



ARTIGO ORIGINAL

Efeito anti-inflamatório da lipoproteína de alta densidade no sistema cardiovascular de camundongos hiperlipidêmicos

José Antonio D. Garcia^{a,*}, Ciderléia Castro de Lima^a, Luiza B. Messoria^a, Aline F. Cruz^b, Ana P.S. Marques^b, Talita P. Simão^b, Evelise Aline Soares^a, M. Cristina Costa Resck^a, Erika K. Incerpi^c, Nelma de Mello Oliveira^a, Leandro dos Santos^a

^aNúcleo de pesquisa em farmacologia e cirurgia experimental da Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Alfenas, Brasil

^bGraduadas do curso de Enfermagem, UNIFENAS, Alfenas, Brasil

^cMédica Veterinária responsável pelo Biotério da Universidade Federal de Alfenas, Unifal, Alfenas, Brasil

Recebido a 31 de dezembro de 2010; aceite a 29 de março de 2011

PALAVRAS-CHAVE

HDL;
Inflamação;
Hiperinsulinemia;
Sistema cardiovascular;
Dislipidemia

Resumo

Fundamento: Camundongos *knockout* para o gene do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr^{-/-}) são hiperlipidêmicos espontâneos e resistentes ao desenvolvimento de lesões neointimais.

Objetivos: O presente estudo teve como objetivo determinar o fator que previne o processo inflamatório, as lesões neointimais cardiovasculares e a resistência insulínica nos camundongos LDLr^{-/-}.

Material e métodos: Utilizaram-se três grupos experimentais de camundongos machos com três 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 análise plasmática dos lipídeos, glicose e insulina. O índice de Homa foi calculado para determinar a resistência à insulina. O coração e aorta foram removidos e processados histologicamente. Cortes histológicos do coração foram processados imunohistoquimicamente com anticorpo anti-CD40L para avaliar a presença de processo inflamatório. Cortes histológicos das artérias foram corados com hematoxilina/eosina e picrosírius red para avaliar alterações morfológicas e morfométricas.

Resultados: 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 grave, 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. Esta hiperlipidemia grave dos camundongos HL pode ser considerada o fator metabólico indutor

*Autor para correspondência.

Correio eletrônico: jadgarcia@uol.com.br (J.A.D. Garcia).

do maior estresse oxidativo no sistema cardiovascular, aumentando a peroxidação lipídica da molécula de HDL e consequentemente sua remoção hepática, com consequente diminuição dos níveis plasmáticos do HDL.

Conclusão: 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.

© 2010 Sociedade Portuguesa de Cardiologia. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos os direitos reservados.

KEYWORDS

HDL;
Inflammation;
Hyperinsulinemia;
Cardiovascular
system;
Dyslipidemia

Anti-inflammatory effect of high-density lipoprotein on the cardiovascular system of hyperlipidemic mice

Abstract

Introduction: LDLr-/- mice are spontaneously hyperlipidemic and resistant to the development of neointimal lesions.

Objectives: This study aimed to determine the factor that prevents the inflammatory process and neointimal lesions and insulin resistance in LDLr-/- mice.

Methods: Three groups of 3-month-old male mice were used: wild-type mice (WT group); LDLr-/- mice fed a standard diet (S group); and LDLr-/- mice fed a high-fat diet (HF group). After 15 days, blood was collected for analysis of plasma lipids, glucose and insulin. The HOMA index was calculated to determine insulin resistance. The heart and aorta were removed for histological study. Histological sections of the heart were processed immunohistochemically with anti-CD40L antibodies to evaluate the inflammatory process. Histological sections of the aorta were stained with hematoxylin/eosin and picosirius red to assess morphological and morphometric alterations.

Results: The S mice were resistant to the inflammatory process, as shown by low immunoreactivity to CD40L, with high plasma HDL levels, and did not develop insulin resistance, even with moderate hyperlipidemia compared to WT. The HF mice showed severe hyperlipidemia, increased cardiac immunoreactivity to CD40L, pronounced morphological changes in the aortic wall and insulin resistance, associated with a decrease in plasma HDL levels, compared to S. This severe hyperlipidemia in the HF mice can be considered the major metabolic factor inducing oxidative stress in the cardiovascular system, increasing the lipid peroxidation of HDL and hence its removal by the liver, with consequent lowering of plasma HDL levels.

