



# Influência dos níveis plasmáticos de lipoproteína de alta densidade na contagem de leucócitos e plaquetas em camundongos dislipidêmicos

Santos, E.S.<sup>1</sup>; Breyner, A.J.<sup>2</sup>; Messoria, L.B.<sup>3</sup>; Santos, L.<sup>3</sup>; Soares, E.A.<sup>3</sup>; Loyola, Y.C.S.<sup>3</sup>; Pereira, J.E.G.<sup>4</sup>; Incerpi, E.K.<sup>5</sup>; Garcia, J.A.D.<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Acadêmico do curso de Enfermagem da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Alfenas – MG – Bolsista do CNPq

<sup>2</sup> Professor de Imunologia e Microbiologia do curso de Medicina da Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS, Alfenas – MG.

<sup>3</sup> Professores de Fisiologia Humana, Farmacologia e Anatomia humana da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Alfenas – MG.

<sup>4</sup> Acadêmico do curso de Medicina Veterinária da Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas – MG .

<sup>5</sup> Médica Veterinária responsável pelo Biotério da Universidade Federal de Alfenas- UNIFAL, Alfenas. MG

<sup>6</sup> Doutor em Fisiologia, Orientador do Núcleo de Pesquisa em Farmacologia e Cirurgia experimental e Professor da disciplina de Fisiologia Humana nos cursos de Medicina e Odontologia; e de Fisiologia Geral no curso de Medicina Veterinária - da Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas – MG.

Recebido 13/10/2010 / Aceito 11/01/2011

## RESUMO

Neste estudo experimental investigou-se a influência da dislipidemia nos parâmetros do hemograma. Coletaram-se amostras de sangue de camundongos *wild type*, alimentados com dieta padrão, e de camundongos *knockout* para o gene do receptor de lipoproteína de baixa densidade, alimentados com dietas padrão e hiperlipídica. Determinaram-se os parâmetros do hemograma associando-os com os níveis plasmáticos de lipídeos. 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.

*Palavras-chave:* leucócitos, hemograma completo, colesterol HDL, dislipidemias, camundongos *knockout*.

## INTRODUÇÃO

Há poucos relatos na literatura que correlacionam as dislipidemias com os parâmetros do hemograma. Alguns associaram negativamente a contagem total de leucócitos periféricos e o nível plasmáticos de lipoproteína

de alta densidade colesterol (HDLc) e a baixa contagem de monócitos periféricos com a hipercolesterolemia (Huang et al, 2001), sugerindo que as dislipidemias podem influenciar as contagens total e diferencial de leucócitos periféricos. Sabe-se, ainda, que os lipídeos da dieta afetam a sua concentração plasmática e são capazes de modular a composição e as funções das células do sistema imunitário (Nicolosi et al., 2001).

As HDLc plasmáticas possuem um amplo espectro de ações antiaterogênicas, incluindo potente atividade antioxidante e anti-inflamatória (Barter et al., 2004). Apesar de as HDLc serem submetidas a modificações oxidativas, diversas enzimas que decompõem lipídeos oxidados e, assim, inibem a oxidação da lipoproteína de baixa densidade colesterol (LDLc), estão associadas com partículas de HDLc. Além disso, a apolipoproteína A-I (apoA-I), presente na HDLc, pode remover lipídeos oxidados da LDLc, sugerindo que a HDLc pode funcionar como um transportador de lipídeos oxidados (Navab et al., 2000). Portanto, essa molécula, uma vez oxidada, pode ser removida pelo fígado (Barter et al., 2004), diminuindo seu nível plasmático. A diversidade de ações antioxidantes da HDLc sugere que ela forneça eficiente proteção contra a oxidação da LDLc *in vivo*. Numerosos estudos clínicos e epidemiológicos relacionaram a diminuição da concentração plasmática da HDLc com o desenvolvimento de doença arterial coronariana (DAC) (Young et al., 2004) e descreveram relações importantes entre contagem de leucócitos e incidência de DAC (Phillips et al., 1992).

