixa densidade. Essa relação demonstrou importante influência da lipoproteína de alta densidade na modulação da resposta imunológica e inflamatória na dislipidemia. Portanto, a avaliação dos resultados do hemograma correlacionada com os níveis plasmáticos de lipídeos, rotineiramente, pode ser promissora na prevenção e no prognóstico da severidade de quadros patológicos que envolvam respostas imunológicas nas dislipidemias. O nível plasmático elevado de HDL é o fator protetor contra o desenvolvimento de processos inflamatórios cardiovasculares e resistência insulínica nos camundongos LDLr/-, impedindo o desenvolvimento das lesões neointimais.

Palavras-chave: HDL, Hiperlipidemia, Inflamação, Hemograma

ABSTRACT

MESSORA, Luisa Barbosa. **Influence of plasma levels of high density lipoprotein on cardiovascular inflammation, insulin resistance and blood cell count in LDL receptor (LDLr-/-) gene Knockout mice.** Advisor: Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia. Alfenas: UNIFENAS, 2010. Dissertation (Master's degree in Health Care).

LDLr-/- mice are spontaneously hyperlipidemic and resistant to the development of neointimal lesions. This study determined the influence of plasma levels of high density lipoprotein on cardiovascular inflammation, insulin resistance, and blood cell count in LDL (LDLr-/-) receptor gene knockout mice. Three groups of 3-month-old male mice were used: Group WT, wild-type mice, Group S, LDLr-/- mice fed a standard diet, Group HL, LDLr-/- mice fed a hyperlipidic diet. After 15 days, blood was collected for analysis of plasma lipids, glucose, insulin, and hematological assays. The HOMA index was calculated to determine insulin resistance. The heart and aorta were removed and histologically processed. Heart sections were immunohistochemically processed with the anti-CD40L antibody to evaluate the inflammatory process. Artery sections were stained with hematoxylin-eosin and picosirius red to assess morphological and morphometric changes. The S mice were resistant to inflammatory, had a low immunoreactivity to CD40L, high HDL plasma levels, and showed no insulin resistance, even with moderate hyperlipidemia in relation to WT. HL mice exhibited severe hyperlipidemia, increased immunoreactivity to CD40L, marked morphological alterations in the aorta wall, and insulin resistance, all associated with a decrease in HDL plasma levels in relation to S. The results showed a negative association between the plasma levels of high density lipoprotein and the total and differential leukocyte and platelet counts in the LDL receptor gene knockout mice. This ratio showed the important influence of the high density lipoprotein on the modulation of the immune and inflammatory response in dyslipidemias. Therefore, the evaluation of the blood cell count results, routinely correlated with the lipid plasma levels, can be promising in the prevention and prognosis of the severity of pathological conditions involving immune responses in dyslipidemias. The high HDL plasma level is a protective factor against the development of cardiovascular inflammation and insulin resistance in LDLr-/- mice, thus preventing the incidence of neointimal lesions.

Keywords: HDL, Hyperlipidemia, Inflammation, Blood cell count

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	JUSTIFICATIVA	17
4	REVISÃO DE LITERATURA	18
4.1	METABOLISMO DE LIPÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS	18
4.1.1	Funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade (HDL)	22
4.2	RECEPTORES DE LDL E O METABOLISMO DE COLESTEROL	28
4.3	ATEROSCLEROSE	29
4.4	HIPERTROFIA VENTRICULAR ESQUERDA	31
4.5	RESISTÊNCIA INSULÍNICA	33
4.6	ÍNDICE HOMA	38
4.7	HEMOGRAMA	41
4.8	MODELO ANIMAL	44
5	MATERIAL E METODOS	48
5.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	48
5.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	48
5.3	COLETA DAS AMOSTRAS	49

5.4	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	50
5.4.1	Determinação da Glicemia	50
5.4.2	Determinação da Insulina	51
5.4.3	Determinação da Triglicerolemia	51
5.4.4	Determinação da Colesterolemia	52
5.4.5	Determinação de colesterol HDL	53
5.4.6	Determinação de colesterol VLDL e LDL	54
5.5	ANÁLISES HEMATOLÓGICAS	54
5.5.1	Contagem Total e Diferencial de Leucócitos	54
5.5.2	Contagem de Eritrócitos	55
5.5.3	Hematócrito	55
5.5.4	Dosagem de Hemoglobina	56
5.5.5	Contagem de Plaquetas	56
5.6	ANÁLISES MORFOMÉTRICAS, MORFOLÓGICAS E IMUNOISTOQUÍMICAS	57
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
6	RESULTADOS	59
7	DISCUSSÃO	64
8	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares lideram as causas de morte no mundo. Dentre essas doenças, a aterosclerose e a hipertrofia ventricular esquerda (HVE) são de grande relevância no risco de morbimortalidade cardiovascular.

O processo inflamatório, a disfunção endotelial, o estresse oxidativo e a resistência insulínica no ambiente cardiovascular tem sido considerados como denominadores comuns dentre os mecanismos que promovem e sustentam a aterogênese e a hipertrofia ventricular esquerda (HVE). Diversos estudos clínicos, epidemiológicos e experimentais mostraram de maneira incontestável a relação entre os níveis plasmáticos de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e doenças cardiovasculares, porém, há poucos relatos na literatura sobre a relação da HDL e a contagem total e diferencial de leucócitos e a incidência de doenças inflamatórias cardiovasculares.

Baixos níveis de HDL representam um dos frequentes achados de dislipidemia nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC). Inúmeros estudos mostraram que a HDL possui um amplo espectro de ações antiaterogênicas, incluindo potente atividade antioxidante e anti-inflamatória.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a influência dos níveis plasmáticos de lipoproteína de alta densidade na inflamação cardiovascular, na resistência insulínica e no hemograma de camundongos *knockout* para gene do receptor de LDL (LDLr^{-/-}).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os níveis plasmáticos de insulina e glicose e calcular o índice HOMA para avaliar a resistência insulínica em camundongos LDLr^{-/-}.
- Determinar os níveis plasmáticos de colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicérides em camundongos LDLr^{-/-}.
- Correlacionar os níveis plasmáticos de colesterol total, suas frações e triglicérides com a contagem de leucócitos, eritrócitos e plaquetas em camundongos LDLr^{-/-}.
- Investigar o efeito da HDL na expressão do CD40L no miocárdio de camundongos LDLr^{-/-} para avaliar o processo inflamatório cardíaco.
- Investigar o efeito da HDL na prevenção das alterações estruturais cardiovasculares em camundongos LDLr^{-/-}.

3 JUSTIFICATIVA

A linhagem de camundongos LDLr^{-/-} escolhida é devido a sua importância no estudo da aterosclerose, já que compartilha aspectos semelhantes às lesões ateroscleróticas humanas. Ressaltamos também a facilidade na proliferação da colônia, além do curto período necessário para a formação de placa de ateroma neste modelo.

Níveis plasmáticos de HDL comumente fazem parte da rotina de exames solicitados para investigação de risco cardiovascular. O conhecimento médico e popular atribui ao HDL propriedades benéficas, isto é, associadas à diminuição de eventos morbidos cardiovasculares.

A inflamação e a ativação das células do sistema imunológico têm participação importante na patogênese da aterosclerose, sendo estas evidenciadas através do hemograma.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 METABOLISMO DE LIPÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS

Os lipídeos celulares são fundamentais não só como fonte de energia para a célula, mas também como componentes estruturais da membrana celular, sendo os ácidos graxos, os triacilgliceróis, os fosfolipídeos e o colesterol esterificado e livre os principais para o ser humano (ALVAREZ-LEITE e PELUZIO, 2003).

Os ácidos graxos são compostos por cadeias de carbono hidrocarboxiladas, podendo ser saturados ou insaturados (SCARTEZINI *et al.*, 1997). Os triacilgliceróis são produzidos pela esterificação do glicerol com três moléculas de ácidos graxos. Os fosfolipídeos são formados por glicerol, ácido graxo, base nitrogenada e fosfato (GENEST, 2003). E o colesterol pode apresentar-se sob a forma livre (forma funcional, componente estrutural das membranas celulares e na superfície da lipoproteína) ou esterificada (forma de armazenamento, encontrada no interior das células ou no interior das lipoproteínas) (SCARTEZINI *et al.*, 1997).

Devido à sua natureza hidrofóbica, os lipídeos são transportados no plasma sob a forma de aglomerados denominados lipoproteínas, que são constituídas por uma capa hidrofílica composta por fosfolipídeos, colesterol livre e proteínas, envolvendo um núcleo hidrofóbico que contém triacilgliceróis, colesterol esterificado e algumas vitaminas lipossolúveis – FIGURA 1 (GENEST, 2003). As lipoproteínas diferem quanto à densidade, origem, tamanho e conteúdo de apoproteínas e lipídeos, porém, sua classificação se baseia na densidade no meio aquoso do plasma. As principais classes de lipoproteínas, quanto a este

questo, são: quilomícrons (QM), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) (RADER e WILSON, 1995; SCARTEZINI *et al.*, 1997; GENEST, 2003). As apoproteínas (apo) são as proteínas presentes nestas partículas (GENEST, 2003) e exercem várias funções fisiológicas no seu metabolismo, dentre as quais: agir como cofatores para enzimas, ligar-se em receptores da superfície celular, contribuir para a solubilização dos lipídeos, além da função estrutural para a biossíntese das lipoproteínas (RADER e WILSON, 1995).

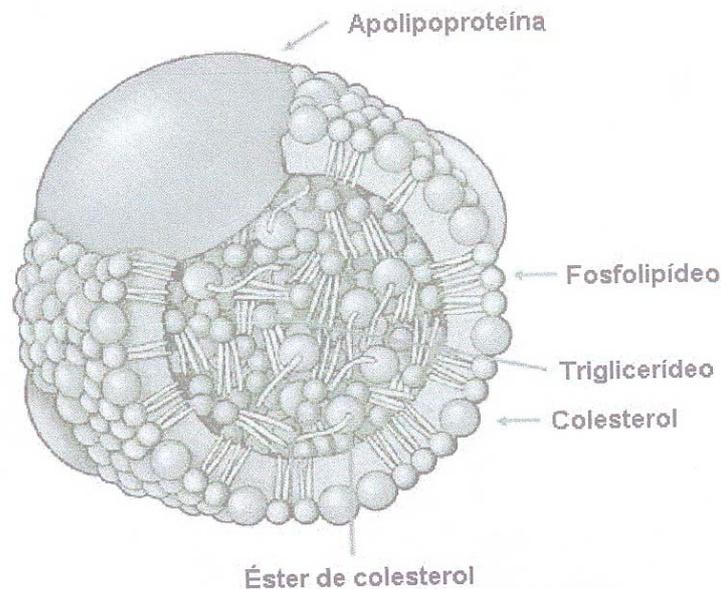


FIGURA 1 - Esquema representativo de uma lipoproteína (modificada de GENEST, 2003)

No metabolismo das lipoproteínas (FIGURA 2) os quilomícrons, que são constituídos por apo B-48, E, A-I e C (sintetizadas pelos enterócitos), transportam os triacilgliceróis de origem alimentar que são formados no intestino a partir da digestão das gorduras alimentares. A composição, o número e o tamanho dos quilomícrons formados dependem do suprimento e das características da dieta. Uma vez sintetizados, os quilomícrons são lançados na linfa, atingindo a circulação sanguínea através do ducto torácico. Estes se tornam uma partícula de

menor tamanho (quilomícron remanescente), pela retirada dos seus ácidos graxos, ao sofrerem hidrólise dos seus triacilgliceróis pela ação da enzima lipase lipoprotéica (LPL), que utiliza como cofator enzimático a apo C-II. Os remanescentes são removidos da circulação para o fígado devido à ligação da apo E com o receptor de remanescentes neste órgão (GENEST, 2003).

Os ácidos graxos provenientes do quilomícron, juntamente com os sintetizados no fígado, são “re-enpacotados” e secretados no sangue na forma de VLDL, lipoproteínas ricas em triacilgliceróis, cuja principal apoproteína é a apo B-100. Na circulação, as VLDL são hidrolisadas por LPL, originando as IDL, que contêm apo B-100 e apo E na sua superfície. A IDL tem dois destinos: é captada da circulação pelo fígado, pela interação das apoproteínas com receptores hepáticos, ou é processada pela lipase hepática e se transforma em LDL – Figura 2 (GENEST, 2003).

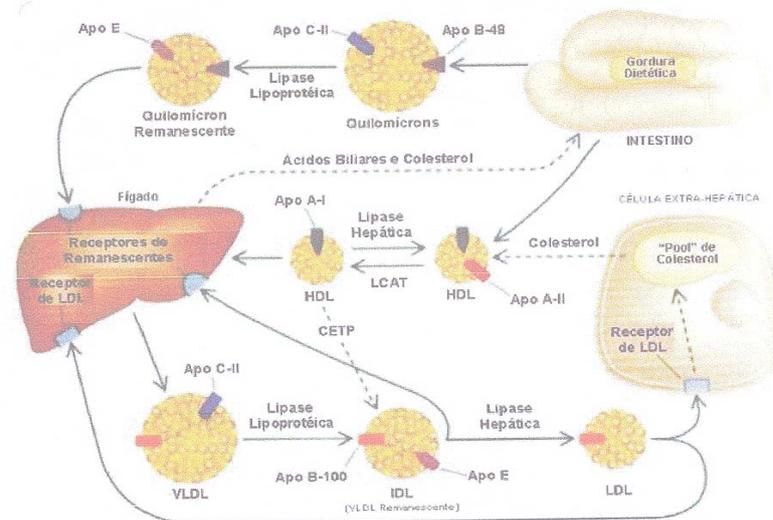


FIGURA 2- O metabolismo das lipoproteínas. O intestino absorve os lipídeos da dieta em quilomírons que contêm apo B-48. Lipase lipoprotéica, com seu cofator apo C-II, hidrolisa os QM que são captados pelo fígado pela ligação da apo E. O fígado secreta os lipídeos como VLDL com apo B-100. VLDL é hidrolisada em IDL, a qual pode ser captada pelo fígado. IDL também pode sofrer hidrólise pela lipase hepática e se tornar LDL. Células hepáticas e periféricas removem a LDL da circulação quando apo B-100 se liga ao receptor de LDL. HDL remove o excesso de colesterol das células para o fígado para excreção na bile. O metabolismo das lipoproteínas está simbolizado por linhas sólidas. O transporte de colesterol, quando não contido nas lipoproteínas, está indicado por linhas pontilhadas (modificada de RADER e WILSON, 1995).

A LDL, a principal condutora de colesterol na circulação humana, transporta ésteres de colesterol e vitamina E para os tecidos periféricos, cujas membranas apresentam os receptores B/E de LDL, que reconhecem a apo B-100. Além disso, significativa quantidade de LDL do plasma é eventualmente removida da circulação pelo fígado, também por interação apo B-100/receptor B/E. A entrada de LDL na célula é seguida por um ataque lisossômico, com consequente hidrólise da apo B-100 e do colesterol esterificado. O aumento da concentração intracelular de colesterol livre apresenta os seguintes efeitos regulatórios: inibição da enzima hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) redutase, impedindo a síntese de colesterol; inibição da síntese de receptores de LDL; estímulo da enzima acil-CoA colesterol aciltransferase (ACAT) para esterificação do colesterol citoplasmático – FIGURA 2 (RADER e WILSON, 1995; ALVAREZ-LEITE e PELUZIO, 2003).

Não existe uma via de catabolismo de colesterol, sendo este eliminado pelo fígado como ácidos biliares secretados na bile (RADER e WILSON, 1995; ALVAREZ-LEITE e PELUZIO, 2003). De acordo com Eckardstein, Nofer e Assmann (2001), a HDL é responsável pelo transporte reverso de colesterol, que consiste na remoção do excesso de colesterol livre dos tecidos periféricos e de lipoproteínas para o fígado e subsequente depósito para excreção. As HDL nascentes são formadas por hepatócitos, pela mucosa intestinal e por remanescentes de lipoproteínas, cujas principais apoproteínas são apo A-I e apo A-II (ECKARDSTEIN, NOFER E ASSMANN, 2001), embora outras, como apo A-IV, apo A-V, apo C-I, apo C-II, apo C-III, apo D e apo E, possam estar presentes (LUND-KATZ *et al.*, 2003). O colesterol livre, em contato com a HDL nascente, é substrato para a enzima plasmática lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), resultando na formação de ésteres de colesterol e aumento do tamanho da partícula de HDL. O colesterol esterificado pode ser transferido para as lipoproteínas que contêm apo B, pela proteína de transferência de éster de colesterol (CETP), e retornar para o fígado pelo receptor de LDL. A HDL ainda pode liberar

colesterol diretamente para o fígado – FIGURA 2 (RADER e WILSON, 1995; ALVAREZ-LEITE e PELUZIO, 2003).