Conclusion: High HDL plasma levels are a protective factor against the development of cardiovascular inflammation and insulin resistance in LDLr-/- mice, preventing the development of neointimal lesions.

© 2010 Sociedade Portuguesa de Cardiologia. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introdução

A relação entre distúrbios metabólicos e doenças cardiovasculares tem sido firmemente estabelecida. Dentre estas patologias, destacam-se a aterosclerose, hipertensão arterial, hiperlipidemia¹ associadas à baixa concentração plasmática da lipoproteína de alta densidade (HDL), aumento da concentração da lipoproteína de baixa densidade (LDL), disfunção endotelial² e diabetes³, as quais apresentaram como denominador comum o processo inflamatório e a resistência insulínica. O papel do receptor CD40 e seu ligante CD40L como sinalizadores inflamatórios envolvidos na hipertrofia cardíaca⁴ e aterosclerose⁵ é evidente em diferentes estágios. A CD40L é uma proteína transmembrana que exerce um efeito pró-oxidante. A sua interacção com seu receptor CD40 induz a resposta inflamatória, favorecendo o síndrome coronariana aguda⁶, a ativação da via NFkappa β e a fosforilação do IKK (inibidor Kappa β quinase), ativando genes envolvidos na inflamação e na hipertrofia cardíaca⁸.

Estudos mostraram que os processos inflamatórios⁹ induziram a resistência insulínica. O papel exercido pela resistência à insulina está associado à hiperinsulinemia compensatória. Na tentativa de ultrapassar a inibição da via de sinalização insulínica, a hiperinsulinemia pode continuar a estimular a via de sinalização mitogênica da insulina, exercendo seus efeitos indesejados na biologia cardiovascular¹⁰.

O risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares está diretamente relacionado com os níveis plasmáticos de LDL colesterol e inversamente associado com a concentração de HDL colesterol¹¹. Recentemente, pesquisas com camundongos deficientes para o receptor de LDL (LDLr-/-) mostraram que esses animais desenvolveram hiperlipidemia espontânea moderada, porém, são resistentes ao desenvolvimento de lesões neointimais na artéria carótida¹² e menor stress oxidativo arterial¹³, quando alimentados com dieta padrão para roedores. Entretanto, quando alimentados com dieta hiperlipídica, tornaram-se susceptíveis às lesões neointimais¹² e apresentaram maior stress oxidativo arterial,

com desenvolvimento da placa de aterosclerose¹³. No presente estudo procuramos mostrar o fator que previne o processo inflamatório, as lesões neointimais no sistema cardiovascular e a resistência insulínica nos camundongos LDLr-/- alimentados com dieta padrão para roedores.

Material e métodos

Protocolo animal

Os experimentos foram realizados em camundongos selvagens (cepa C57BL6) e em camundongos homocigotos para a ausência do gene do receptor de LDL (LDLr-/-) gerados no *background* C57BL6, machos com três meses de idade, pesando 22 ± 3 g. Os animais foram adquiridos no Laboratório Jackson – Estados Unidos da América – e criados no biotério da Universidade de Alfenas (Alfenas, MG, Brasil), com controle de temperatura e ciclo claro/escuro (12 h). Os camundongos foram divididos em três grupos experimentais: Grupo WT (n = 6), camundongos selvagens, os quais receberam ração padrão para roedores (Nuvital®); Grupo S (n = 6), camundongos LDLr-/- que receberam ração padrão para roedores (Nuvital®); Grupo HL (n = 6), 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.

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® na concentração de 6/40 mg/Kg, respectivamente). O sangue foi coletado por punção do plexo venoso retro-orbital, para análise plasmática da glicose, da insulina, de triglicérides, do colesterol total e suas frações (LDL, HDL, VLDL). Em seguida, após a toracotomia, o coração e a artéria aorta foram removidos. O uso dos animais e o protocolo experimental foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Unifenas, sob parecer n° 03A/2007.

Análise plasmática

O plasma foi obtido por centrifugação do sangue (3000 rpm por dez minutos). A concentração plasmática da glicose foi mensurada pelo método enzimático colorimétrico, de acordo com a técnica proposta por Trinder¹⁴. O nível plasmático da insulina foi mensurado usando-se um kit comercial ELISA específico (DAKO Ltd, High Wycombe, Bucks, UK). O índice de Homa (Homa_{ir}) foi calculado pela fórmula: $\{Homa_{ir} = \text{insulinemia de jejum [mU/L]} \times \text{glicemia em jejum [mmol/L]} / 22,5\}$, para determinar a resistência insulina.