Na década de 1990, a engenharia genética desenvolveu camundongos considerados como modelos para estudos em hipercolesterolemia experimental. Estes, *knockout* para apolipoproteína E (ApoE) ou *knockout* para o gene do receptor de LDL (LDLr-/-), quando alimentados com dieta hiperlipídica, desenvolveram lesões semelhantes às de humanos, como aterosclerose, aumento na concentração plasmática de colesterol e

triglicérides (Krieger et al., 2006) e hipertrofia ventricular esquerda (Garcia et al., 2008) em relação aos camundongos LDLr/- alimentados com dieta padrão. A partir dessas considerações, este estudo teve como objetivo investigar a influência da dislipidemia nos parâmetros do hemograma de camundongos LDLr/-.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Protocolo animal

Os experimentos foram realizados em camundongos selvagens (cepa C57BL6) e homozigóticos para a ausência do gene do receptor de LDL (LDLr/-), gerados no *background* C57BL6, sendo machos com três meses de idade e peso de  $22 \pm 3$  gramas. Os animais foram criados no biotério da Universidade José do Rosário Vellano (Alfenas, MG, Brasil) com controle de temperatura e ciclo claro/escuro (12 horas), divididos em três grupos experimentais: Grupo WT (n=12) - camundongos selvagens que 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 contendo 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5 % de ácido cólico. Todos os animais receberam as respectivas dietas e água *ad libitum*. 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®) nas concentrações de 6 e 40 mg/Kg, respectivamente. O sangue coletado por punção do plexo venoso retro-orbital de seis animais de cada grupo foi destinado para análises bioquímicas e o de seis animais para análises hematológicas. O sangue para análise bioquímica de triglicérides, colesterol total e HDLc foi coletado utilizando o anticoagulante heparina para obtenção do plasma. Para contagem total e diferencial dos leucócitos, determinação dos parâmetros hematológicos do eritrograma e contagem de plaquetas, o sangue foi coletado com o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O uso dos animais e o protocolo experimental foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), sob o parecer número 11A/2007.

### Análises plasmáticas dos lipídeos

O plasma foi obtido por centrifugação do sangue (3000 rpm por 10 min). Os lipídeos plasmáticos (triglicérides, colesterol total e HDLc) foram mensurados por métodos enzimáticos colorimétricos utilizando protocolos descritos nos kits comerciais (In Vitro®) por automação. O VLDLc foi calculado pela divisão dos níveis plasmáticos de triglicérides por 5. O LDLc foi determinado pela fórmula:  $LDLc = \text{Colesterol total} - (\text{HDLc} + \text{VLDLc})$ .

### Hemograma

O sangue para contagem do número de leucócitos foi coletado utilizando EDTA (2 mg/mL de sangue). A

contagem total (leucócitos/mm<sup>3</sup>) foi feita a partir de 20µL de sangue e 0,4 de líquido de Turk (diluição 1/20), observadas após a contagem de cada um dos quatro quadrados do quadrante da câmara de Neubauer (L1 + L2 + L3 + L4) utilizando-se de microscópio óptico comum (aumento de 400X). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sanguíneos corados com o corante Panótico utilizando-se de microscópio óptico comum. 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 de microscópio óptico comum (aumento de 400X) e multiplicando-se o resultado por 10.000 (número de eritrócitos/mm<sup>3</sup> de sangue = H1 + H2 + H3 + H4 + H5 X 10.000). Após aspiração da amostra de sangue total por capilaridade em tubos para microematócrito (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 microcentrifuga (com a parte vedada para o sentido de fora) e centrifugado em 12.000 rpm por cinco 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). A contagem do número de plaquetas foi feita pela diluição na pipeta de Thoma utilizando o diluente oxalato de amônio a 1%, observada após a contagem de cada um dos cinco quadrados do quadrante central da câmara de Neubauer (H1 + H2 + H3 + H4 + H5) com microscópio óptico comum (aumento de 400X) e multiplicando-se o resultado por 1.000 (número de plaquetas/mm<sup>3</sup> de sangue = H1 + H2 + H3 + H4 + H5 X 1.000) (Oliveira, 2007). 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 chamado cianometahemoglobina. Após a leitura em espectrofotômetro, a absorvância final a 540nm é proporcional à concentração de hemoglobina na amostra. O cálculo da concentração de hemoglobina (g/dL) foi feito utilizando-se do 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 dez.