As lipoproteínas podem ser aterogênicas ou antiaterogênicas, dependendo da composição e das propriedades fisiológicas. O mais conhecido efeito protetor da HDL na aterosclerose é no transporte reverso de colesterol, citado anteriormente. Além disso, a HDL também desempenha importante papel como antioxidante e na função endotelial (LUSIS, 2000; ECKARDSTEIN, NOFER e ASSMANN, 2001; ASSMANN e GOTTO, 2004). Por sua vez, a LDL possui propriedades aterogênicas, visto que há evidente associação entre elevadas concentrações desta lipoproteína e o aumento da aterosclerose (STEFFENS e MACH, 2004).

4.1.1 Funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade (HDL)

A lipoproteína de alta densidade (HDL) apresenta inúmeras funções que contribui para a prevenção da aterosclerose, dentre elas podemos citar: o transporte reverso do colesterol; a ação antioxidante; o estímulo da produção de óxido nítrico; a inibição da expressão de moléculas de adesão e ativação de leucócitos; a regulação do processo de coagulação e fibrinólise e a inibição da ativação plaquetária (LIMA e COUTO, 2006).

O transporte reverso do colesterol é a via pela qual o colesterol nos tecidos periféricos é transferido através do plasma para o fígado. Este também pode ser reciclado ou excretado na bile e/ou utilizado como arcabouço para produção de hormônios, respectivamente. Para isso são necessários: 1) a transferência de fosfolipídios e colesterol de membranas celulares para partículas lipoprotéicas ricas em proteínas e pobres em lipídios, através do espaço extracelular por processo dependente de ABCA-1 que resulta na formação das HDL discoidais

(HUUSKONEN *et al.*, 2001; ORAM, 2002; ECKARDSTEIN, NOFER e ASSMANN, 2001); 2) a esterificação do colesterol mediada pela LCAT da HDL discoidal, transformando-a em partícula esférica; 3) a interação das HDL esféricas com a proteína transportadora de colesterol éster (CETP), que transfere o conteúdo de ésteres de colesterol (EC), ou parte dele, para VLDL e seus remanescentes; e 4) a recirculação do EC para o fígado, tanto pela remoção de β -VLDL por meio dos receptores da lipoproteína de baixa densidade quanto pela remoção de partículas de HDL pelos receptores da família SR-BI, que removem seletivamente os EC das partículas de HDL e também de LDL para os hepatócitos e células produtoras de hormônios esteroidais, sem internalizar as proteínas da HDL, os fosfolipídios e as apolipoproteínas (FREDENRICH e BAYER, 2003).

É importante enfatizar que o TRC é realizado por um conjunto de partículas efetoras como apoproteínas, lipídios, proteínas de transferência, enzimas, entre outras, associadas ou não à HDL e suas subclasses, sendo esse um grande desafio para a lipidologia: entender como a relação influxo/efluxo do colesterol pode ser modulada para prevenir a aterosclerose (ECKARDSTEIN, NOFER e ASSMANN, 2001).

A oxidação da LDL é considerada o principal evento de iniciação do desenvolvimento da aterosclerose (LULIANO, 2001). A LDL oxidada (LDL-ox) age como fator quimiotático para monócitos que, transformados em macrófagos túrgidos com lipídios (células espumosas), exercem efeitos citotóxicos sobre as células endoteliais, aumentando a ativação de plaquetas, estimulando a migração e a proliferação de células musculares lisas (SMC) e antagonizando os efeitos vasodilatadores do óxido nítrico (CHISOLM e STEINBERG, 2000). Diversos autores têm mostrado que a HDL reduz significativamente as modificações oxidativas da LDL. A HDL pode inibir a oxidação da LDL quando causada por íons de metais de transição e prevenir a formação de peróxidos lipídicos pela 12-lipooxigenase (FREDENRICH e BAYER, 2003).

A HDL também adquire alguns produtos de oxidação da LDL como, por exemplo, lisofosfatidilcolina e peróxidos lipídicos, transportando-os até o fígado, onde serão metabolizados (HUANG *et al.*, 1998). A inibição da oxidação da LDL pela HDL é comumente atribuída ao seu conteúdo antioxidante (α -tocoferol, licopeno, estrógenos) (PERUGINI *et al.*, 2000), às propriedades antioxidantes da apoA-I e apoA-II e, principalmente, devido à presença de paraoxonase, uma enzima que catalisa a hidrólise de ácidos carboxílicos aromáticos e compostos organofosforados (CANALES e SANCHEZ-MUNIZ, 2003).

A paraoxonase também catalisa a quebra de fosfolípidios oxidados na LDL, os quais estimulam a produção de citocinas e induzem a adesão de monócitos na superfície de células endoteliais. Além disso, diminui o conteúdo de peróxidos lipídicos em artérias coronárias humanas e lesões da carótida (DURRINGTON *et al.*, 2001). Em animais susceptíveis à aterosclerose, como camundongos deficientes em apo E ou receptores de LDL, altos níveis de marcadores de oxidação estão acompanhados da diminuição da atividade da paraoxonase. Tal diminuição também foi observada em animais submetidos a uma dieta aterogênica e em pacientes diabéticos com níveis elevados de hemoglobina glicada. Por outro lado, a expressão da apo A-I humana em camundongos aumentou a atividade da paraoxonase. Além disso, diversos estudos genéticos têm confirmado a importância da paraoxonase na inibição do desenvolvimento da aterosclerose. Além disso, diversos estudos têm mostrado o aumento do risco de DAC em indivíduos com baixa atividade de paraoxonase (MACKNESS *et al.*, 1999).

O endotélio vascular tem papel crucial no aparecimento e no desenvolvimento da aterosclerose. Fatores importantes das disfunções endoteliais são as diminuições das biodisponibilidades do NO e o aumento da afinidade do endotélio a leucócitos que estão associados aos eventos iniciais do processo aterogênico (ALENZI, MARCIL E GENEST, 2004). Diversos estudos *in vivo* têm mostrado efeitos benéficos da HDL na função endotelial

(MINEO *et al.*, 2003). Por exemplo, a correlação negativa entre vasodilatação dependente de NO e níveis plasmáticos de HDL tem sido descrita, assim como a melhora da função endotelial na hipercolesterolemia humana após infusão de partículas de HDL (SPIEKER *et al.*, 2002). Recentemente foi demonstrado que HDL é um fator autônomo de proteção para o endotélio, induzindo a ativação da NO sintase, a liberação de NO e o efeito de vasorrelaxamento (RAMET *et al.*, 2003).

Os efeitos protetores da HDL à função endotelial estão associados a sua ligação com os receptores SR-B1 e podem estar relacionados a substâncias reguladoras presentes na composição da partícula de HDL. Esses efeitos seriam mediados por uma proteinoquinase, a qual pode ser ativada após a ligação da HDL com os receptores SR-B1 e a consequente interação de lisoesfingolípídios presentes na HDL com genes receptores de diferenciação presentes na membrana das células endoteliais (RAMET *et al.*, 2003).

As partículas de HDL interferem em várias das inúmeras funções secretoras das células endoteliais. A prostaglandina (PGI₂), produzida nas células endoteliais por ação das ciclooxigenases (COX-2), tem alta atividade vasorrelaxante, inibe a ativação plaquetária e diminui a liberação de fatores de crescimento que agem estimulando a proliferação local das células musculares lisas. A HDL, em concentrações fisiológicas, estimula a produção de PGI₂. O efeito estimulante depende de dois fatores: o suprimento de ácido araquidônico para as células endoteliais, a partir das partículas de HDL, e a indução da síntese de COX-2, que é a principal via de produção de prostanóides pelas células endoteliais (YOUNG *et al.*, 2004).

A HDL também demonstra ter importante papel na modulação da síntese do peptídeo C natriurético (CNP), o qual causa vasodilatação e inibe a secreção de endotelina-1. A placa aterosclerótica sofre forte influência dos tipos celulares nela contidos. Tem sido relatado que a adesão de leucócitos às células endoteliais possui papel crucial no desenvolvimento da placa aterosclerótica. A adesão celular é mediada por moléculas de adesão presentes na superfície

das células do endotélio vascular, representadas, basicamente, pelas moléculas de adesão vascular VCAM-1, ICAM-1 e pelas selectinas P, L e E. O processo de adesão dos leucócitos ao endotélio é chamado de marginação, seguido pela fase de ativação da ligação ao endotélio e finalmente à fase de migração, em que os leucócitos tornam-se aptos a migrar através dos tecidos. Essas moléculas de adesão (necessárias para a aderência dos leucócitos às células endoteliais), principalmente VCAM-1, ICAM-1 e selectina-E, estão abundantemente presentes nas placas ateroscleróticas (SPIEKER *et al.*, 2002). Cybulsky *et al.* (2001) observaram pela primeira vez o aumento da expressão de VCAM-1 em animais hipercolesterolêmicos, tanto devido à indução por dietas hipercolesterolêmicas quanto pela deficiência do LDLr^{-/-}. A expressão de moléculas de adesão é induzida por citocinas (IL-1 e TNF- α), que são liberadas por células ativadas, por lisofosfatidilcolina presente em LDL oxidada e por produtos de lipólise.

Apesar de todas essas evidências, o papel da HDL na indução da supressão de moléculas de adesão para prevenir a aterosclerose é ainda uma questão importante para debate (LIMA e COUTO, 2006).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado a associação de coagulação e fibrinólise com doença arterial coronariana (DAC) (TRACY, 2003). O estudo sobre doença cardíaca de Northwick-Park demonstrou que a ação pró-coagulante do fator VII, fator dependente de vitamina K, é um potente preditor da mortalidade por DAC. Altos níveis do inibidor tipo I do ativador do plasminogênio (PAI-I) também estão associados ao aumento do risco de eventos cardiovasculares. Tais achados sugerem que o desequilíbrio entre a coagulação e a fibrinólise pode conduzir à aterosclerose (LIMA e COUTO, 2006).

A ativação dos fatores da coagulação é seguida pela produção da tenase extrínseca (complexo formado por fator tecidual, fator VIIa, fosfolipídios e íons cálcio) e protrombinase (complexo de fatores da coagulação como Va, Xa, II, fosfolipídeos e íons cálcio). Essas

ativações são moduladas pelas partículas de HDL. A modulação do processo de coagulação e de fibrinólise pela HDL é acompanhada da inibição da secreção de citocinas (TNF- α e IL-1), que aumentam tanto a coagulação quanto a fibrinólise (LIMA e COUTO, 2006).

A HDL baixa é preditor independente da formação aguda de trombo dependente da ativação plaquetária (CUCHEL e RADER, 2002). Estudos *in vitro* demonstraram que, na presença ou na ausência de plasma rico em plaquetas ou apenas em plaquetas isoladas, a HDL inibe a ligação do fibrinogênio induzida por trombina na superfície plaquetária. A HDL inibe ainda a trombina e a formação de ADP devido ao estímulo à secreção de grânulos alfa e grânulos densos nas plaquetas (NEUFELD *et al.*, 2000).

Em estudos utilizando inibidores da NO sintase, obteve-se diminuição da capacidade inibitória da agregação plaquetária pela HDL. Por outro lado, a presença de precursores de NO aumenta a capacidade inibitória da HDL sob a ativação plaquetária. A inibição da agregação plaquetária é devida, provavelmente, à indução da síntese de óxido nítrico (NO) pela apo E presente nessas lipoproteínas (LIMA e COUTO, 2006). Por outro lado, a maior parte dos estudos que avaliaram o fenômeno inibitório da ativação plaquetária utilizou partículas de HDL derivadas de pacientes deficientes em apo E. Verificou-se também que, após incubação da HDL com plaquetas, há presença de um substrato (proteína fosforilada com peso molecular de 43kDa) para a proteinoquinase C. Não se sabe ainda por certo como a HDL ativa a proteinoquinase C, porém essa ativação é importante para a inibição da ativação plaquetária (NOFER *et al.*, 2002).

Embora exista pouca informação sobre os efeitos da HDL na função plaquetária *in vivo*, os resultados obtidos *in vitro* são bastante convincentes e importantes para o desenho e o direcionamento de novos estudos (LIMA e COUTO, 2006).

4.2 RECEPTOR DE LDL E O METABOLISMO DE COLESTEROL

O receptor de LDL é uma glicoproteína expressa na maioria das células com núcleo, em especial no fígado. Esses receptores reconhecem a apo B-100, presente na LDL, e a apo E, presente na IDL e HDL, removendo essas lipoproteínas da circulação por meio de um processo de alta afinidade de ligação e internalização (BRESLOW, 1996; JEON e BLACKLOW, 2005), regulando assim o nível de colesterol plasmático (ISHIBASHI *et al.*, 1994).

No metabolismo celular da partícula de LDL, a apo B-100 da superfície liga-se ao receptor de LDL, que está localizado em regiões denominadas de fossetas revestidas, que contêm clatrina. Em seguida, o complexo receptor-LDL é internalizado por endocitose, formando as vesículas endocíticas (endossomos). O endossomo possui pH ácido, o que permite que a LDL se dissocie do receptor de LDL. Este é reciclado, podendo retornar à superfície da célula e iniciar outro ciclo de endocitose. A LDL, por sua vez, é entregue ao lisossomo quando as membranas do endossomo e do lisossomo se fundem. Os componentes protéicos da LDL são hidrolisados a aminoácidos e os ésteres de colesterol a colesterol livre, o qual é transferido para um compartimento celular onde pode associar-se às membranas celulares. O acúmulo de colesterol não esterificado dentro da célula regula a atividade de duas enzimas: inibe a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase, levando a uma redução da síntese de colesterol, e ativa a acil-CoA colesteril aciltransferase, facilitando sua própria reesterificação e estocagem (JEON e BLACKLOW, 2005).

Defeitos genéticos no receptor de LDL produzem aumento sérico do colesterol em humanos com desenvolvimento da hipercolesterolemia familiar, uma doença que predispõe às

doenças cardiovasculares em pessoas ainda jovens (ISHIBASHI *et al.*, 1994; JEON e BLACKLOW, 2005).

4.3 ATEROSCLEROSE

A aterosclerose pode ser entendida como uma doença progressiva e degenerativa no ambiente vascular de grandes artérias. Dentre os mecanismos que participam do desenvolvimento desta patologia, destaca-se o efeito da LDL (lipoproteína de baixa densidade) modificada, particularmente quando oxidada ou nitrosada (HOOG *et al.*, 1993; EISERICH, PATEL e O'DONNELL, 1998).

Este processo foi dividido em diferentes fases para efeitos de classificação, os quais foram aprovados pela *American Heart Association* e atualmente adotados como referencial por diversos pesquisadores (STARY *et al.*, 1994).

Há enorme interesse em se determinarem marcadores ou fatores indicadores para as diferentes fases, tanto em humanos, como em diferentes modelos de estudo como, por exemplo, os camundongos transgênicos e *knockout* (LUSIS, 2000). Contudo, marcadores específicos de uma determinada fase, e sua correlação com as alterações estruturais decorrentes da patologia, ainda encontram-se em estudo. Os diferentes estágios são caracterizados por meio de evidências estruturais e da expressão de fatores indicadores ou marcadores nas lesões (LUSIS, 2000; LUSIS, MAR e PAJUKANTA, 2004).

Atualmente, a aterosclerose tem sido descrita como uma doença autoimune, bem como considerada uma doença inflamatória crônica (ROSS, 1999). Neste contexto, é evidente o papel do receptor CD40 e seu ligante CD40L em vários estágios da aterosclerose. A expressão

e o papel da interação CD40-CD40L foram inicialmente descritos de maneira restrita à sua participação na ativação de células T e linfócitos B (HOLLENBAUGH *et al.*, 1992; DURIE *et al.*, 1994; LIPSKY *et al.*, 1997). Porém, estudos posteriores mostraram esta interação por meio de sua expressão em uma ampla variedade de células, incluindo células endoteliais, célula muscular lisa e macrófagos (ALDERSON *et al.*, 1993; COCKS *et al.*, 1993; ARMANT *et al.*, 1995; REUL *et al.*, 1997; MACH *et al.*, 1997). Vários estudos mostram o papel do CD40 como molécula sinalizadora dos processos envolvidos na aterosclerose em diferentes estágios, compreendendo fases de: início, evolução e complicações agudas após a ruptura da placa. Tais evidências foram relacionadas ao fato de que ligação entre CD40 e CD40L induz a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais (KARMANN *et al.*, 1995; YELLIN *et al.*, 1995) e estimula a liberação de quimiocinas, como IL-8 e MIP-1- α (KIENER *et al.*, 1995), sendo que tais moléculas participam de fases iniciais da aterosclerose.