Na mensuração dos lipídeos plasmáticos (triglicérides, colesterol total e HDL), foram utilizados ensaios enzimáticos como descritos por Hedrick et al.¹⁵. O LDL foi determinado pela fórmula de Friedewald¹⁶ e o VLDL, conforme descrito por Tian et al.¹².

Procedimento histológico e imunoistoquímico

Logo após a remoção, o coração foi dissecado e o ventrículo esquerdo foi isolado e fixado por 24 horas em formalina a

10% juntamente com a artéria aorta. Em seguida, foram incluídos em parafina para cortes histológicos de quatro micrômetros de espessura, segundo Junqueira et al.¹⁷. Os cortes histológicos dos ventrículos foram tratados com peróxido de hidrogênio a 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*) 10 Mm pH 7,4. As lâminas foram incubadas por 12 horas com anticorpo policlonal produzido em coelho anti-CD40L (Santa Cruz® 1:50) em câmara húmida. Após a incubação com o anticorpo primário, foi feita a incubação com anticorpo secundário biotilado (kit Dako® LSAB+), durante uma hora a 37 °C. Para evidenciar as áreas imunorreativas, os cortes foram incubados com o complexo conjugado com peroxidase (Dako® LSAB+), durante 45 minutos a 37 °C e colocados em solução de cromógeno (50 mg de DAB em 50 ml de PBS com 3 ml de água oxigenada 10%) por três minutos. Após contracoloração com hematoxilina de Harris (Sigma®) por 25 segundos, as lâminas foram montadas e analisadas em microscópio óptico. As fotomicrografias foram analisadas pelo software LGMC-image versão 1.0 e as porcentagens fracionais da área imunorreativa para o CD40L do miocárdio foram adquiridas¹⁸.

Para análises das alterações morfológicas e para morfometria, os cortes histológicos da aorta foram corados 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 lâmina elástica externa e a lâmina elástica interna. A área íntima é a área entre a face interna da lâmina elástica interna e superfície endotelial do lúmen¹².

Cortes histológicos da artéria aorta também foram corados com *picrosírius 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 *picrosírius 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 colágeno¹⁸ referentes às áreas marcadas em vermelho pelo *picrosírius 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.

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 $p < 0,05$.

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

Tabela 1 Comparação dos níveis plasmáticos de glicose, insulina e lipídeos; índice de Homa ($HOMA_{ir}$) e as relações do colesterol (LDL/HDL e CT/HDL) nos camundongos dos grupos experimentais WT, S e HL

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

Os valores foram expressos como média ± EPM.

CT, colesterol total; HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade; VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade.

^ap < 0,05 comparado com WT; ^bp < 0,05 comparado com S.

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 comparado 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).

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 (cor marrom na Figuras A e B, 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 C e Tabela 2), e por um maior depósito de colágeno nas túnicas média-íntima e do colágeno total nas túnicas íntima, média (Tabela 2) e adventícia (Tabela 2 e Figura D). O remodelamento arterial dos camundongos HL foi muito mais expressivo quando comparado com o grupo S (Tabela 2, Figuras C e D).

Discussão

No presente estudo, observamos que os camundongos do grupo S foram resistentes ao desenvolvimento das lesões

na parede da aorta e ao processo inflamatório cardíaco, caracterizado pela baixa imunorreatividade do tecido cardíaco para o CD40L. Interessantemente, observamos que os camundongos do grupo S apresentaram níveis plasmáticos de HDL elevados, e não desenvolveram resistência insulínica, mesmo com hiperlipidemia espontânea moderada, quando comparados com grupo WT. Os camundongos do grupo HL apresentaram uma hiperlipidemia grave, marcado aumento na imunorreatividade cardíaca para o CD40L, pronunciadas alterações morfológicas na parede da aorta e resistência insulínica, associadas a um decréscimo nos níveis plasmáticos da fração HDL quando comparados com os do grupo S.