### Métodos estatísticos

Os dados foram expressos como média ± 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

Na análise do perfil lipídico, verificou-se uma hiperlipidemia média (moderada) nos camundongos do grupo S, com níveis plasmáticos de triglicérides aumentados em relação ao grupo WT (Tabela 1). Os camundongos do

grupo HL apresentaram hiperlipidemia severa, com níveis de triglicérides aumentados em relação aos grupos S e WT (Tabela 1). Quanto às frações do colesterol, observou-se um aumento nos níveis de HDLc, VLDLc e LDLc no grupo S em relação ao grupo WT (Tabela 1), e os camundongos do grupo HL apresentaram uma diminuição nos níveis plasmáticos de HDLc e um aumento nos níveis de VLDLc e LDLc em relação aos outros grupos (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação dos níveis plasmáticos de lipídeos (mg/dL) entre camundongos wild type (WT) e LDLr-/- alimentados com dieta padrão (S) e com dieta hiperlipídica (HL).

		Níveis plasmáticos de lipídeos (mg/dL)				
		Colesterol Total	HDLc	VLDLc	LDLc	Triglicérides
Wild type	WT(n=6)	128,5 ± 8,2	46,8 ± 1,7	17,7 ± 0,7	64,0 ± 2,0	88,5 ± 3,3
	S(n=6)	225,5 ± 10,0*	59,2 ± 2,2*	24,8 ± 0,9*	141,5 ± 8,6*	123,5 ± 4,0*
LDL r-/-	HL(n=6)	631,2 ± 32,0**	25,5 ± 1,9**	28,5 ± 1,3**	577,3 ± 31,9**	142,8 ± 6,7**

Os valores foram expressos como média ± EPM. \*p<0,05 comparado com WT; #p<0,05 comparado com S.

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 2). 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 2). A diminuição dos monócitos foi mais severa no grupo HL (Tabela 2). Os camundongos do grupo S apresentaram diminuição na contagem de neutrófilos em relação aos camundongos do grupo WT (Tabela 2). Entretanto, os camundongos do grupo HL apresentaram aumento na contagem de neutrófilos em relação ao grupo S (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação da contagem total e diferencial de leucócitos (leucócitos/mm<sup>3</sup>) entre camundongos wild type (WT) e LDLr-/- alimentados com dieta padrão (S) e com dieta hiperlipídica (HL)

		Contagem total e diferencial de leucócitos/mm <sup>3</sup>				
		Total de leucócitos	Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos
Wild type	WT(n=6)	5783 ± 694	848 ± 217	4708 ± 455	228 ± 48	0 ± 0
	S(n=6)	2983 ± 239*	379 ± 36*	2531 ± 243*	73 ± 28*	0 ± 0
LDL r-/-	HL(n=6)	3517 ± 185*#	772 ± 103#	2728 ± 165*	17 ± 12*#	0 ± 0

Os valores foram expressos como média ± EPM. \*p<0,05 comparado com WT; #p<0,05 comparado com S.

Na análise dos parâmetros hematológicos relacionados ao eritrograma não foram observadas alterações significativas entre os grupos de camundongos estudados (Tabela 3). Porém, houve um aumento na contagem do número de plaquetas nos camundongos do

grupo HL em relação aos outros grupos estudados (Tabela 3).

Tabela 3 - 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/mm <sup>3</sup> )	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Plaquetas (103/mm <sup>3</sup> )
Wild type	WT(n=6)	4,7 ± 0,1	12,5 ± 0,3	40,0 ± 0,8	238 ± 11
	S(n=6)	4,8 ± 0,2	13,3 ± 0,5	42,0 ± 1,8	241 ± 27
LDL r-/-	HL(n=6)	4,7 ± 0,1	13,3 ± 0,2	41,2 ± 0,8	301 ± 5*#

Os valores foram expressos como média ± EPM. \*p<0,05 comparado com WT; #p<0,05 comparado com S.