A formação do complexo CD40-CD40L também induz a expressão de citocinas, como IL-1 (interleucina-1), IL-6, IL-12, INF- γ em diferentes células, incluindo células endoteliais, musculares lisas e macrófagos *in vitro* (MACH *et al.*, 1997; KIENER *et al.*, 1995; KATO *et al.*, 1996; SCHÖNBECK *et al.*, 1997; MCDYER *et al.*, 1998). Tais citocinas têm sido descritas em associação à reação inflamatória local durante a fase de evolução da aterosclerose. Em relação às fases de complicações tardias do ateroma, foi demonstrado que o CD40L nativo ou recombinante induz a expressão de certas enzimas, as quais são responsáveis pela degradação da matriz protéica, com conseqüente desestabilização da placa e trombose (SCHÖNBECK *et al.*, 1997; MACH *et al.*, 1997, MCDYER *et al.*, 1998). Assim, foi descrito que o complexo CD40-CD40L presente em células endoteliais, musculares lisas e macrófagos, encontram-se localizados às colagenases intersticiais e em sítios de colagenólise no ateroma humano, demonstrando-se a relevância do papel do CD40 como sinalizador na ruptura da placa. Camundongos LDLr^{-/-} tratados com anticorpos contra CD40L e sob dieta

hipercolesterolêmica por 12 semanas demonstraram grande redução na formação de lesões ateroscleróticas (MACH *et al.*, 1998).

4.4 HIPERTROFIA VENTRICULAR ESQUERDA

A hipertrofia ventricular esquerda (HVE) constitui um conjunto de alterações estruturais decorrentes do aumento das dimensões dos cardiomiócitos, da proliferação do tecido conjuntivo intersticial e da rarefação da microcirculação coronariana (SHIRANI *et al.*, 2002; SUSSMAN, MCCULLOCH e BORG, 2002; WOLLERT e DREXLER, 2002). Quando o cardiomiócito recebe um estímulo hipertrófico, esse é traduzido no interior da célula, como alterações bioquímicas que levam à ativação de segundos (citosólicos) e terceiros (nucleares) mensageiros que irão agir no núcleo da célula, regulando a transcrição, e, finalmente, determinarão a expressão gênica que induz a HVE. O miocárdio dos mamíferos passa por um crescimento hipertrófico durante a maturação pós-nascimento, que é caracterizado por aumento no tamanho individual dos cardiomiócitos sem divisão celular (LORRELL e CARABELLO, 2000). Este padrão de desenvolvimento hipertrófico pode ser reiniciado no coração adulto em resposta a diferentes mecanismos hemodinâmicos, neuro-hormonais e/ou a estímulos patogênicos (HUNTER e CHIEN, 1999).

O crescimento dos cardiomiócitos que ocorre na hipertrofia ventricular esquerda pode ocorrer de duas maneiras diferentes: pela adição de sarcômeros em série (sobrecarga de volume) ou em paralelo (sobrecarga de pressão), permitindo que a célula aumente em comprimento ou em diâmetro, levando à hipertrofia excêntrica ou concêntrica, respectivamente (KEMPF e WOLLERT, 2004).

Segundo Kempf e Wollert (2004), sobrecargas hemodinâmicas podem conduzir à hipertrofia fisiológica ou patológica. Hipertrofia fisiológica é aquela desenvolvida em decorrência da sobrecarga hemodinâmica transitória como as observadas no crescimento cardíaco durante a adolescência, a gestação e em resposta a exercícios regulares (coração de atleta), enquanto que a hipertrofia patológica é aquela decorrente de sobrecarga hemodinâmica persistente, como observada na hipertensão arterial. Na hipertrofia patológica, além do aumento do tamanho da célula e a organização de novos sarcômeros, ocorrem diversas mudanças quantitativas e qualitativas nos níveis de expressão gênica dos cardiomiócitos, as quais modificam as proteínas contráteis, os canais iônicos, e determinam prejuízo da função contrátil.

O aumento da massa ventricular esquerda representa um marcador do desenvolvimento da insuficiência do órgão, geralmente decorrente de um persistente efeito deletério da hipertensão arterial. A partir desse quadro, vários estudos foram realizados com o intuito de avaliar e melhor entender o efeito da HVE sobre os eventos cardiovasculares e a incidência na mortalidade. Segundo o “*Framingham Heart Study*” (KANNEL, 1983), os indivíduos que apresentaram HVE, diagnosticada por meio de alterações eletrocardiográficas, apresentaram risco de morte seis vezes maior que a população em geral associada aos fatores de risco tradicionais, como dislipidemia (SUNDSTRÖM *et al.*, 2001, LEE *et al.*, 2005), tabagismo (ZHANG *et al.*, 2006) e hipertensão arterial (KEMPF e WOLLERT, 2004).

O aumento no estiramento dos cardiomiócitos e substâncias circulantes, como a endotelina 1 (ET1) (LEE *et al.*, 2005), a angiotensina II (LANG *et al.*, 2000), a insulina (FREDESORF *et al.*, 2004), e as catecolaminas (SUSSMAN, MCCULLOCH e BORG, 2002; DASH *et al.*, 2003), assim como fatores de crescimento e citocinas liberadas localmente pelas células miocárdicas (IZUMO e SODOSHIMA, 1997) e produtos do estresse oxidativo, como exemplo o ânion superóxido (O_2^-) (NAKAGAMI, TAKEMOTO e LIAO,

2003) induzem o crescimento hipertrófico dos cardiomiócitos. Entretanto, ainda não está completamente elucidado se o estímulo primário para a hipertrofia é o estiramento mecânico do coração, fatores neuro-humorais, ou mesmo da interação de ambos.

Os eventos subsequentes à hipercolesterolemia induzem ativação das células inflamatórias, infiltração de macrófagos na parede vascular coronariana e nas regiões intersticiais do tecido cardíaco caracterizada pela superexpressão do CD40L (SANGUIGNI *et al.*, 2005) e produção de citocinas (NIAN *et al.*, 2004). A interação entre CD40 e CD40L ativa a via NFkappa β (BARTER, 2003; GELBMANN *et al.*, 2003), promove a fosforilação do IKK (inibidor Kappa β quinase), resultando na translocação do fator nuclear Kappa β (NFkappa β) para o núcleo, onde ativa genes envolvidos na inflamação e no crescimento celular (NIAN *et al.*, 2004; VELLAICHAMY, SOMMANA e PANDEY, 2005). A ativação do NFkappa β participa do desenvolvimento da hipertrofia cardíaca em camundongos, caracterizada por aumento do depósito de colágeno (VELLAICHAMY, SOMMANA e PANDEY, 2005).

A HVE é induzida por fatores hemodinâmicos, como o aumento da necessidade metabólica e sobrecarga de pressão e/ou volume e fatores neuro-humorais como as catecolaminas, angiotensina II, insulina e estresse oxidativo (GARCIA *et al.*, 2008).

4.5 RESISTÊNCIA INSULÍNICA

A resistência insulínica desempenha um papel central no desenvolvimento da disfunção endotelial (evento precoce no processo de aterosclerose), através da indução de distúrbios nas vias de sinalização comuns tanto à ação da insulina como à produção do óxido

nítrico, além de aumentar o estresse oxidativo, os níveis de endotelina-1 (ET-1), a atividade do sistema renina-angiotensina e a secreção de hormônios e citocinas pelo tecido adiposo. A disfunção endotelial se caracteriza pela menor produção de óxido nítrico, o qual não só modula o tônus do músculo liso vascular como também inibe vários processos aterogênicos, tais como a adesão de plaquetas e monócitos, a oxidação do LDL, a síntese de citocinas inflamatórias e a proliferação das células musculares lisas vasculares (ORIO *et al.*, 2005; KADOWAKI e YAMAUCHI, 2005).

A disfunção endotelial está presente em diversas doenças metabólicas e/ou cardiovasculares, como na obesidade, intolerância à glicose, hiperglicemia (diabetes *mellitus*), hipertensão arterial e dislipidemia. Em todas essas condições ocorre resistência insulínica, a qual se apresenta como um distúrbio metabólico que se manifesta por redução na utilização da glicose pelo músculo esquelético periférico (FERRANNINI *et al.*, 1997), e tem sido fortemente associada à disfunção endotelial, que tem se mostrado ocorrer precocemente (HSUEH, LYON e QUIÑONES, 2004).

Defeitos na vasodilatação mediada pelo NO também podem contribuir para a resistência à insulina. Demonstrou-se que a infusão de inibidor do óxido nítrico sintase (NOS) não apenas diminui a vasodilatação dependente do endotélio, como também diminui a captação de glicose mediada pela insulina. Entretanto, há dados mostrando que a diminuição não ocorre em todos os órgãos e sistemas do organismo, apesar de ter ocorrido, com inibição da NOS, redução do fluxo do antebraço e aumento da pressão arterial (CULIC, DECKING E SCHRADER, 1999).

A idéia de que a função endotelial pode regular a captação de glicose pela insulina é interessante e pode contribuir para explicar achado de dois ensaios clínicos em que a melhora da disfunção endotelial com agentes como os inibidores da enzima conversora da angiotensina e uma estatina não apenas retardaram a progressão da doença arterial

coronariana e a morte, mas também preveniram o desenvolvimento do DM2 em pacientes de alto risco. Portanto, essas observações sugerem que a atenuação da doença cardiovascular é acompanhada de retardo na progressão do DM (HSUEH e QUIÑONES, 2003).

Nos tecidos-alvo, a insulina estimula duas vias: a via do fosfatidilinositol 3-quinase e a via da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK). A ativação da fosfatidilinositol 3-quinase, que ocorre após a ligação da insulina com seu receptor, é crítica para a captação de glicose nos tecidos-alvo dependentes de insulina, como o músculo esquelético, coração e tecido adiposo. Demonstrou-se, também, que essa via regula a produção endotelial de NO mediada por insulina. Quando a via da fosfatidilinositol 3-quinase está disfuncional, ocorre piora da vasodilatação dependente do endotélio estimulada pela insulina. Dessa forma, uma disfunção sistêmica na via da fosfatidilinositol 3-quinase, que define resistência insulínica, provoca também defeito tanto na captação de glicose quanto na vasodilatação dependente do endotélio mediada por insulina (HSUEH e QUIÑONES, 2003).

A via da MAPK é importante para as ações proliferativas da insulina. Entretanto, na vasculatura, essa via medeia não somente o crescimento celular, mas também a capacidade migratória das células endoteliais, do músculo liso vascular e dos monócitos. Além disso, ela parece mediar a expressão de um fator pró-trombótico, pró-fibrótico e o inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1), em resposta a diversos estímulos. Dessa forma, por estimular o crescimento e a migração celular e as respostas pró-inflamatórias e pró-trombóticas, a via da MAPK pode ser aterogênica. Uma questão importante é saber se essa via também está atenuada em estados de resistência insulínica (ANDERSON *et al.*, 2001; BONETTI, LERMAN e LERMAN, 2003).

Dados de vários estudos demonstram que a resistência insulínica e os defeitos associados com a síndrome metabólica são dependentes de defeito específico da via de sinalização da insulina, a via do fosfatidilinositol 3-quinase, enquanto as funções mediadas

pela via da MAPK operam normalmente. De fato, há dados mostrando que diminuição da via do fosfatidilinositol 3-quinase pela insulina está associada a aumento da via da MAPK em células vasculares. Assim, na presença de insulina, é possível que a hiperinsulinemia possa ser aterogênica (HSUEH e QUIÑONES, 2003).

McCarty (2003) propõe que os ácidos graxos também levam à resistência insulínica. O mecanismo pelo qual o aumento de ácidos graxos livres leva à diminuição da captação de glicose parece envolver o aumento da NADH e acetil CoA intramitocondriais. Como resultado, ocorre inibição da fosfofrutoquinase e hexoquinase II, levando ao aumento da concentração intracelular de glicose, bem como de sua captação. Entretanto, outros autores têm proposta diferente e sugerem que a inibição do transporte de glicose ou atividade de fosforilação precede a redução da síntese de glicogênio e oxidação de glicose induzida por ácidos graxos livres (DANDONA *et al.*, 2004).

Deve-se ressaltar que, aumentando-se os metabólitos intracelulares de ácidos graxos, pode haver ativação da cascata da quinase da serina/treonina, possivelmente via proteína quinase C delta, levando à fosforilação da serina/treonina do substrato para o receptor de insulina 1 (IRS-1). O IRS-1 fosforilado em serina não se liga nem ativa a PI-3 quinase, resultando em transporte diminuído de glicose e nas outras manifestações da resistência insulínica (BRECHTEL *et al.*, 2001).

Os ácidos graxos livres podem também interferir diretamente com a expressão, transcrição ou no recrutamento para a superfície celular do transportador GLUT-4. Além disso, os ácidos graxos livres reduzem o *clearance* hepático de insulina e aumentam a produção hepática de glicose; ambos potencializam os efeitos da resistência insulínica (DANDONA *et al.*, 2004).

Entre os mediadores inflamatórios, o TNF- α é um possível candidato a induzir resistência insulínica. Ele é produzido por adipócitos e está aumentado no tecido adiposo de

roedores obesos, bem como em humanos. O tratamento com TNF- α leva à redução da autofosforilação do receptor da insulina estimulada pela própria insulina e inibição subsequente da fosforilação de IRS-1 (ALDHAHI e HAMDY, 2003).

O TNF- α induz modificação do IRS-1 por fosforilação em serina, o que torna essa molécula inibitória para a sinalização do receptor de insulina. A neutralização dos efeitos do TNF- α , em ratos obesos, provoca aumento da sensibilidade insulínica. Ressalta-se que camundongos deficientes em TNF- α permaneceram sensíveis à insulina quando colocados em dieta rica em gordura (MONTANI *et al.*, 2002).

Dados recentes sugerem que, enquanto o TNF- α age de forma parácrina no adipócito, a IL-6 circula no plasma em concentrações relativamente altas, sendo, portanto, muito mais importante sistemicamente. De fato, ela é chamada de "citocina endócrina". Alguns dos efeitos metabólicos da IL-6 (uma citocina pleiotrópica) demonstram que, em estudos *in vitro*, essa citocina induziu inibição dependente de dose da liberação de insulina estimulada por glicose. *In vivo*, a IL-6 recombinante induziu alterações metabólicas usualmente encontradas em estados catabólicos, aumentando as concentrações plasmáticas de glicose sem alterar significativamente as concentrações plasmáticas de insulina ou peptídeo C. Apesar de as células gordurosas contribuírem com 1/3 da concentração circulante de IL-6, existem outras fontes importantes de produção, como os monócitos. Nesse contexto, talvez a IL-6 represente um fator hormonal que causa resistência insulínica. Quando a inflamação é mantida, crônica ou descontrolada, e quando o estímulo se torna excessivo, não se consegue alcançar os efeitos desejados, e assim há piora da hiperglicemia e da resistência insulínica. Isso resultaria em inflamação somente quando a resistência insulínica fosse grave (FERNÁNDEZ-REAL e RICART, 2003).

4.6 ÍNDICE HOMA (HOMEOSTASIS MODEL ASSESSMENT)

Métodos para determinação da resistência à insulina (RI) e da capacidade funcional das células beta (BcC) têm se multiplicado (OLEFSKY *et al.*, 1973; INSEL *et al.*, 1975; BERGMAN *et al.*, 1979), e podem ser agrupados em dois modelos: um, baseado na medida dinâmica das respostas insulínica e/ou glicêmica após estímulo, tais como *clamp* euglicêmico (DE FRONZO *et al.*, 1979), modelo mínimo (BERGMAN *et al.*, 1979), *continuous infusion of glucose with model assessment* (CIGMA) (HOSKER *et al.*, 1985) e *insulin sensitivity index* (ISI) (MATSUDA *et al.*, 1999); o outro, assentado em medidas estáticas, ou instantâneas, de um ou mais constituintes plasmáticos, mais frequentemente insulina, glicose, pró-insulina e peptídeo C, representado pelos índices *homeostasis model assessment* (HOMA) (BERGMAN *et al.*, 2003), e *quantitative insulin-sensitivity check index* (QUICKI) (KATZ *et al.*, 2000).