Estudos mostraram que a aterosclerose é uma doença inflamatória² e as principais hipóteses da aterogênese descritas nas últimas décadas são a do transporte reverso do colesterol¹⁹ e da oxidação da LDL^{2,20}. Ambas as hipóteses apontam o papel central da LDL oxidada como iniciadora, e do HDL como protetor da aterogênese²⁰. O aumento do HDL nos camundongos do grupo S, observado em nosso estudo, pode estar desempenhando um papel protetor cardiovascular devido a sua ação antioxidante²⁰. Essa ação está relacionada à sua proteína apoA-I com capacidade de remover os hidroperóxidos de lipídeos da LDL²¹. 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-1²² e paraoxonase-3²³. Nossos resultados corroboram com os encontrados por Krieger et al.¹³, que mostraram que camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta padrão para roedores apresentaram menor stress oxidativo na artéria aorta, quando comparados com os alimentados com dieta hiperlipídica.

O papel anti-inflamatório da HDL no nosso estudo pode estar relacionado a uma diminuição do stress oxidativo²⁴. Além disso, 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-inflamatórias²⁵, o que diminui a transmigração dos monócitos para a região subendotelial. Esses efeitos

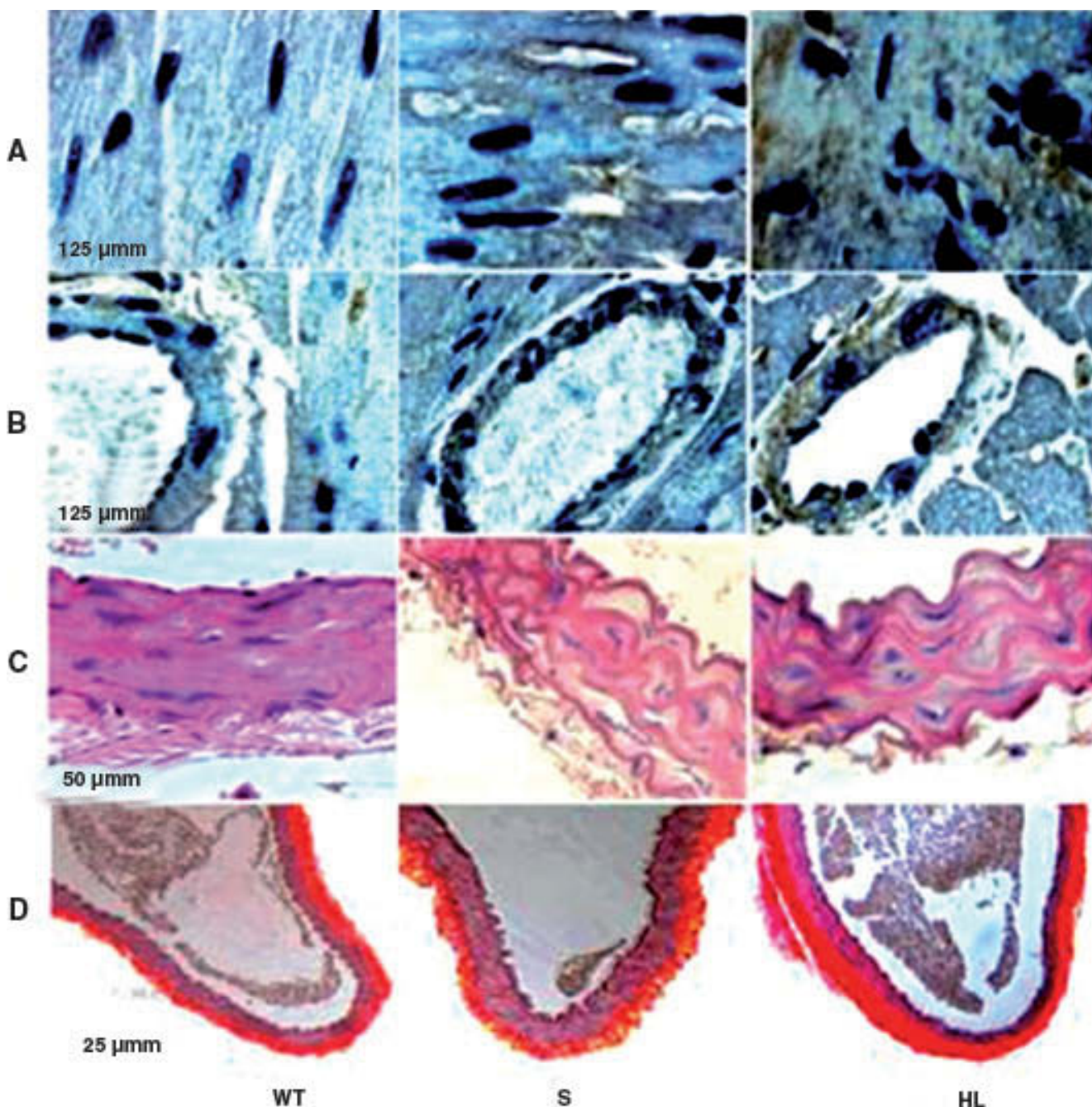


Figura Fotomicrografias de cortes histológicos transversais do ventrículo esquerdo mostrando área imunorreativa para CD40L no miocárdio e artéria coronária (cor marrom – A e B); Fotomicrografias de cortes histológicos da aorta corados com HE (C) e picosírus red (D). HL: hiperlipidêmico; S: padrão; WT: tipo selvagem.

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 stress oxidativo arterial descrito por Krieger et al.¹³ e a maior resistência no desenvolvimento das lesões arteriais, descrita por Tian et al.¹² nos camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta padrão, pode ser o nível plasmático do HDL aumentado,

observados no nosso estudo, quando comparados com os camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica.

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 α , ácidos gordos livres, stress oxidativo e a inflamação induzem a ativação de quinases de serina/treonina que fosforilam o IRS-1 em serina, inibindo sua função²⁶. A resistência insulínica associada à hiperinsulinemia não foi observada nos camundongos do grupo S, mostrando que o efeito antioxidante / anti-inflamatório