## DISCUSSÃO

No presente estudo, observamos uma relação negativa entre os níveis plasmáticos de HDLc e a contagem total de leucócitos e neutrófilos. Os camundongos do grupo S apresentaram dislipidemia caracterizada pela hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia moderadas. Além disso, os camundongos do grupo S apresentaram níveis plasmáticos de HDLc elevados, associados à diminuição da contagem total de leucócitos, diminuição do número de neutrófilos e de monócitos quando comparados com o grupo WT. Os camundongos do grupo HL apresentaram hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia severas e um marcado decréscimo nos níveis plasmáticos de HDLc associado ao aumento na contagem total de leucócitos, aumento do número de neutrófilos e aumento na contagem de plaquetas quando comparados com o grupo S.

O menor estresse oxidativo na aorta descrito nos estudos de Krieger et al. (2006), o menor processo inflamatório ventricular esquerdo descrito nos estudos de Garcia et al. (2008) e a resistência ao desenvolvimento das lesões neointimias descritas nos estudos de Tian et al. (2006) nos camundongos LDLr-/- alimentados com dieta padrão quando comparado com os camundongos LDLr-/- alimentados com dieta hiperlipídica podem estar relacionados com o aumento dos níveis plasmáticos de HDLc observados em nosso estudo nos camundongos do grupo S (camundongos LDLr-/- alimentados com dieta padrão), pois o HDLc tem efeito anti-inflamatório e antioxidante (Barter et al., 2004). O HDLc aumentado nos camundongos do grupo S pode ter reduzido as modificações oxidativas da LDLc (Barter et al., 2004; Kontush et al., 2003; Serrato e Marian, 1995) e neutralizado a atividade quimiotática de leucócitos, atenuando a inflamação induzida pelo recrutamento dos leucócitos, especialmente monócitos e neutrófilos (Badolato et al., 2004). A inibição da oxidação da LDLc pela HDLc é comumente atribuída ao seu conteúdo antioxidante (Barter et al., 2004), às propriedades antioxidantes da apolipoproteína A-I (Barter et al., 2004; Navab et al., 2000) e da apolipoproteína A-II e, principalmente, devido à presença de paraoxonase (Barter et al., 2004; Serrato e Marian, 1995). Além disso, a HDLc aumenta o efluxo do colesterol da parede arterial

e apresenta atividade anti-inflamatória. Ambas as ações, antioxidante e anti-inflamatória, diminuem não só a produção de mediadores e citocinas cardiovasculares, mas também o estresse oxidativo e a LDLc oxidada (Barter et al., 2004), protegendo assim, provavelmente, os camundongos do grupo S em nosso estudo contra o estresse oxidativo, processo inflamatório e o desenvolvimento das lesões neointimais descritas nos estudos acima citados. Isso reduz a disfunção endotelial e a aterogênese e, conseqüentemente, diminui a resposta imunológica nos camundongos do grupo S em nosso estudo, colaborando para a redução da contagem total de leucócitos, diminuição do número de neutrófilos e de monócitos observados nesses animais.

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, no presente estudo, possivelmente indicam insucesso na tentativa de diminuir o estresse oxidativo e o processo inflamatório observados anteriormente nos estudos de Krieger et al. (2006) e Garcia et al. (2008) respectivamente. 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, 2000). Isso, associado a menor proteção contra o estresse oxidativo por redução dos níveis plasmáticos da HDLc observado nesse estudo, provavelmente favoreceu a oxidação da LDLc e a aterogênese como descritos nos estudos de Krieger et al. (2006) nesse modelo animal. Uma vez minimamente oxidada a LDLc, o sistema imunológico não a reconhece mais como algo próprio do corpo e desencadeia uma resposta imunológica e inflamatória. Conseqüentemente, induz o surgimento de moléculas de adesão leucocitária (ICAM-1, VCAM-1, CD40 e selectina-E) na superfície endotelial (Lusis, 2000). Essa oxidação (i) aumenta a expressão de moléculas de adesão e de proteínas quimiotáticas, como a proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) (Berliner et al., 1990), 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- $\kappa$ B (Khan et al., 1996) e recruta fagócitos mononucleares (Zeiger et al., 1995); e (ii) 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 conseqüente elevação da contagem total de leucócitos e do número de neutrófilos nos camundongos do grupo HL quando comparados com o grupo S em nosso estudo, uma vez que a LDLc 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 HDLc associado com aumento na contagem do número de plaquetas quando comparados com o grupo S. O estresse oxidativo aumentado nesses animais por diminuição do agente antioxidante a HDLc implicada em inúmeras doenças cardiovasculares, inclui não somente

a vasodilatação reduzida, mas também os estados pró-inflamatório e pró-trombótico (Libby et al., 2002), os quais, respectivamente, podem explicar os eventos de neovascularização e ativação plaquetária em modelos de hipercolesterolemia experimental.