A medida da RI e da BcC ganhou maior interesse a partir dos trabalhos de Reaven, que em 1988 denominou de síndrome de resistência à insulina a coexistência frequente de hipertensão, DM2, dislipidemia e obesidade. Desde então, passou-se a aventar a relação direta entre RI e risco cardiovascular, mesmo em indivíduos ainda sem alterações da tolerância à glicose (BARZILAV *et al.*, 1999; COUTINHO *et al.*, 1999; TUAN *et al.*, 2003).

O índice HOMA, descrito por Matthews *et al.* (1985) pode ser calculado de duas maneiras: a estimativa da RI, na qual $HOMA-RI = \text{insulinemia de jejum (mU/L)} \times \text{glicemia de jejum (mmol/L)} / 22,5$; e a determinação da BcC, onde $HOMA-BcC = (20 \times \text{insulinemia de jejum [mU/L]}) / (\text{glicemia de jejum [mmol/L]} - 3,5)$. Por ser estimado simplesmente a partir da determinação da insulinemia e da glicemia de jejum, vem sendo amplamente utilizado e referido na literatura, sobretudo em estudos populacionais (ACOSTA *et al.*, 2002; BONORA

et al., 2004; FUKUSHIMA *et al.*, 2004; GOKCEL *et al.*, 2003; HAFFNER *et al.*, 1996; TANIGUCHI *et al.*, 2000; TORRENS *et al.*, 2004).

É perceptível a falta de um valor de corte estabelecido como referência para classificar os resultados dos pacientes. Desde que Matthews *et al.* (1985) definiram que indivíduos hígidos, com menos de 35 anos e peso corporal normal tinham HOMA-RI = 1 e HOMA-BcC = 100%, a literatura revela variação entre as propostas dos diversos autores para HOMA-RI: 3,0, definido em estudo envolvendo 90 japoneses hígidos e 281 diabéticos do tipo 2 (KUWANA *et al.*, 2002); $2,8 \pm 2,4$, em estudo com 6.511 americanos (ACOSTA *et al.*, 2002); $1,96 \pm 0,57$, para chilenos não obesos (BRAVATA *et al.*, 2004); $2,24 \pm 1,26$, encontrado por Gokcel *et al.* (2003) em turcos, e 2,5 considerado por Taniguchi *et al.* (2000) em um estudo que avalia a existência de duas variantes de não obesos levemente diabéticos, com e sem RI.

Tal variação pode estar assentada nas diferenças populacionais. Além disso, poderá estar influenciada pela falta de padronização das condições para realização das medidas de insulina e glicose que servem ao cálculo do índice HOMA, o que se ilustra pela diversidade de sistemas analíticos utilizados (KUWANA *et al.*, 2002).

Outro elemento importante a ser considerado é a variabilidade biológica (VB) da insulinemia que é devida a fatores como estresse (HOLMAN *et al.*, 1980) exercício físico (LEBLANC *et al.*, 1983) e o ritmo pulsátil de secreção insulínica (MATTHEWS *et al.*, 1983). Tais fatores contribuem para que a VB do índice HOMA-RI oscile de 7,1% em não diabéticos a 24,2% em diabéticos tipo 2, segundo Jayagopal *et al.* (2002), ou mesmo 31% para HOMA-RI e 32% para HOMA-BcC, conforme Matthews *et al.* (1985).

Segundo Wallace *et al.* (2004), outro detalhe importante a ser considerado para o possível sucesso da utilização do HOMA na prática clínica é o grau de especificidade analítica do ensaio para medida da insulina. Níveis de reação cruzada com pró-insulina e

outros precursores podem aumentar a variabilidade inter e intraensaio, se considerarmos a tendência de indivíduos com mais RI a exibir uma maior fração de pró-insulina circulante que aqueles com menos RI, o que contribuiria, falsamente, para o achado de elevações da insulinemia. Os ensaios disponíveis têm percentuais de cruzamento que podem variar de 0,2% a 40%, ou até mais. Os mais específicos têm sido mais recomendados.

Não obstante a importância do diagnóstico de RI para prevenção de DM2 e DCV, sobretudo, fica clara a necessidade de que a escolha da utilização do índice HOMA passe por uma padronização das condições pré-analíticas e analíticas de realização do teste, pela definição de um valor de corte amplamente aplicável ou, pelo menos, pertinente à população-alvo, bem como pelo estabelecimento de critérios de interpretação que orientem as decisões demandadas dos resultados, com o que também concorda uma ampla revisão sobre os usos do HOMA publicada por Wallace *et al.* (2004).

O clampeamento euglicêmico e hiperinsulinêmico é a medida "padrão ouro" reconhecida para a resistência à insulina. No estudo de Ferrara *et al.* (2001), os autores utilizam o HOMA, um substituto para a determinação da resistência à insulina por clampeamento, para mostrar uma ligação aparente entre a síndrome metabólica e a resistência à insulina. Como o clampeamento é tecnicamente mais complicado e causa um grande transtorno para o paciente, incluindo a necessidade de ficar de 2 a 3 horas num centro de pesquisa clínico, foram desenvolvidas várias medidas alternativas para a mensuração da resistência à insulina. O HOMA é uma das mais usadas e requer apenas uma amostra de glicemia de jejum para insulina e glicose.

4.7 HEMOGRAMA

A hematologia clínica é uma importante área de estudo sobre o estado de saúde dos animais, tendo o hemograma como um dos métodos de avaliação de diagnóstico e prognóstico de enfermidades (SWENSON, 1988; JAIN, 1993). O hemograma é um dos exames complementares de diagnóstico, por permitir uma análise laboratorial que estabelece aspectos quantitativos e qualitativos dos eritrócitos (eritrograma), dos leucócitos (leucograma) e das plaquetas (plaquetograma) no sangue (DESCAT, 2002; FAILACE, 2003; OLIVEIRA, 2007).

O hemograma pode ser realizado utilizando-se métodos não automatizados, método do hemocítômetro, e também, por meio de equipamentos automatizados – com ampla variação tecnológica eletrônica associada à informática. Várias publicações científicas comparando as metodologias não automatizadas e automatizadas demonstram que os resultados obtidos não apresentam diferenças estatisticamente significantes (MORESCO *et al.*, 2003; FAILACE e PRANKE, 2004; LEITE *et al.*, 2007; MATANA *et al.*, 2008; BORGES e SIQUEIRA, 2009; MACKELLY, 2009). Assim, a tendência é a substituição gradual pelos equipamentos automatizados (NAOUM, 2009).

O eritrograma ou hematimetria é a parte do hemograma que inclui os testes laboratoriais que determinam o perfil hematológico da série vermelha do sangue periférico. A hematimetria é uma avaliação quantitativa da massa de eritrócitos e hemoglobina no sangue circulante, que fornece informações sobre a morfologia dos eritrócitos (OLIVEIRA, 2007).

Através do leucograma podem-se analisar os testes laboratoriais que determinam o perfil hematológico da série branca (leucócitos) no sangue periférico; estas células são responsáveis pela defesa do organismo. O leucograma é composto pela contagem global e diferencial de leucócitos. A contagem diferencial de cada leucócito (neutrófilos, eosinófilos,

basófilos, linfócitos e monócitos) é emitida em porcentagem (%) na contagem relativa e número de leucócitos/mm³, na contagem absoluta. É realizada também a avaliação da morfologia das células no estiraço sanguíneo (DESCAT, 2002).

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue periférico e são produzidos na medula óssea a partir de células progenitoras multipotenciais, sob ação de numerosos mediadores, em especial os fatores G-CSF e GM-CSF (ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2004).

Os neutrófilos maduros são células altamente especializadas no exercício da fagocitose e destruição intracelular de bactérias, principalmente por mecanismos que envolvem a ativação de peroxidação e uso de proteínas de seus grânulos e citoplasma como lisozimas, defensinas, proteínas catiônicas, entre outras (OLIVEIRA, 2007).

Os neutrófilos circulantes são células esféricas desprovidas de movimentação ativa expressiva. No entanto, nas proximidades de uma lesão inflamatória os neutrófilos aderem à parede endotelial, deixam os vasos sanguíneos e movimentam-se ativamente em direção ao foco inflamatório. Este processo envolve várias moléculas, que são ativadas e desativadas sequencialmente ou movimentadas em diferentes regiões da célula. As principais são moléculas que controlam a adesão dos neutrófilos às células endoteliais e ao colágeno (integrinas, selectinas e outras), e moléculas com capacidade contrátil que fazem a célula avançar ativamente no movimento migratório (F-actina e miosina II). De uma maneira simplificada, o processo de migração dos neutrófilos pode ser dividido em três fases distintas: a) ligação ou adesão primária, b) adesão secundária, C) diapedese ou transmigração (WINKELSTEIN, MARINO e JOHNSTON, 2000).

Os eosinófilos são células com atividade proinflamatória e citotóxica considerável, participando da reação e patogênese de numerosas doenças alérgicas, parasitárias e neoplásicas. A peroxidase é diferente dos neutrófilos, cujas sínteses são controladas por

agentes diferentes, embora o efeito bioquímico e a ação na célula sejam os mesmos: gera atividade de peróxido na célula, capaz de destruir numerosos tipos de bactérias, fungos, helmintos e vírus. O principal componente dos grânulos dos eosinófilos é a proteína básica, capaz de destruir larvas de parasitas e células tumorais (BAIN, 2000).

Eosinófilos e neutrófilos têm origens e funções semelhantes. No entanto, enquanto os neutrófilos acumulam-se rapidamente em focos de infecção bacteriana, os eosinófilos são atraídos para tecidos onde há invasão por parasitas ou sítios de reações alérgicas (ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2004). Os basófilos são os leucócitos mais escassos do sangue, apresentam similaridade com os mastócitos, mas são células distintas: os mastócitos são células do tecido conjuntivo que não entram em circulação e não são relacionados com os basófilos quanto à sua origem (OLIVEIRA, 2007).

Os basófilos são as principais fontes de histamina em circulação. Interação de seus receptores de Fc com IgE determina a desgranulação com liberação de histamina e calicreína, que são os principais mediadores de reações de hipersensibilidade imediata em anafilaxia, asma e urticária. Além disso, a histamina é um potente agente quimiotático para os eosinófilos, contribuindo para atraí-los para o foco inflamatório (ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2004). Outras substâncias liberadas pelos basófilos também participam como mediadores do processo inflamatório, como leucotrienos (LTB₄), tripsina, quimiotripsina e PAF (ETZIONI *et al.*, 1999).

As células do sistema de fagócitos mononucleares originam-se na medula óssea; os precursores mais imaturos são os monoblastos e promonócitos. Estas células são liberadas da medula óssea e transitam pelo sangue periférico como monócitos, migrando em seguida para os tecidos, onde desempenham sua principal atividade funcional (CLINE *et al.*, 1978). A passagem do monócito do sangue para macrófagos nos tecidos implica uma série de alterações funcionais, em especial um aumento da capacidade fagocitária, intensa expressão

de receptores de membrana para IgG e para complemento e um aumento dos lisossomos e mitocôndrias. Os macrófagos dos tecidos são ativados em condições de estímulo inflamatório ou imunológico (ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2004).

Segundo Neto *et al.* (2006), os monócitos são os principais componentes da progressão da doença aterosclerótica estimulando a aterogênese e a trombogênese.

Os linfócitos que fazem parte do sistema imune têm como função principal defender o organismo contra infecções. Ocasionalmente, podem agredir o próprio organismo, causando doenças autoimunes. Todos os linfócitos derivam de precursores hematopoéticos multipotentes da medula óssea, com capacidade de diferenciação em precursores das várias linhagens hematopoéticas, dando origem às células mielóides e linfócitos (ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2004).

Segundo Oliveira (2007), o plaquetograma envolve a contagem de plaquetas, sendo expressa em $PLT \times 10^3/mm^3$, a avaliação da sua morfologia feita por microscopia e as determinações do volume plaquetário médio e da variação entre os seus volumes. As plaquetas são células que participam do processo de coagulação sanguínea e vivem em média dez dias na circulação sanguínea. Esta sobrevivência está reduzida em algumas condições clínicas como a púrpura trombocitopênica idiopática, trombocitopenia induzida por drogas, o diabetes, aterosclerose coronariana e na AIDS, enquanto que a esplenectomia prolonga a vida das plaquetas.

4.8 MODELO ANIMAL

Segundo Smithies e Maeda (1995) os camundongos naturalmente apresentam níveis de HDL elevados, enquanto que níveis de LDL são baixos em relação aos níveis encontrados

em humanos, sendo que tais condições exercem um papel protetor contra a aterosclerose. Uma vez que o HDL é responsável pelo transporte de mais de 85% do colesterol plasmático de camundongos, enquanto que em humanos a principal lipoproteína carreadora de colesterol é a LDL (65-85%) (BRESLOW, 1996; FAZIO e LINTON, 2001). Os camundongos também apresentam a ausência da lipoproteína A, uma lipoproteína pró-aterogênica presente em humanos. Embora não muito bem entendida, a diferença entre camundongos e humanos é devido a alguns fatores conhecidos, tais como: ausência da CETP (proteína de transferência de ésteres de colesterol) no plasma de camundongos (em humanos, ela transfere ésteres de colesterol da HDL para VLDL e triacilgliceróis na direção oposta); lípase hepática, a qual é ligada à membrana em humanos e solúveis em camundongos; reduzida síntese de apo B-100 em camundongos; alta eficiência da apo E murina, quando comparada com a apo E humana, no que diz respeito à remoção de lipoproteínas remanescentes. Apesar destas diferenças, camundongos e seres humanos possuem, com poucas exceções, o mesmo conjunto de genes que controlam o metabolismo de lipoproteínas (FAZIO e LINTON, 2001).

O camundongo LDLr^{-/-} foi criado através da remoção do gene para o receptor de LDL para induzir altas concentrações séricas das lipoproteínas aterogênicas, LDL e IDL. Uma vez que possui o *clearance* de LDL, VLDL e IDL plasmático diminuído (BRESLOW, 1996), estes animais têm sido extensivamente usados para estudar os mecanismos aterogênicos, ensaios de intervenção de medicamentos e para investigar o papel do sistema imune na aterosclerose (FAZIO e LINTON, 2001).

Nas décadas de 60 e 70, foram desenvolvidas dietas capazes de induzir uma hiperlipidemia leve em camundongos. Uma vez alimentadas por vários meses com tais dietas, certas cepas desenvolveram lesões com estrias de gordura na aorta proximal (VESSELINOVITCH e WISSILER, 1968). No início da década de 80, vários pesquisadores caracterizaram as lipoproteínas e demonstraram as diferenças nos níveis destas associadas às

diferentes cepas de camundongos (LEBOEUF *et al.*, 1983; LUSIS *et al.*, 1983). Paigen *et al.* (1987) desenvolveram um método que permitiu quantificar lesões ateroscleróticas em camundongos. Na década de 90, a engenharia genética permitiu o desenvolvimento de modelos de camundongos transgênicos capazes de desenvolver lesões avançadas, em contraste com as discretas lesões observadas em camundongos selvagens alimentados com dietas aterogênicas (BRESLOW, 1996). Há concordância de que camundongos *knockout* para Apo E (apolipoproteína E) ou para o receptor de LDL podem desenvolver lesões que compartilham aspectos semelhantes às lesões humanas avançadas (ROSENFELD *et al.*, 2000; CALARA *et al.*, 2001; JOHNSON e JACKSON, 2001).

Os camundongos LDLr^{-/-}, quando recebem uma dieta moderada de colesterol apresentam um aumento maior nas partículas de IDL e LDL e um aumento pronunciado das lipoproteínas. Camundongos machos e fêmeas LDLr^{-/-} são férteis, possuem os níveis de colesterol total no plasma 35 vezes maior que nos animais selvagens (WT), apresentam um aumento de 7 a 8 vezes na quantidade de IDL sem apresentar mudanças significativas no HDL, e os níveis de triacilgliceróis são normais (KRIEGER *et al.*, 2006).

Estudos recentes mostram que camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica por 15 dias apresentam aterosclerose, aumento de 4,7 vezes na concentração plasmática de colesterol e triglicérides, respectivamente, em relação aos camundongos LDLr^{-/-} com dieta padrão (KRIEGER *et al.*, 2006; TIAN *et al.*, 2006).