Tabela 2 Comparação da percentagem da área imunorreativa para o CD40L no miocárdio, da área da íntima, da área da média, da percentagem de colágeno na camada média-íntima e colágeno total da artéria aorta nos camundongos dos grupos experimentais WT, S e HL

Grupos experimentais	WT	S	HL
n	6	6	6
Área imunorreativa para CD40L no miocárdio (%)	0,0 ± 0,0	3,4 ± 0,2 ^a	7,7 ± 0,3 ^{a,b}
Área média (µm ²)	74904 ± 884	73960 ± 981	85638 ± 1618 ^{a,b}
Colágeno média-íntima (%)	3,4 ± 0,2	5,5 ± 0,2 ^a	7,2 ± 0,5 ^{a,b}
Colágeno total (%)	14,4 ± 0,5	15,8 ± 0,3 ^a	18,6 ± 0,6 ^{a,b}

Os valores foram expressos como média ± EPM.
^ap < 0,05 comparado com WT; ^bp < 0,05 comparado com S.

do HDL nestes animais pode estar prevenindo a oxidação dos substratos do receptor da insulina. Muitos estudos em *vitro* e em modelos animais demonstraram que várias citocinas pró-inflamatórias²⁷ estão envolvidas na patogênese da resistência insulínica, e muitas estratégias anti-inflamatórias demonstraram melhorar a sensibilidade à insulina²⁸.

Estudos indicaram que os camundongos LDLr-/- alimentados com dieta hiperlipídica desenvolveram extensa área de lesão aterosclerótica na aorta¹³, hipertrofia ventricular esquerda⁴, lesões neointimais e remodelamento arterial na artéria coronária¹² associadas ao aumento do stress 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.¹². 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 grave induziu ao stress oxidativo no miocárdio⁴, nas artérias¹³, por mecanismos que aumentaram a produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) ou que diminuíram os fatores antioxidantes endógenos.

O aumento na expressão do CD40L no sistema cardiovascular dos camundongos do grupo HL, além de exercer efeito pró-inflamatório, também exerceu efeito pró-oxidante²⁹. Isso mostrou que a hiperlipidemia grave dos camundongos HL pode ser considerada o fator metabólico indutor do maior stress oxidativo no sistema cardiovascular, aumentando a peroxidação lipídica da molécula de HDL e consequentemente a sua remoção hepática³⁰, com 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.