Em conclusão, nosso estudo mostrou uma associação negativa entre os níveis plasmáticos de HDLc e as contagens total e diferencial de leucócitos e plaquetas nos camundongos *knockout* para o gene do receptor de LDLc. Essa relação demonstrou importante influência da HDLc na modulação da resposta imunológica e inflamatória em indivíduos dislipidêmicos. Portanto, conhecendo-se a importância do hemograma para o diagnóstico e investigação de diversas patologias, acreditamos que, quando seus parâmetros forem associados e correlacionados com os níveis plasmáticos dos lipídeos, isso se torne uma ferramenta indispensável para o tratamento e/ou prevenção de inúmeras doenças que associam dislipidemias com o sistema imunológico.

## ABSTRACT

*Influence of plasma high density lipoprotein levels on leukocyte and platelet count in dyslipidemic mice*

**The aim of this study was to investigate the influence of dyslipidemia on the hemogram. Blood samples were collected from wild type mice fed a standard diet and from knockout mice for the low density lipoprotein (LDL) receptor gene fed on high-fat and standard diets. The blood cell counts were analyzed for their association with plasma lipid levels. The results showed a negative association between high density lipoprotein (HDL) plasma levels and complete and differential leukocyte and platelet counts in knockout mice for the LDL receptor gene. This relation revealed the important influence of the HDL on the modulation of the immune and inflammatory response in dyslipidemia. Therefore, routine analysis of the hemogram, correlated with the plasma lipid levels, may be valuable in the prevention and prognosis of the severity of pathological processes involving immune responses in dyslipidemia.**

*Keywords:* leukocytes, blood cell count, HDL cholesterol, dyslipidemia, knockout mice.

## REFERÊNCIAS

- Badolato R, Wang JM, Murphy WJ, Lloyd AR, Michiel DF, Bausserman LL, et al. Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med.* 2004; 180:203–209.
- Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory Properties of HDL. *Circulation Research.* 2004; 95:764–772.
- Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Kim JA, Bamshad B, et al. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest.* 1990; 85:1260–6.

- Garcia JA, Santos L, Moura AL, Ricardo KF, Wanschel AC, Shishido SM, et al. S-nitroso-n-acetylcysteine (SNAC) prevents myocardial alterations in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice by antiinflammatory action. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008; 51(1):78-85.
- Huang ZS, Chien KL, Yang CY, Tsai KS, Wang CH. Peripheral Differential Leukocyte Counts in Humans Vary with Hyperlipidemia, Smoking, and Body Mass Index. *Lipids*. 2001; 36(3):237-245.
- Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:9114-9.
- Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23(10):1881-8.
- Krieger MH, Santos KFR, Shishido SM, Wanschel ACBA, Estrela HFG, Santos L, et al. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide*. 2006; 14:12-20.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002; 105:1134-43.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000; 407:233-241.
- Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res*. 2000; 41:1495-508.
- Nicolosi RJ, Wilson TA, Lawton C, Handelman GJ. Dietary effects on cardiovascular disease risk factors: beyond saturated fatty acids and cholesterol. *J Am Coll Nutr*. 2001; 20(5):421S-427S.
- Oliveira RAG. Hemograma: como fazer e interpretar. 1st ed. São Paulo: Editora Livraria Médica Paulista; 2007. 544p.
- Phillips AN, Neaton JD, Cook DG, Grimm RH, Shaper AG. Leukocyte count and risk of major coronary heart disease events. *Am J Epidemiol*. 1992; 136:59-70.
- Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest*. 1995; 96(6):3005-8.
- Tian J, Pei H, Sanders JM, Angle JF, Sarembock IJ, Matsumoto AH, et al. Hyperlipidemia is a major determinant of neointimal formation in LDL receptor-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 345(3):1004-9.
- Young CE, Karas RH, Kuvin JT. High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease. *Cardiol Rev*. 2004; 12(2):107-19.
- Zeicher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res*. 1995; 76:980-986.