As manifestações patológicas relativamente leves nos camundongos LDLr^{-/-}, alimentados com ração comercial, são provavelmente atribuídas ao fato de estes animais não alcançarem as concentrações de colesterol observadas em humanos com hipercolesterolemia familiar homozigótica. Tal diferença pode ser explicada pelo fato de o fígado destes camundongos, diferente ao do humano, produzir duas versões da apolipoproteína B, apo B-100 e apo B-48, ambas sendo incorporadas na VLDL. Em humanos e camundongos, as VLDL

que apresentam apo B-100 fornecem partículas remanescentes contendo apo B-100 (IDL), que são retiradas do plasma pelos receptores de LDL. O fígado de camundongos também produz VLDL contendo apo B-48, diferente de humanos, onde tal partícula é secretada somente no intestino, compondo os QM. Lipoproteínas contendo apo B-48 geram remanescentes que podem se ligar a um segundo receptor, designado como receptor para quilomícrons remanescentes. Os quilomícrons remanescentes de VLDL, que apresentam a apo B-48, são retirados rapidamente da circulação mesmo quando os receptores de LDL estão ausentes. Essa retirada de circulação é atribuída à capacidade das partículas de apo B-48 aceitar apo E, que se liga aos receptores de remanescentes de QM. No camundongo LDLr/- aproximadamente 70% da apo B hepática está na forma de apo B-48, e acredita-se que isso possa contribuir para a pouca elevação das concentrações de LDL nestes animais alimentados com dieta comercial (ISHIBASHI *et al.*, 1994).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O protocolo experimental utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, nº do protocolo: 03A/2007.

5.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram realizados em camundongos selvagens (cepa C57BL6) e em camundongos homozigotos para a ausência do gene do receptor de LDL (LDLr^{-/-}) gerados no *background* C57BL6, machos com 3 meses de idade, pesando 22 ± 3 g. Os animais foram obtidos no *Jackson Laboratories* (EUA) e criados no biotério da Universidade José do Rosário Vellano –UNIFENAS (Alfenas MG, Brasil). Os animais foram mantidos nesse local numa sala sob ciclo claro/escuro 12/12horas à temperatura de 23°C. Os camundongos foram divididos em 3 grupos experimentais e acondicionados em caixas de plástico com 6 animais cada, assim constituídos: Grupo WT (n=12), camundongos selvagens, os quais receberam ração padrão para roedores (Nuvital®); Grupo S (n=12), camundongos LDLr^{-/-} que receberam ração padrão para roedores (Nuvital®); Grupo HL (n=12), camundongos LDLr^{-/-} que receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5 % de

ácido cólico. Todos os animais receberam água *ad libitum* e as respectivas dietas durante 15 dias.

Os animais foram pesados antes e depois de 15 dias de experimento em balança eletrônica de precisão modelo EK-2000G marca AND.

5.3 COLETA DAS AMOSTRAS

Após 15 dias de experimento, os camundongos permaneceram por jejum de 12 horas e em seguida foram anestesiados por via intraperitoneal (ip) utilizando-se Xilazina/Ketamina (Bayer AS e Parke-Davis®, respectivamente) na concentração de 6- 40 mg/Kg, respectivamente.

Após a anestesia, o sangue foi coletado por punção do plexo venoso retro-orbital, utilizando capilares heparinizados. O sangue coletado de 6 animais de cada grupo foi destinado para análises bioquímicas e 6 para análises hematológicas. As amostras de sangue destinadas para análises bioquímicas foram centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C, em centrífuga BR4i rpm 14.000 marca Jouan, para obtenção do soro, o qual foi encaminhado para as determinações séricas. As amostras de sangue destinadas para análises hematológicas foram coletadas utilizando-se o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (2mg/mL de sangue). Os parâmetros hematológicos avaliados foram descritos abaixo.

Após a coleta do sangue, foi realizada a toracotomia nos animais, sendo removidos o coração e a aorta. O ventrículo esquerdo foi pesado a fresco (mg), e foi calculada a proporção peso ventricular esquerdo em mg/peso do animal em g. A aorta e o ventrículo esquerdo foram

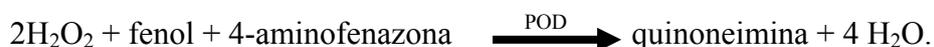
fixados em formalina 10% por 24 horas e armazenados em álcool 70°, para procedimentos histológicos.

5.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As determinações séricas de glicose, insulina, triglicérides, colesterol total e colesterol HDL foram realizadas por métodos espectrofotométricos em automação no aparelho Humastar 300. Foram empregados sistemas colorimétricos e enzimáticos, cujos procedimentos técnicos seguiram os protocolos descritos nos kits comercialmente disponíveis.

5.4.1 Determinação da Glicemia

A determinação da concentração de glicose circulante foi realizada pelo método enzimático colorimétrico sem desproteinização, utilizando o Kit Glucose Liquicolor da *in vitro* (TRINDER, 1969; SACKS *et al.*, 2002). A glicose foi determinada após a oxidação enzimática na presença de glicose oxidase. O peróxido de hidrogênio formado reagiu sob catálise da peroxidase com fenol e 4-aminofenazona originando a quinoneimina que é um cromógeno vermelho-violeta. A glicose na amostra sofreu a seguinte reação:



A intensidade de cor emitida foi diretamente proporcional à quantidade de glicose na amostra do soro. A leitura de absorvância foi feita no espectrofotômetro a 500 nm. A concentração de glicose foi expressa em mg/dL, e calculada pela fórmula:

$$[\text{Glicose}] = \frac{\text{absorbância da amostra}}{\text{absorbância do padrão}} \times N$$

onde,

[Glicose] = concentração de glicose na amostra (mg/dL)

N = concentração padrão (100 mg / dL)

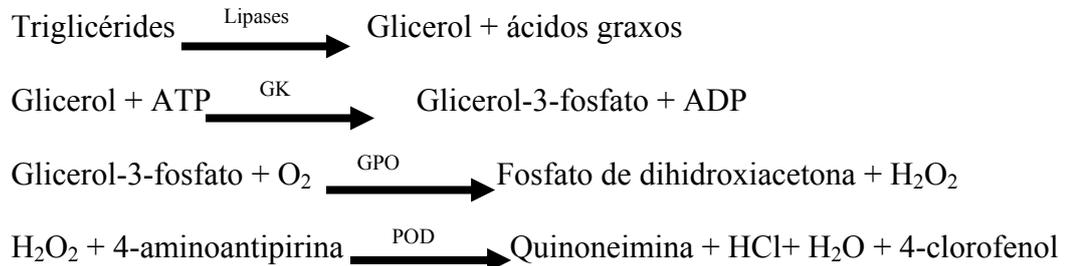
5.4.2 Determinação de Insulina

As concentrações de insulina foram determinadas pelo método imunométrico em fase sólida quimioluminescente usando-se o analisador Immulite 2000 (Euro/DPC Ltda., Reino Unido).

5.4.3 Determinação de Triglicerolemia

A triglicerolemia foi determinada pelo método enzimático colorimétrico com fator clareante de lípidos, conforme o Kit Triglycerides Liquicolor *in vitro*. Os triglicérides são determinados após hidrólise enzimática com lipases. O indicador foi a quinoneimina formada

a partir do peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol sob a influência catalítica da peroxidase (TRINDER, 1969). A reação aconteceu da seguinte forma:



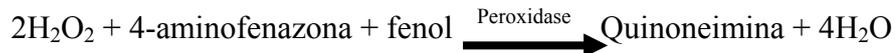
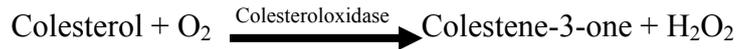
O kit é composto de: solução tampão IPES (pH: 7,5) 50mmol/L, íons magnésio 4,5mmol/L, 4-clorofenol 5 mmol/L, 4-aminoantipirina 0,25 mmol/L, ATP 2 mmol/L, glicerol quinase $\geq 0,4\text{U/mL}$, glicerol-3-fosfato oxidase $\geq 1,5\text{U/mL}$, lipases $\geq 1,3\text{U/mL}$, peroxidase $\geq 0,5\text{U/mL}$. As amostras foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante, e após a leitura da absorbância em 500nm, a concentração de triglicérides foi calculada em mg/dL utilizando-se a fórmula:

$$C = 200 \times \frac{\text{absorbância da amostra}}{\text{absorbância do padrão}}$$

5.4.4 Determinação de Colesterolemia

A colesterolemia foi determinada pelo método enzimático colorimétrico com fator clareante de lípidos, conforme Kit Cholesterol Liquicolor - *IN VITRO*. O colesterol foi determinado após hidrólise enzimática e oxidação. Um indicador quinoneimina foi formado a partir do peróxido de hidrogênio e 4-aminofenazona na presença do fenol e peroxidase, com leitura de absorbância em 500 nm (TRINDER, 1969). A reação aconteceu da seguinte forma:



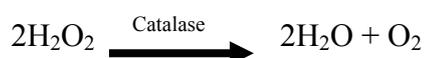
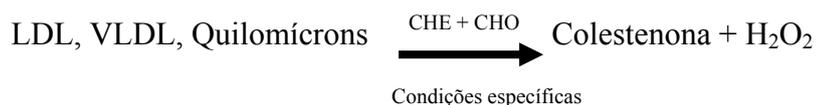


O kit de dosagem é composto de: tampão fosfato (pH: 6,5) 100 mmol/L, 4-aminofenazona 0,3 mmol/L, fenol 5 mmol/L, peroxidase > 5 KU/L, colesteroesterase > 150 U/L, colesterooxidase > 100 U/L, azida sódica 0,005%. As amostras foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante do kit, e após a leitura da absorbância em 500 nm, foi calculada a concentração de colesterol em mg/dL.

5.4.5 Determinação de colesterol HDL

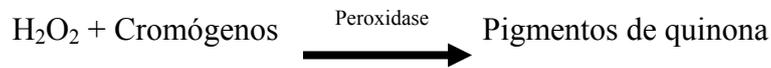
Para determinação do HDL foi utilizado o sistema enzimático colorimétrico do Kit Colesterol HDL direto - *IN VITRO*. O teste combina duas etapas específicas: na primeira etapa os quilomícrons, colesterol VLDL e colesterol LDL foram especificamente eliminados e destruídos por reações enzimáticas. Na segunda etapa, o colesterol remanescente da fração HDL foi determinado por reações enzimáticas específicas bem estabelecidas na presença de surfactantes específicos para HDL (WARNICK, NAUCK E RIFAI, 2001). A reação seguiu da seguinte maneira:

Primeira etapa:



Segunda etapa:

Surfactantes específicos



O Kit contém: tampão de Good (pH: 6,6) 100mmol/L, cloreto de sódio 170 mmol/L, colesterol-esterase 1400U/L, colesterol oxidase 800 U/L, catalase 600 KU/L, ascorbato oxidase 3000 U/L, n-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina 0,56 mmol/L. Após a medida da absorbância das amostras em 593nm, foi calculada a concentração de colesterol HDL em mg/dL.

5.4.6 Determinação de colesterol VLDL e LDL

Os valores das concentrações do colesterol VLDL foram obtidos pela divisão dos valores de triglicérides por 5 e os valores do colesterol LDL pela subtração de colesterol HDL e VLDL do colesterol total, de acordo com Friedewald, Levy e Fredrickson (1972).

5.5 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS**5.5.1 Contagem Total e Diferencial de Leucócitos**

A contagem total (leucócitos/mm³) e a contagem diferencial de leucócitos foram realizadas segundo métodos descritos por Silva e Hashimoto (2003).

5.5.2 Contagem de Eritrócitos

A contagem do número de eritrócitos foi feita pela soma do número total de hemácias, observadas após a contagem de cada um dos cinco quadrados do quadrante central da câmara de Neubauer ($H1 + H2 + H3 + H4 + H5$) utilizando-se microscópio óptico comum (aumento de 400X) e multiplicando-se o resultado por 10.000 (número de eritrócitos/ mm^3 de sangue = $H1 + H2 + H3 + H4 + H5 \times 10.000$) (OLIVEIRA, 2007).

5.5.3 Hematócrito

Após aspiração da amostra de sangue total por capilaridade em tubos para micro-hematócrito (até aproximadamente 2/3 do tubo capilar), a parte oposta à que foi utilizada para aspiração foi vedada com o auxílio de chama. O tubo capilar foi colocado em microcentrífuga (com a parte vedada para o sentido de fora) e centrifugado em 11.000 rpm por 5 minutos. Foi realizada leitura em escala apropriada, ajustando-se o limite inferior da parte globular à base da escala e o limite superior da camada plasmática à parte superior da escala, sendo o local de separação entre a fase plasmática e a parte celular o valor do hematócrito (HT) (OLIVEIRA, 2007).

5.5.4 Dosagem de Hemoglobina

A dosagem de hemoglobina (Hb) foi obtida através do método de Drabkin e Austin (1935), seguindo-se o procedimento descrito no *kit* comercial da Labtest®. A hemoglobina, em presença de reagente de Drabkin, forma um composto, a cianometahemoglobina. Após a leitura em espectrofotômetro capaz de medir com exatidão a absorvância entre 520 nm e 550nm, a absorvância final a 540 nm foi proporcional à concentração de hemoglobina na amostra. O cálculo da concentração de hemoglobina (g/dL) foi feito utilizando-se o produto Padrão de Hemoglobina Labtest®, obtido pela razão entre a absorvância do teste e a absorvância do padrão (0,280) e multiplicando-se o resultado por 10.

5.5.5 Contagem de Plaquetas

A contagem do número de plaquetas foi feita pela soma do número total de plaquetas, observadas após a contagem de cada um dos cinco quadrados do quadrante central da câmara de Neubauer (H1 + H2 + H3 + H4 + H5) utilizando-se microscópio óptico comum (aumento de 400X) e multiplicando-se o resultado por 1.000 (número de plaquetas/mm³ de sangue = H1 + H2 + H3 + H4 + H5 X 1.000) (OLIVEIRA, 2007).

5.6 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS, MORFOLÓGICAS E IMUNOISTOQUÍMICAS

O ventrículo esquerdo e a aorta foram incluídos em parafina para cortes histológicos de 4µm de espessura, segundo Junqueira, Bignolas e Brentani (1979).

Lâminas com cortes histológicos do ventrículo esquerdo foram tratadas com peróxido de hidrogênio 3% para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos com leite desnatado 2% diluído em PBS (*phosphate-buffered saline*) 10Mm pH 7,4. As lâminas foram incubadas por 12 horas com anticorpo policlonal produzido em coelho anti-CD40L (Santa Cruz® 1:50) em câmara úmida. Após a incubação com o anticorpo primário, foi feita a incubação com anticorpo secundário biotilado (kit Dako® LSAB+), durante 1 hora à 37°C. Para evidenciar as áreas imunorreativas os cortes foram incubados com o complexo conjugado com peroxidase (Dako® LSAB+), durante 45 minutos à 37°C e colocadas em solução de cromógeno (50mg de DAB em 50ml de PBS com 3ml de água oxigenada 10%) por 3 minutos. Após contracoloração com Hematoxilina de Harris (Sigma®) por 25 segundos, as lâminas foram montadas e analisadas pelo *software* LGMC-image versão 1.0 e as porcentagens fracionais da área imunorreativa para o CD40L do miocárdio foram adquiridas (ARMSTRONG *et al.*, 1998).

Lâminas com cortes histológicos da aorta foram coradas com hematoxilina/eosina. A medida das áreas luminal, média e íntima foram realizadas pelo *software* LGMC-image versão 1.0. A área média é a área entre a face interna da lâmina elástica interna e a superfície endotelial do lúmen (TIAN *et al.*, 2006).

Lâminas com cortes histológicos da artéria aorta também foram coradas com picrossírius red, para análise quantitativa do colágeno. Foram obtidas quatro fotomicrografias, a partir de um mesmo ponto pré-fixado dos cortes transversais das aortas de cada animal,

utilizando-se a câmara digital acoplada ao programa Leica IM50 versão 1.20. Os cortes corados com picosírius red foram analisados com luz polarizada. Cada fotomicrografia foi analisada pelo software LGMC-image versão 1.0, por meio do qual foram adquiridas as porcentagens fracionais de colágeno (ARMSTRONG *et al.*, 1998) referentes às áreas marcadas em vermelho pelo picosírius red. As porcentagens de colágeno foram quantificadas nas áreas média e íntima da parede das artérias. Na quantificação da área total inclui-se a área adventícia.