Conclusão

O nível plasmático elevado de HDL mostrou ser o fator protetor contra o desenvolvimento de processos inflamatórios cardiovasculares e resistência insulínica nos camundongos LDLr-/-, impedindo o desenvolvimento das lesões neointimais. Assim, o acompanhamento dos níveis plasmáticos do HDL em doentes dislipidêmicos deve ser rigoroso, pois qualquer variação hiperlipídica na dieta alimentar pode diminuir os níveis plasmáticos do

HDL com consequente processo inflamatório e oxidante cardiovascular e desenvolvimento da resistência insulínica com hiperinsulinemia.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais — FAPEMIG — e à Universidade José do Rosário Vellano pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste projeto; ao professor Vinícius Vieira Vignoli, pela revisão ortográfica; e ao biólogo Antônio Marcus Martins, pelo apoio técnico nas preparações histológicas.

Bibliografia

- Libby P, Ridker P, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1135-43.
- Lusis A. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:333-41.
- Zirlik A, Abdullah SM, Gerdes N, et al. Interleukin-18, the metabolic syndrome, and subclinical atherosclerosis: results from the Dallas Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2043-9.
- Garcia JA, Dos Santos L, Moura AL, et al. S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) prevents myocardial alterations in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice by antiinflammatory action. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008;51:78-85.
- Ross RN, Engel J. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-26.
- Vishnevetski D, Kiyani VA, Gandhi PJ. CD40 ligand: a novel target in the fight against cardiovascular disease. *Ann Pharmacother*. 2004;38:1500-8.
- Gelbmann CM, Leeb SN, Vogl D, et al. Inducible CD40 expression mediates NF-κB activation and cytokine secretion in human colonic fibroblasts. *Gut*. 2003;52:1448-56.
- Vellaichamy E, Sommana NK, Pandey KN. Reduced CGMP signaling activates NF-κB in hypertrophied hearts of mice lacking natriuretic peptide receptor-A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;327:106-11.
- Tilg H, Moschen AR. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med*. 2008;14:222-31.

10. Wang CCL, Goalstone ML, Draznin B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes*. 2004;53:2735-40.
11. Castelli WP, Doyle JT, Gordon T, et al. HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease. The Cooperative Lipoprotein Phenotyping Study. *Circulation*. 1977;55:767-72.
12. Tian J, Pei H, Sanders JM, et al. Hyperlipidemia is a major determinant of neointimal formation in LDL receptor-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;345:1004-9.
13. Krieger MH, Santos KFR, Shishido SM, et al. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide*. 2006;14:12-20.
14. Trinder R. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem*. 1969;6:24-27.
15. Hedrick CC, Castellani LW, Wong H, et al. In vivo interactions of apoA-II, apoA-I, and hepatic lipase contributing to HDL structure and antiatherogenic functions. *J. Lipid Res*. 2001;42:563-70.
16. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparatory ultracentrifugation. *Clin Chem*. 1972;18:499-502.
17. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR, et al. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;11:447-55.
18. Armstrong AT, Binkley PF, Baker PB, et al. Quantitative investigation of cardiomyocyte hypertrophy and myocardial fibrosis over 6 years after cardiac transplantation. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:704-10.
19. Zhang Y, Zanotti I, Reilly MP, et al. Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation*. 2003;108:661-3.
20. Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST, et al. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res*. 2004;45:993-1007.
21. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res*. 2000;41:1481-94.
22. Mackness B, Hine D, Liu Y, et al. Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;318:680-3.
23. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, 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*. 2001;21:542-7.
24. Holvoet P. Relations between metabolic syndrome, oxidative stress and inflammation and cardiovascular disease. *Verh K Acad Geneesk Belg*. 2008;70:193-219.
25. Xia P, Vadas MA, Rye KA, et al. High density lipoproteins (HDL) interrupt the sphingosine kinase signaling pathway. A possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL. *J Biol Chem*. 1999;274:33143-7.
26. Sykiotis GP, Papavassiliou AG. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1: a novel target for the reversal of insulin resistance. *Mol Endocrinol*. 2001;15:1864-9.
27. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259:87-91.
28. Barbuio R, Milanski M, Bertolo MB, et al. Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet. *J Endocrinol*. 2007;194:539-50.
29. Urbich C, Dernbach E, Aicher A, et al. CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation*. 2002;106:981-6.
30. Christison J, Karjalainen A, Brauman J, et al. Rapid reduction and removal of HDL- but not LDL-associated cholesteryl ester hydroperoxides by rat liver perfused in situ. *Biochem J*. 1996;314:739-42.