Todas as análises histológicas foram executadas por um único examinador, utilizando o método duplo cego.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey, foi utilizada para comparar as médias entre diferentes grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

Os camundongos do grupo S não apresentaram diferenças quanto ao nível plasmático de glicose e insulina e ao índice de Homa ($HOMA_{ir}$) quando comparados com o grupo WT (TABELA 1). Entretanto, os camundongos do grupo HL apresentaram marcado aumento quanto ao nível plasmático de insulina e do índice de Homa quando comparados com os grupos S e WT (TABELA 1).

Na análise do perfil lipídico, verificou-se uma hiperlipidemia média nos camundongos do grupo S, com níveis plasmáticos de triglicérides e colesterol total (CT) aumentados quando comparados com o grupo WT (TABELA 1). Os camundongos do grupo HL apresentaram hiperlipidemia severa em relação aos grupos S e WT (TABELA 1). Quanto às frações do colesterol, observou-se um aumento nos níveis de HDL, LDL e VLDL no grupo S em comparação ao grupo WT (TABELA 1), e os camundongos do grupo HL apresentaram uma diminuição nos níveis plasmáticos do HDL e um marcado aumento nos níveis de LDL e VLDL em comparação aos outros grupos (TABELA 1). Observou-se também que as relações LDL/HDL e CT/HDL foram superiores no grupo HL quando comparado ao S (TABELA 1), não havendo diferenças entre os grupos S e WT (TABELA 1).

TABELA 1

Comparação dos níveis plasmáticos de glicose, insulina e lipídeos; do índice de Homa ($HOMA_{ir}$) e das relações do colesterol (LDL/HDL e CT/HDL) entre camundongos *wild type* (WT) e LDLr^{-/-} alimentados com dieta padrão (S) e com dieta hiperlipídica (HL)

	WT	S	HL
n	6	6	6
Glicose (mMol/L)	5,4±0,2 ^a	5,5±0,1 ^a	5,6±0,1 ^a
Insulina (µm/mL)	2,7±0,6 ^a	2,7±0,2 ^a	5,8±0,9 ^b
Homa _{ir}	0,7±0,05 ^a	0,7±0,06 ^a	1,5±0,28 ^b
Triglicérides (mg/dL)	88,5±3,3 ^a	123,5±4,0 ^b	142,8±6,6 ^c
Colesterol Total (mg/dL)	128,5±8,2 ^a	225,5±10,0 ^b	631,2±32,0 ^c
HDL (mg/dL)	46,8±1,7 ^a	59,2±2,2 ^b	25,5±1,9 ^c
LDL (mg/dL)	64,0±2,0 ^a	141,5±8,6 ^b	577,2±31,9 ^c
VLDL (mg/dL)	17,7±0,7 ^a	24,8±0,9 ^b	28,5±1,3 ^c
LDL/HDL	1,37±0,07 ^a	2,40±0,14 ^b	22,64±2,23 ^c
CT/HDL	2,75±0,08 ^a	3,81±0,09 ^a	24,75±2,24 ^b

Os valores foram expressos como média ± EPM. Letras iguais indicam não significância e letras diferentes indicam significância ao nível de 5% pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na análise imunoistoquímica, os camundongos do grupo S apresentaram imunorreatividade para CD40L no miocárdio e na artéria coronária quando comparados com os do grupo WT. Esta imunorreatividade foi potencializada nos camundongos do grupo HL (FIGURA 3A e 3B, TABELA 2).

Na análise morfológica e morfométrica das áreas íntima e média da artéria aorta, os camundongos dos grupos S e HL apresentaram um remodelamento arterial em comparação com o grupo WT. Esse remodelamento arterial foi caracterizado pelo aumento na área íntima e entre as fibras elásticas na área média (FIGURA 3C e TABELA 2), e por um maior depósito de colágeno nas túnica média-íntima e do colágeno total nas túnica íntima, média (TABELA 2) e adventícia (TABELA 2 e FIGURA 3D). O remodelamento arterial dos camundongos HL foi muito mais expressivo quando comparado com o grupo S (TABELA 2, FIGURA 3C e 3D).

TABELA 2

Comparação da porcentagem da área imunorreativa para o CD40L no miocárdio, e da área íntima, da área média, da porcentagem de colágeno na camada média-íntima e colágeno total na artéria aorta entre camundongos *wild type* (WT) e LDLr^{-/-} alimentados com dieta padrão (S) e com dieta hiperlipídica (HL)

	WT	S	HL
n	6	6	6
Área imunorreativa para CD40L no miocárdio (%)	0,0±0,0 ^a	3,4±0,2 ^b	7,7±0,3 ^c
Área íntima (μm ²)	27274±1691 ^a	32931±1950 ^b	46402±822 ^c
Área média (μm ²)	74904±884 ^a	73960±981 ^a	85638±1618 ^b
Colágeno média-íntima (%)	3,4±0,2 ^a	5,5±0,2 ^b	7,2±0,5 ^c
Colágeno Total (%)	14,4±0,5 ^a	15,8±0,3 ^b	18,6±0,6 ^c

Os valores foram expressos como média ± EPM. Letras iguais indicam não significância e letras diferentes indicam significância ao nível de 5% pelo teste de Tukey (p<0,05).

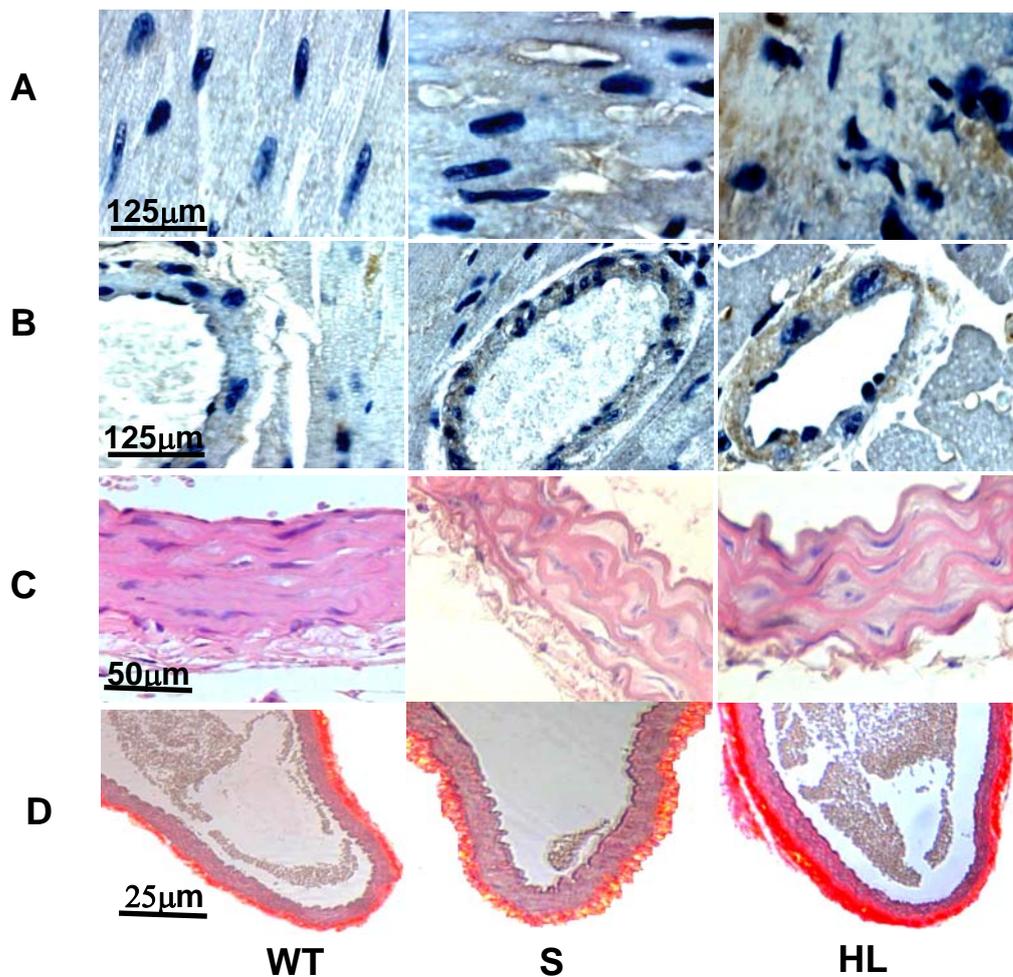


FIGURA 3- Fotomicrografias de cortes histológicos transversais do ventrículo esquerdo mostrando área imunorreativa para CD40L no miocárdio (A) e artéria coronária (B); Fotomicrografias de cortes histológicos da aorta corados com HE (C) e picrosirius red (D) nos camundongos *wild type* (WT) e LDLr^{-/-} alimentados com dieta padrão (S) e com dieta hiperlipídica (HL).

Na análise dos parâmetros hematológicos relacionados ao leucograma, os camundongos dos grupos S e HL apresentaram diminuição na contagem total de leucócitos em relação ao grupo WT. Entretanto, os camundongos do grupo HL apresentaram aumento na contagem total de leucócitos em relação ao grupo S (TABELA 3). Em relação à contagem diferencial de leucócitos, houve uma diminuição de linfócitos e de monócitos nos grupos S e HL quando comparados com o grupo WT (TABELA 3). A diminuição dos monócitos foi mais severa no grupo HL (TABELA 3). Os camundongos do grupo S apresentaram diminuição na contagem de neutrófilos em relação aos camundongos do grupo WT (TABELA 3). Entretanto, os camundongos do grupo HL apresentaram aumento na contagem de neutrófilos em relação ao grupo S (TABELA 3).

TABELA 3

Comparação da contagem total e diferencial de leucócitos (leucócitos/mm³) entre camundongos *wild type* (WT) e LDLr^{-/-} alimentados com dieta padrão (S) e com dieta hiperlipídica (HL)

		Contagem total e diferencial de leucócitos/mm ³					
		Total de leucócitos	Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos
Wild type	WT(n=6)	5783 ± 694 ^a	848 ± 217 ^a	4708 ± 455 ^a	228 ± 48 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	LDLr^{-/-} S (n=6)	2983 ± 239 ^b	379 ± 36 ^b	2531 ± 243 ^b	73 ± 28 ^b	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	HL (n=6)	3517 ± 185 ^c	772 ± 103 ^a	2728 ± 165 ^b	17 ± 12 ^c	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a

Os valores foram expressos como média ± EPM. Letras iguais indicam não significância e letras diferentes indicam significância ao nível de 5% pelo teste de Tukey (p<0,05).

Na análise dos parâmetros hematológicos relacionados ao eritograma não foram observadas alterações significativas entre os grupos de camundongos estudados (TABELA 4). Porém, houve um aumento na contagem do número de plaquetas nos camundongos do grupo HL em relação aos outros grupos estudados (TABELA 4).

TABELA 4

Comparação dos parâmetros hematológicos do eritrograma e da contagem de plaquetas entre camundongos *wild type* (WT) e LDLr^{-/-} alimentados com dieta padrão (S) e com dieta hiperlipídica (HL)

		Parâmetros hematológicos do eritrograma e contagem de plaquetas			
		Eritrócitos (10⁶/mm³)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Plaquetas (10³/mm³)
Wild type	WT (n=6)	4,7 ± 0,1 ^a	12,5 ± 0,3 ^a	40,0 ± 0,8 ^a	238 ± 11 ^a
LDLr^{-/-}	S (n=6)	4,8 ± 0,2 ^a	13,3 ± 0,5 ^a	42,0 ± 1,8 ^a	241 ± 27 ^a
	HL (n=6)	4,7 ± 0,1 ^a	13,3 ± 0,2 ^a	41,2 ± 0,8 ^a	301 ± 5 ^b

Os valores foram expressos como média ± EPM. Letras iguais indicam não significância e letras diferentes indicam significância ao nível de 5% pelo teste de Tukey (p<0,05).

7 DISCUSSÃO

No presente estudo, observamos que os camundongos do grupo S apresentaram níveis plasmáticos de HDL elevados associados a uma leucopenia, em decorrência da neutropenia e monocitopenia; e a uma resistência ao desenvolvimento das lesões na parede da aorta e ao processo inflamatório cardíaco, caracterizado pela baixa imunorreatividade do tecido cardíaco para o CD40L. Interessantemente, estes camundongos não desenvolveram resistência insulínica, mesmo com hiperlipidemia espontânea moderada, quando comparados com os camundongos do grupo WT. Os camundongos do grupo HL apresentaram uma hiperlipidemia severa e um marcado decréscimo nos níveis plasmáticos de HDL associados a uma leucocitose e um aumento do número de plaquetas. Além disso, apresentaram pronunciadas alterações morfológicas na parede da aorta e processo inflamatório cardíaco, caracterizado pelo aumento na imunorreatividade cardíaca para o CD40L e resistência insulínica quando comparados com os camundongos do grupo S.

Estudos mostraram que a aterosclerose é uma doença inflamatória (LUSIS, 2000) e as principais hipóteses da aterogênese descritas nas últimas décadas são a do transporte reverso do colesterol (ZHANG *et al.*, 2003) e da oxidação da LDL (LUSIS, 2000; NAVAB *et al.*, 2004; BARTER *et al.*, 2003). Ambas as hipóteses apontam o papel central da LDL oxidada como iniciadora, e da HDL como protetador da aterogênese (NAVAB *et al.*, 2004; BARTER *et al.*, 2003). O aumento dos níveis plasmáticos da HDL nos camundongos do grupo S, observado em nosso estudo, assim como nos camundongos deficientes em apo E, podem estar desempenhando um papel protetor cardiovascular devido a sua ação antioxidante (NAVAB *et al.*, 2001, NAVAB *et al.*, 2004) e neutralizadora da atividade quimiotática de leucócitos,

atenuando a inflamação induzida pelo recrutamento dos leucócitos, especialmente monócitos e neutrófilos (BARBUIO *et al.*, 2007).

A inibição da oxidação da LDL pela HDL é comumente atribuída ao seu conteúdo antioxidante (BARTER *et al.*, 2004), relacionada às proteínas apoA-I e apoA-II que têm capacidades de removerem os hidroperóxidos de lipídeos da LDL (BARTER *et al.*, 2004; NAVAB *et al.*, 2004). Além disso, a molécula de HDL tem capacidade de destruir os hidroperóxidos de lipídeos que oxidam os fosfolipídeos da LDL, pela ação das enzimas paraoxonase-1 (MACKNESS *et al.*, 2004) e paraoxonase-3 (REDDY *et al.*, 2001), e também aumentar o efluxo do colesterol da parede arterial, além de apresentar atividade anti-inflamatória (ANTHONY, 2000). O papel anti-inflamatório e antioxidante da HDL em nossos estudos podem estar relacionados não só com a diminuição do estresse oxidativo (HOLVOET, 2008), mas também com a diminuição na produção de mediadores inflamatórios vasculares e da LDL oxidada (BARTER *et al.*, 2004). Isso reduz a disfunção endotelial e a aterogênese e, conseqüentemente, diminui a resposta imunológica nos camundongos do grupo S, colaborando para a redução da contagem total de leucócitos, diminuição do número de neutrófilos e de monócitos, observadas nesses animais. A HDL também inibe a expressão das moléculas de adesão na superfície das células endoteliais (VCAM-1, ICAM-1 e Selectina E) induzidas pelas citocinas pró-inflamatórias (BARTER *et al.*, 2004), o que diminui a transmigração dos monócitos para a região subendotelial. Esses efeitos explicam a prevenção na inflamação cardiovascular, caracterizada pela baixa expressão do CD40L na artéria coronária e no miocárdio, e a prevenção do desenvolvimento das alterações morfológicas da parede da aorta em situação de hiperlipidemia moderada, observada nos camundongos do grupo S. Assim, o determinante do menor estresse oxidativo arterial descrito por Krieger *et al.* (2006) e a maior resistência no desenvolvimento das lesões arteriais, descrita por Tian *et al.* (2006) nos camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta padrão (grupo S), pode ser o nível

plasmático do HDL aumentado, observado em nosso estudo, quando comparados com os camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica (grupo HL).

O aumento na expressão do CD40L no sistema cardiovascular dos camundongos do grupo HL, além de exercer efeito pró-inflamatório, também exerceu efeito pró-oxidante (URBICH *et al.*, 2002). Isso mostrou que a hiperlipidemia severa dos camundongos HL pode ser considerada o fator metabólico indutor do maior estresse oxidativo no sistema cardiovascular, aumentando a peroxidação lipídica da molécula de HDL e conseqüentemente sua remoção hepática (CHRISTISON *et al.*, 1996), com conseqüente diminuição dos níveis plasmáticos do HDL e da sua função cardiovascular protetora antioxidante e anti-inflamatória, favorecendo o processo inflamatório cardiovascular e a resistência insulínica nos camundongos do grupo HL.

A disfunção endotelial, implicada em inúmeras doenças cardiovasculares, inclui não somente a vasodilatação reduzida, mas também os estados pró-inflamatório e pró-trombótico (LIMA e COUTO, 2006), os quais, respectivamente, podem explicar os eventos de neovascularização e ativação plaquetária em modelos de hipercolesterolemia experimental (ARAÚJO *et al.*, 2005). A hipercolesterolemia, tanto induzida por dietas hipercolesterolêmicas quanto pela deficiência do receptor de LDL, associada à disfunção endotelial, inicialmente aumenta a permeabilidade à LDL e induz o surgimento de moléculas de adesão leucocitária (ICAM-1, VCAM-1, CD40 e selectina-E) na superfície endotelial (LUSIS, 2000). O transporte do LDL da corrente sanguínea para o espaço subendotelial é um processo passivo e ocorre de modo diretamente proporcional à sua concentração no sangue (LUSIS, 2004). Dessa maneira, o aumento nos níveis plasmáticos de LDL e a diminuição nos níveis plasmáticos de HDL nos camundongos do grupo HL, quando comparados com os do grupo S, possivelmente indicam insucesso na tentativa de diminuir o estresse oxidativo, visto que níveis elevados de LDL circulante proporcionam oxidação aumentada de LDL nos

tecidos. Essa oxidação (1) aumenta a expressão de moléculas de adesão e de proteínas quimiotáticas, como a proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) (BARTER *et al.*, 2004), provavelmente pela redução nos níveis de HDL, promovendo uma queda na biodisponibilidade do NO, o que aumenta a expressão das VCAM-1 na camada de células endoteliais através da indução da expressão NF- κ B (KEMPF e WOLLERT, 2004) e recruta fagócitos mononucleares (ZHANG *et al.*, 2006); e (2) estimula a secreção de fatores estimuladores, como fator estimulador de colônia monocitária (MCS-F) (BERLINER *et al.*, 1990). Isso aumenta a migração e a diferenciação de monócitos em macrófagos, com consequente elevação da contagem total de leucócitos e do número de neutrófilos nos camundongos do grupo HL quando comparados com o grupo S, uma vez que a LDL levemente oxidada induz maior adesão de monócitos, mas não de neutrófilos, às células endoteliais (BERLINER *et al.*, 1990).

Neste estudo observamos que os camundongos do grupo S, mesmo apresentando uma hiperlipidemia moderada associada ao aumento dos níveis plasmáticos de HDL, não apresentaram diferenças significativas quanto à contagem do número de plaquetas quando comparados com o grupo WT. Entretanto, os camundongos do grupo HL apresentaram um marcado decréscimo nos níveis plasmáticos da fração HDL associado com aumento na contagem do número de plaquetas quando comparados com o grupo S, demonstrando importante influência da HDL na modulação da atividade plaquetária. A HDL pode estar inibindo a ativação plaquetária nos camundongos do grupo S por (1) indução da síntese de óxido nítrico (NO) pela apoE presente nessas lipoproteínas (RIDDELL *et al.*, 1999) ou aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico; e (2) ativação da proteinoquinase C (KOLLER, KOLLER e BINDER, 1989). O aumento na contagem do número de plaquetas nos camundongos do grupo HL pode estar relacionado com a diminuição de HDL, que é

preditor independente da formação aguda de trombo dependente da ativação plaquetária (CUCHELL e RADER, 2002).

A insulina induz a fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (IRS-1), enquanto agentes que provocam a resistência insulínica, tais como $TNF\alpha$, ácidos graxos livres, estresse oxidativo e a inflamação induzem a ativação de quinases de serina/treonina que fosforilam o IRS-1 em serina, inibindo sua função (SYKIOTIS e PAPAVALASSILOU, 2001). A resistência insulínica associada à hiperinsulinemia não foi observada nos camundongos do grupo S, mostrando que o efeito antioxidante /anti-inflamatório do HDL nestes animais pode estar prevenindo a oxidação dos substratos do receptor da insulina. Muitos estudos “*in vitro*” e em modelos animais demonstraram que várias citocinas pró-inflamatórias (HOTAMISLIGIL, SHARGILL e SPIEGELMAN, 1993) estão envolvidas na patogênese da resistência insulínica, e muitas estratégias anti-inflamatórias demonstraram melhorar a sensibilidade à insulina (BARBUJO *et al.*, 2007).

Estudos indicaram que os camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica desenvolveram extensa área de lesão aterosclerótica na aorta (KRIEGER *et al.*, 2006), hipertrofia ventricular esquerda (GARCIA *et al.*, 2008), lesões neointimais e remodelamento arterial na artéria coronária (TIAN *et al.*, 2006) associadas ao aumento do estresse oxidativo.

No presente estudo, observamos que os camundongos do grupo HL tornaram-se mais susceptíveis às lesões na parede da aorta, como descrito por Tian *et al.*(2006). Além disso, apresentaram processo inflamatório cardíaco, hiperinsulinemia e resistência insulínica. Estas alterações morfometabólicas observadas estão associadas ao marcado aumento dos níveis plasmáticos do LDL e ao decréscimo drástico dos níveis de HDL. A hiperlipidemia severa induziu ao estresse oxidativo no miocárdio (GARCIA *et al.*, 2008), nas artérias (KRIEGER *et al.*, 2006), por mecanismos que aumentaram a produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) ou que diminuíram os fatores antioxidantes endógenos.

O acompanhamento dos níveis plasmáticos do HDL em pacientes dislipidêmicos associados com as variações leucocitárias deve ser rigoroso, pois qualquer fator que possa diminuir os níveis plasmáticos do HDL pode induzir o processo inflamatório, oxidante cardiovascular e o desenvolvimento da resistência insulínica.

8 CONCLUSÃO

Diante do trabalho exposto conclui-se que:

- O nível plasmático elevado de HDL nos camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta padrão (grupo S) mostrou ser o fator protetor contra o desenvolvimento de processos inflamatórios cardiovasculares e resistência insulínica, impedindo o desenvolvimento das lesões neointimais.
- Existe uma associação negativa entre os níveis plasmáticos de HDL e as contagens total e diferencial de leucócitos e plaquetas nesses camundongos.
- Foi demonstrada uma importante influência da HDL na modulação da resposta imunológica e inflamatória em camundongos dislipidêmicos.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A.M. *et al.* Determination of the insulin resistance index by the homeostasis model assessment in a population of Metropolitan Region in Chile. *Rev Med Chil*, v. 130, n. 11, p. 1227-1231, 2002.
- ALDERSON M.R. *et al.* CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med*, v. 178, p. 669-674, 1993.
- ALDHAHI,W.; HAMDY,O. Adipokines, inflammation, and endothelium in diabetes. *Curr Diab Rep*, n. 3, p. 293-298, 2003.
- ALENZI, M.Y.; MARCIL, M.; GENEST, J. High-density lipoproteins: target for cardiovascular disease prevention. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, v. 1, p. 159-164, 2004.
- ALVAREZ-LEITE, J.I.; PELUZIO, M.C.G. Lípidos. In: NETO, F. (Ed.). *Nutrição Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.7-19, 2003.
- ANDERSON, R.A. *et al.* The relationships between post-prandial lipaemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, p. 475-483, 2001.
- ANTHONY, M.S. Soy and cardiovascular disease: cholesterol lowering and beyond. *J. Nutr.*, v. 130, n. 3, p. 662S-663S, 2000.
- ARAÚJO, R.G. *et al.* Dislipidemia, inflamação e aterosclerose. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*, v. 6, p. 473-481, 2005.
- ARMANT, M. *et al.* Soluble CD23 directly activates monocytes to contribute to the antigen-independent stimulation of resting T cells. *J Ummuno*, v..155, p.4868-75, 1995.
- ARMSTRONG, A.T *et al.* Quantitative investigation of cardiomyocyte hypertrophy and myocardial fibrosis over 6 years after cardiac transplantation. *J. Am Coll. Cardiol*, n.32, p. 704-710, 1998.
- ASSMANN, G.; GOTTO, A.M., J.R. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation*, v. 109, p. III8-III14, 2004.
- BAIN, B.J. Hypereosinophilia. *Curr Opin Hematol*, v. 7, p. 21-25, 2000.
- BARBUIO, R.*et al.* Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet. *J. Endocrinol*, v. 194, p. 539-550, 2007.
- BARTER, P. *et al.* High-density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis: the unanswered questions. *Atherosclerosis*. v. 168, n. 2, p. 195-211, 2004.

- BARZILAV, J.I. *et al.* Cardiovascular disease in older adults with glucose disorders: comparisons of American Diabetes Association of diabetes mellitus with WHO criteria. *Lancet*, v. 354, p. 622-625, 1999.
- BERGMAN, R.N. *et al.* Minimal model-based insulin sensitivity has greater heritability and a different genetic basis than homeostasis model assessment or fasting insulin. *Diabetes*, v. 52, n. 8, p. 2168-2174, 2003.
- BERGMAN, R.N. *et al.* Quantitative estimation of insulin sensitivity. *Am J Physiol*, v. 236, p. E667-E677, 1979.
- BERLINER, J. A *et al.* Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest*, v. 85, p. 1260-1266, 1990.
- BONETTI, P.O.; LERMAN, L.O.; LERMAN, A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, n. 23, p.168-175, 2003.
- BONORA, E. *et al.* Population-based incidence rates and risk factors for type 2 diabetes in white individuals: the Bruneck Study. *Diabetes*, v. 53, n. 7, p. 1782-1789, 2004.
- BORGES, L.; SIQUEIRA, L.O. Validação de tecnologia 5 diff do analisador hematológico Sysmex XS-1000i para laboratório de pequeno/médio porte. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 24, p. 247-251, 2009.
- BRAVATA, D.M. *et al.* Two measures of insulin sensitivity provided similar information in US population. *J Clin Epidemiol*, v. 57, n. 11, p. 1214-1217, 2004.
- BRECHTEL, K. *et al.* Fast elevation of the intramyocellular lipid content in the presence of circulating free fatty acids and hyperinsulinemia: a dynamic ¹H-MRS study. *Magn Reson Med*, n.45, p.179-183, 2001.
- BRESLOW, J.L. Mouse models of atherosclerosis. *Science*, v. 272, p. 685-688, 1996.
- CABALLERO, A.E. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obesity Res*, n. 11, p. 1278-1289, 2003.
- CALARA, F. *et al.* Spontaneous plaque rupture and secondary thrombosis in apolipoprotein E-deficient and LDL receptor-deficient mice. *J Pathol*, v. 195, p.257-263, 2001.
- CANALES, A.; SANCHEZ-MUNIZ, F.J. Paraoxonase, something more than an enzyme. *Med Clin (barc)*, v. 12, n. 14, p. 537-548, 2003.
- CHISOLM, G.M.; STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med*, v.28, n.12, p. 1815-1826, 2000.
- CHRISTISON, J. *et al.* Rapid reduction and removal of HDL- but not LDL- associated cholesteryl ester hydroperoxides by rat liver perfused in situ. *Biochem .* v.314, p. 739-742, 1996.

- CLINE, M.J. *et al.* Monocytes and macrophages: functions and diseases. *Ann Intern Med*, v. 88, p. 78-88, 1978.
- COCKS, B.G. *et al.* IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand. *Int Immunol*, v. 5, 657-663, 1993.
- COUTINHO, M. *et al.* The relationship between glucose and incident cardiovascular events. *Diabetes Care*, v. 22, p. 233-240, 1999.
- CUCHEL, M.; RADER, D.J. The role of high-density lipoproteins in thrombosis. *Scientific Worldjournal*, v.12, n. 2, p. 89-95, 2002.
- CULIC, O.; DECKING, U.K.; SCHRADER, J. Metabolic adaptation of endothelial cells to substrate deprivation. *Am J Physiol*, n. 276, p. 1061-1068, 1999.
- CYBULSKY, M. I. *et al.* A major role for VCAM-I, but not ICAM-I, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*, v. 107, n.10, p. 1255-1262, 2001.
- DANDONA, P. *et al.* Endothelial dysfunction, inflammation and diabetes. *Rev Endocr Metab Dis*, n. 5, p.189-197, 2004.
- DASH, R. *et al.* Differential regulation of p38 mitogen-activated protein kinase mediates gender-dependent catecholamine-induced hypertrophy. *Cardiovasc Res*, v.57, p. 704-714, 2003.
- DE FRONZO, R.A. *et al.* Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin resistance. *Am J Physiol*, v. 237, p. E214-E223, 1979.
- DESCAT, F. Hematologie du rat: hemogramme et myelogramme. 2002 105f. Tese (Doutorado) – Ecole Nationale Veterinaire, Toulouse, France, 2002.
- DURIE, F.H. *et al.* The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. *Immunol Today*, v.15, p.406-411, 1994.
- DURRINGTON, P.N. *et al.* Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 21, n.4, p 473-480, 2001.
- DRABKIN, D. L.; AUSTIN, J. H. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulphemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 112, p.51-65, 1935.
- ECKARDSTEIN, A.V.; NOFER, J.R.; ASSMANN, G. High density lipoproteins and arteriosclerosis: role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v.21, p. 13-27, 2001.
- EISERICH, J.P.; PATEL, R.P.; O'DONNELL, V.B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reaction and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med*, v. 19, p.221-357, 1998.
- ETZIONI, A.; DOERSCHUK, C.M.; HARLAN, J.M. Of man and mouse: leukocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies. *Blood*, v. 94, p.3281-3288, 1999.

FAILACE, R. *Hemograma: manual de interpretação*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

FAILACE, R.; PRANKE, P. Avaliação dos critérios de liberação direta dos resultados de hemogramas através de contadores eletrônicos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 26, n.3, p.159-166, 2004.

FAZIO, S.; LINTON, M.F. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Front. Biosci*, v.6, p. D515-D525, 2001.

FERNÁNDEZ-REAL, J.M.; RICART, W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev*, n. 24, p. 278-301, 2003.

FERRANNINI, E. *et al.* Insulin resistance, hyperinsulinemia, and blood pressure: role of age and obesity. *Hypertension*, v. 30, p. 1144-1149, 1997.

FERRARA, C.M. *et al.* Limited value of the homeostasis model assessment to predict insulin resistance in older men with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care*, v. 24, n.2, p. 249-249, 2001.

FREDENRICH, A.; BAYER, P. Reverse cholesterol transport, high-density lipoproteins and HDL cholesterol: recent data. *Diabetes Metab*, v. 29, n.3, p. 201-205, 2003.

FREDERSDORF, S. *et al.* Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Patho*, v.13, p. 11-19, 2004.

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

FUKUSHIMA, M. *et al.* Insulin secretion and insulin sensitivity at different stages of glucose tolerance: a cross-sectional study of Japanese type 2 diabetes. *Metabolism*, v. 53, n. 7, p. 831-835, 2004.

GARCIA, J.A. *et al.* S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) prevents myocardial alterations in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice by antiinflammatory action. *J Cardiovasc Pharmacol (Journal of cardiovascular pharmacology)*, v. 51, p. 78-85, 2008.

GELBMANN, C.M. *et al.* CD40 expression mediates NFkappaB activation and cytokine secretion in human colonic fibroblasts. *Gut*, v.52, n.10, p. 1448-1456, 2003.

GENEST, J. Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. *J. Inherit. Metab. Dis.*, n.26, p.267-287, 2003.

GOKCEL, A. *et al.* Detection of insulin resistance in Turkish adults: a hospital-based study. *Diabetes Obes Metab*, v. 5, n. 2, p. 126-130, 2003.

HAFFNER, S.M. *et al.* A prospective analysis of the HOMA model. The Mexico City Diabetes Study. *Diabetes Care*, v. 19, n. 10, p. 1138-1141, 1996.

- HOLLENBAUGH, D. *et al.* The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. *Embo J*, v. 11, p. 4313-4321, 1992.
- HOLMAN, R.R. *et al.* The basal plasma glucose: a single relevant index of maturity onset diabetes. *Clin Endocrinol*, v. 14, p. 279-286, 1980.
- HOLVOET, P. Relations between metabolic syndrome, oxidative stress and inflammation and cardiovascular disease. *Verh K Acad Geneesk Belg*, v. 70, n. 3, p. 193 – 219, 2008.
- HOOG, N. *et al.* Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. *FEBS Lett*, v. 334, p.170-174, 1993.
- HOSKER, J.P. *et al.* Continuous infusion of glucose with model assessment: measurement of insulin resistance and beta-cell function in man. *Diabetologia*, v. 28, p. 401-411, 1985.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N.S.; SPIEGELMAN, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, v. 259, p. 87-91, 1993.
- HSUEH, W.A.; LYON, C.J.; QUIÑONES, M.J. Insulin resistance and the endothelium. *Am J Med*, n. 117, p. 109-117, 2004.
- HSUEH, W.A.; QUIÑONES, M.J. Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. *Am J Cardiol*, n. 92, p.10J-7J, 2003.
- HUANG, J.M. *et al.* Mechanism of high-density lipoprotein subfractions inhibiting copper-catalyzed oxidation of low-density lipoprotein. *Clin Biochem*, v.31, n.7, p.537-543, 1998.
- HUNTER, J.J.; CHIEN, K.R. Signaling Pathways for Cardiac Hypertrophy and Failure. *N Engl J Med*, v. 341, p. 1276–1283, 1999.
- HUUSKONEN, J. *et al.* The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis*, v.155, n.2, p. 269-281, 2001.
- INSEL, P.A. *et al.* Insulin control of glucose metabolism in man: a new kinetic analysis. *J Clin Invest*, v. 55, p. 1057-1066, 1975.
- ISHIBASHI, S. *et al.* Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J. Clin. Invest.*, v.93, p. 1885-1893, 1994.
- IZUMO, S.; SADOSHIMA, J. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol*, v. 59, p. 551–571, 1997.
- JAIN, N.C. *Essentials of veterinary hematology*. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
- JAYAGOPAL, V. *et al.* Biological variations of homeostasis model assessment-derived insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, v. 25, n. 11, p. 2022-2025, 2002.

- JEON, H.; BLACKLOW, S.C. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu. Rev. Biochem.* v. 74, p. 535-562, 2005.
- JOHNSON, J.L.; JACKSON, C.L. Atherosclerotic plaque rupture in the apolipoprotein E knockout mouse. *Atherosclerosis*, v. 154, p.399-406, 2001.
- JUNQUEIRA, L.C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Picrosirius red staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.*, v.11, p. 447-455, 1979.
- KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*, n. 26, p.439-451, 2005.
- KANNEL, W.B. Prevalence and natural history of electrocardiographic left ventricular hypertrophy. *Am J Med*, v. 3, p. 4-11, 1983.
- KARMANN, K. *et al.* CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci*, v. 92, 4342-4346, 1995.
- KATO, T. *et al.* Induction of IL-12 p40 messenger RNA expression and IL-12 production of macrophages via CD40-CD40 ligand interaction. *J Immunol*, v.156, p.3932-38, 1996.
- KATZ, A. *et al.* Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 85, p. 2402-2410, 2000.
- KEMPF, T.; WOLLERT, K.C. Nitric oxide and the enigma of cardiac hypertrophy. *Bioessays*, v.6, p.608-615, 2004.
- KIENER, P.A. *et al.* Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J Exp Med*, v. 155, p.4917-4925, 1995.
- KOLLER, E; KOLLER, F; BINDER, B.R. Purification and identification of the lipoprotein binding proteins from human blood platelet membrane. *J. Biol Chem*, v. 21, n. 264, p. 124-128, 1989.
- KRIEGER, M.H. *et al.* Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide*. v.14, p. 12-20, 2006.
- KUWANA, B. *et al.* Reference value and cut-off value for diagnosis of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Rinsho Byori*, v. 50, n. 4, p. 398-403, 2002.
- LANG, D. *et al.* Coronary microvascular endothelial cell redox state in left ventricular hypertrophy: the role of angiotensin II. *Circ Res*, v. 86, p. 463-469, 2000.
- LEBLANC, J. *et al.* Daily variations of plasma glucose and insulin in physically trained and sedentary subjects. *Metabolism*, v. 32, p. 552-557, 1983.
- LEBOEUF, R.C. *et al.* Genetic control of lipid transport in mice. I: structural properties and polymorphism of plasma lipoproteins. *J Biol Chem*, v. 258, p. 5063-5070, 1983.

- LEE, T.M. *et al.* Effect of simvastatin on left ventricular mass in hypercholesterolemic rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* v.288, p. H1352–H1358, 2005.
- LEITE, L.A.C. *et al.* Comparação entre a contagem de plaquetas pelos métodos manual e automatizado. *NewsLab*, v. 81, p. 106-114, 2007.
- LIMA, E.S.; COUTO, R.D. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. *J Bras Patol Med Lab*, v. 42, n. 3, p. 169-178, 2006.
- LIPSKY, P.E. *et al.* Analysis of CD40-CD40 ligand interactions in the regulation of human B cell function. *Ann N Y Acad Sci*, v. 815, p.372-383, 1997.
- LORELL, B.H.; CARABELLO, B.A. Left Ventricular Hypertrophy: Pathogenesis, Detection, and Prognosis. *Circulation*, v. 102, p. 470–479, 2000.
- LULIANO, L. The oxidant stress hypothesis of atherogenesis. *Lipids*, v. 36, p.41-44, 2001.
- LUND-KATZ, S. *et al.* High density lipoprotein structure. *Front Biosci*, v.8, p. 1044-1054, 2003.
- LUSIS, A.J. Atherosclerosis. *Nature*, v. 407, n.6801, p.233-241, 2000.
- LUSIS, A.J.; MAR, R.; PAJUKANTA, P. Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, v. 5, p.189-218, 2004.
- LUSIS, A.J. *et al.* Genetic control of lipid transport in mice. II: genes controlling structure of high density lipoproteins. *J Biol Chem*, v. 258, p. 5071-5078, 1983.
- MACH, F. *et al.* Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature*, v. 394, p.200-203, 1998.
- MACH, F. *et al.* Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci*, v. 94, p. 1931-1936, 1997.
- MACKELLY, S. *Estudo comparativo de métodos de contagem de reticulócitos para controle de qualidade.* 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2009.
- MACKNESS, B. *et al.* Paraonase-1 inhibits oxidized LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* v. 318, p. 680-683, 2004.
- MACKNESS, M.I. *et al.* Low serum paraonase: a risk factor for atherosclerotic disease. *Chem Biol Interact*, v. 119-120, p. 389-397, 1999.
- MATANA, S.R. *et al.* Avaliação da contagem automatizada de plaquetas como um dos critérios de qualidade de hemocomponentes em banco de sangue. *Informativo científico da Roche diagnóstica*, São Paulo, v. 1, n. 5, 2008.

- MATSUDA, M. *et al.* Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing. *Diabetes Care*, v. 22, n. 9, p. 1462-1470, 1999.
- MATTHEWS, D.R. *et al.* Control of pulsatile insulin secretion in man. *Diabetologia*, v. 24, p. 231-237, 1983.
- MATTHEWS, D.R. *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, v. 28, p. 412-419, 1985.
- MCCARTY, M.F. Does postprandial storage of triglycerides in endothelial cells contribute to the endothelial dysfunction associated with insulin resistance and fatty diets? *Med Hypotheses*, n. 61, p. 167-172, 2003.
- MCDYER, J.F. *et al.* CD40 ligand/CD40 stimulation regulates the production of IFN-gamma from human peripheral blood mononuclear cells in an IL-12- and/or CD28-dependent manner. *J Immunol*, v. 160, p. 1701-1707, 1998.
- MINEO, C. *et al.* High-density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP Kinases. *J Biol Chem*, v.278, n. 11, p. 9142-9149, 2003.
- MONTANI, J.P. *et al.* Pathways from obesity to hypertension: from the perspective of a vicious triagle. *Int J Obesity*, n. 26, p. s28-s38, 2002.
- MORESCO, R.N. *et al.* Análise comparativa das técnicas manual e automatizada (ADVIA tm 120) para contagem de reticulócitos. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 35, n. 1, p.17-18, 2003.
- NAKAGAMI, H. *et al.* NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, v. 7, p.851-859, 2003.
- NAOUM, P.C. *Academia de ciência e tecnologia*. Disponível em: <http://www.cienciasnews.com.br/cien-news/inter-lab-hemo.htm>. > . Acesso em: 10 de out. 2009.
- NAVAB, M. *et al.* The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res*, v. 45, p. 993-1007, 2004.
- NAVAB, M. *et al.* A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipidis. *J. Lipid Res*, v. 42, p. 1308-1317, 2001.
- NETO, A.A. *et al.* Monocitose é um marcador de risco independente para a doença arterial coronariana. *Revista Brasileira de Cardiologia*, v. 86, n. 3, 2006.
- NEUFELD, M. *et al.* High-density lipoproteins inhibit fibrinogen binding on adenosine diphosphate-activated monocytes. *Blood Coagul Fibrinolysis*, v.11, n. 6, p. 505-509, 2000.
- NIAN, M. *et al.* Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res*, v. 94, p.1543-1553, 2004.

NOFER, J.R. *et al.* HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*, v. 161, n. 1, p. 1-16, 2002.

OLEFSKY, J. *et al.* Relationship between fasting plasma insulin level and resistance to insulin mediated glucose uptake in normal and diabetic subjects. *Diabetes*, v. 22, p. 507-513, 1973.

OLIVEIRA, R.A.G. *Hematologia: Como fazer e interpretar.* São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2007.

ORAM, J.F. ATP-binding cassette transporter A I and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol*, v.13, n. 4, p. 373-381, 2002.

ORIO, JR.F. *et al.* Improvement in endothelial structure and function after metformin treatment in young normal-weight women with polycystic ovary syndrome: results of a 6-month study. *J Clin Endocrinol Metab*, n. 90, p. 6072-6076, 2005.

PAIGEN, B. *et al.* Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*, n. 68, p. 231-240, 1987.

PERUGINI, C. *et al.* Distribution of lipid-soluble antioxidants in lipoproteins from healthy subjects. I Correlation with plasma antioxidant levels and composition of lipoproteins. *Pharmacol Res*, v.41, n.1, p 55-65, 2000.

RADER, D.J.; WILSON, J.M. Gene therapy for lipid disorders. In: HARBER, E. (Ed.). *Molecular cardiovascular medicine.* New York: Scientific american, p. 97-114, 1995.

RAMET, M. E. *et al.* High-density lipoprotein increases the abundance of eNOS protein in human vascular endothelial cells by increasing its half-life. *J Am Coll Cardiol*, v.41, n.12, p. 2288-2297, 2003.

REDDY, S.T.*et al.* Human paraoxonase-3 is an HDL- associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* v. 21, p. 542-547, 2001.

REUL, R.M. *et al.* CD40 and CD40 ligand (CD154) are coexpressed on microvessels in vivo in human cardiac allograft rejection. *Transplantation*, v. 64, p. 1765-1774, 1997.

RIDDELL, D.R. *et al.* Identification and characterization of LRP8 (apoER2) in human blood platelets. *J Lipid Res.* v.10, n. 40, p.1925-1930, 1999.

ROSENFELD, M.E. *et al.* Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the apoE knockout mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 20, p. 2587-2592, 2000.

ROSS, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, v. 340, p. 115-26, 1999.

SACKS, D.B. *et al.* Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem*, v.48, p. 436-472, 2002.

SANGUIGNI, V. *et al.* CD40 ligand enhances monocyte tissue factor expression and thrombin generation via oxidative stress in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*, v. 45, p.35-42, 2005.

SCARTEZINI, M. *et al.* Metabolismo de Lípidos e lipoproteínas. In: MARTINEZ, T.L.R. (Ed.). *Conduas clínicas nas discilipedimas*. Belo Horizonte: Health, p. 25-40p, 1997.

SCHÖNBECK, U. *et al.* Ligation of CD40 activates interleukin 1beta-converting enzyme (caspase-1) activity in vascular smooth muscle and endothelial cells and promotes elaboration of active interleukin 1beta. *J Biol Chem*, v. 272, p. 19569-19574, 1997.

SHIRANI, J. *et al.* Morphology and significance of the left ventricular collagen network in young patients with hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *J Am Coll Card*, v.35, p. 36-44, 2002.

SMITHIES, O.; MAEDA, N. Gene targeting approaches to complex genetic diseases: atherosclerosis and essential hypertension. *Proc Natl Acad Sci* , n. 92, p. 5266-5272, 1995.

SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y. *Interpretação laboratorial do leucograma*. São Paulo: Robe Editorial, 2003.

SPIEKER, L.E. *et al.* High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation*, v. 105, n. 12, p. 1399-1402, 2002.

STARY, H.C. *et al.* A definition of initial , fatty streak, and intermediate lesion of atherosclerosis. *Circulation*, v. 89, p. 2462-2478, 1994.

STEFFENS, S.; MACH, F. Inflammation and atherosclerosis. *Herz*, v. 29, p. 741-748, 2004.

SUNDSTRÖM, J. *et al.* Dyslipidemia and an Unfavorable Fatty Acid Profile Predict Left Ventricular Hypertrophy 20 Years Later. *Circulation*, v. 103, p. 836-841, 2001.

SUSSMAN, A.; MCCULLOCH, A.; BORG, T.K. Dance band on the Titanic: Biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. *Circ Res*, v. 91, p. 888-898, 2002.

SWENSON, M.J. Propriedades fisiológicas e constituintes celulares e químicos do sangue. In: _____. *Fisiologia dos animais domésticos*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

SYKIOTIS, G.P.; PAPAVALASSILIOU, A.G. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1: a novel target for the reversal of insulin resistance. *Mol Endocrinol*. v. 15, p. 1864-1869, 2001.

TANIGUCHI, A. *et al.* The role of de body mass index and triglyceride levels in identifying insulin-sensitive and insulin-resistant variants in Japanese. *Metabolism*, v. 49, n. 8, p. 1001-1005, 2000.

TIAN, J. *et al.* Hyperlipidemia is a major determinant of neointimal formation in LDL receptor-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. v. 345, n. 3, p. 1004-1009, 2006.

TORRENS, J.I. *et al.* Ethnic differences in insulin sensitivity and beta-cell function in premenopausal or early perimenopausal women without diabetes. The Study of Womens Health Across the Nation (SWAN). *Diabetes Care*, v. 27, n. 2, p. 354-361, 2004.

TRACY, R.P. Thrombin, inflammation, and cardiovascular disease: an epidemiologic perspective. *Chest*, v. 124, p. 49-57, 2003.

TRINDER, R. Determination of glucose in blood using glucose with alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem*, n. 6, p. 27-28, 1969.

TUAN, C.Y. *et al.* Usefulness of plasma glucose and insulin concentrations in identifying patients with insulin resistance. *Am J Cardiol*, v. 92, n. 5, p. 606-610, 2003.

URBICH, C. *et al.* CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation*, v. 106, p. 981-986, 2002.

VELLAICHAMY, E.; SOMMANA, N.K.; PANDEY, K.N. Reduced cGMP signaling activates NF-kappaB in hypertrophied hearts of mice lacking natriuretic peptide receptor-A. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 327, n.1, p. 106-111, 2005.

VESSELINOVITCH, D.; WISSLER, R.W. Experimental production of atherosclerosis in mice. 2: effects of atherogenic and high-fat diets on vascular changes in chronically and acutely irradiated mice. *J Atheroscler Res*, v. 8, p. 497-523, 1968.

WALLACE, T.M. *et al.* Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care*, v. 27, n. 6, p. 1487-1495, 2004.

WARNICK, G.R.; NAUCK, M.; RIFAI, N. Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol: from ultracentrifugation to homogeneous assays. *Clin Chem*, v. 47, p. 1579-1596, 2001.

WINKELSTEIN, J.A.; MARINO, M.C.; JUNIOR JOHNSTON, R.B. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine*, v. 79, p. 155-169, 2000.

WOLLERT, K.C.; DREXLER, H. Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis. *Heart Fail Rev*, v. 7, p. 317-325, 2002.

YELLIN, M.J. *et al.* Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals. *J Exp Med*, v. 182, p. 1857-1864, 1995.

YOUNG, C.E. *et al.* High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease. *Cardiol Rev*, v. 12, n.2, p.107-119, 2004.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. *Hematologia: fundamentos e prática*. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

ZHANG, W.Z. *et al.* Adverse Effects of Cigarette Smoke on NO Bioavailability. Role of Arginine Metabolism and Oxidative Stress. *Hypertension*, 2006.

ZHANG, Y. *et al.* Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation*, v. 108, p. 661-663, 2003.