UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE

Alice Belleigoli Rezende

A ESPLENECTOMIA AUMENTA AS LESÕES ATEROSCLERÓTICAS EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES EM APOPROTEÍNA "E" SUBMETIDOS A UMA DIETA ATEROGÊNICA

Juiz de Fora
2011

ALICE BELLEIGOLI REZENDE

A ESPLENECTOMIA AUMENTA AS LESÕES ATEROSCLERÓTICAS EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES EM APOPROTEÍNA "E" SUBMETIDOS A UMA DIETA ATEROGÊNICA

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado, área de concentração em Saúde Brasileira, do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira

Co-Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite

Juiz de Fora

2011

Rezende, Alice Belleigoli.

A esplenectomia aumenta as lesões ateroscleróticas em camundongos deficientes em apoproteína “E” submetidos a uma dieta aterogênica / Alice Belleigoli Rezende. – 2011.
100 f. : il.

Tese (Doutorado em Saúde)—Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

1. Baço. 2. Esplenectomia. 3. Aterosclerose. I. Título.

CDU 616.411

ALICE BELLEIGOLI REZENDE

A ESPLENECTOMIA AUMENTA AS LESÕES ATEROSCLERÓTICAS EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES EM APOPROTEÍNA "E" SUBMETIDOS A UMA DIETA ATEROGÊNICA

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado, área de concentração em Saúde Brasileira, do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Saúde.

Aprovada em 30 de agosto de 2011.

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira, Universidade Federal de Juiz de Fora.

_____

Prof. Dr. Andy Petroianu, Universidade Federal de Minas Gerais.

_____

Profa. Dra. Dirce Ribeiro de Oliveira, Universidade Federal de Minas Gerais.

_____

Profa. Dra. Jacy Gameiro, Universidade Federal de Juiz de Fora.

_____

Prof. Dr. Carlos Alberto Mourão Júnior, Universidade Federal de Juiz de Fora.

Dedico esta tese a todos aqueles que contribuíram para a sua realização.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a realização de mais este sonho.

Aos meus pais Edir e Geraldo, pelo amor incondicional e por me apoiarem sempre, não só nesta, mas em todas as conquistas da minha vida.

Ao meu irmão Ulisses, por ser meu fã número um e por ser otimista nos momentos difíceis.

Aos meus amigos, tios e primos, pela torcida e por fazerem parte da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira, por me acolher no Laboratório de Imunologia, por confiar no meu potencial e por estar sempre ao meu lado.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite, por acreditar no meu trabalho, por ter aberto as portas e me recebido com carinho no Laboratório de Bioquímica Nutricional e Aterosclerose da Universidade Federal de Minas Gerais.

Aos professores e amigos do Laboratório de Imunologia, Profa. Dra. Ana Paula Ferreira, Profa. Dra. Jacy Gameiro e Prof. Dr. Gilson Costa Macedo, pela disponibilidade e pelo apoio.

Aos demais amigos do Laboratório de Imunologia, pelo carinho, pelo auxílio sempre que necessário, e por fazerem do meu ambiente de trabalho um local especial.

À bolsista de iniciação científica Náira Neves Neto, pela sua dedicação e amizade, indispensáveis para a conclusão deste trabalho.

Às amigas Luciana Rodrigues Fernandes e Ana Cecília de Castro Ribeiro, pelo carinho e pela ajuda na execução dos experimentos. Sem elas teria sido impossível completar esta jornada. Aos demais colegas do Laboratório de Bioquímica Nutricional e Aterosclerose da Universidade Federal de Minas Gerais, por sempre me receberem bem.

Aos amigos do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, por acompanharem de perto a minha trajetória tornando-a mais agradável.

Aos amigos do Departamento de Anatomia e do Departamento de Morfologia, pelo apoio e incentivo.

Aos professores e funcionários do Instituto de Ciências Biológicas, por disponibilizarem laboratórios e equipamentos e pelo auxílio nas questões burocráticas.

À CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG pelo suporte financeiro fornecido ao projeto.

Àqueles(as) cujos nomes involuntariamente omitimos.

"Viva como se fosse morrer amanhã".
"Aprenda como se fosse viver para sempre".

Ghandi

"Que ninguém se engane, só se consegue a simplicidade através de muito trabalho".

Clarice Lispector

RESUMO

A aterosclerose é uma doença imune-inflamatória associada ao acúmulo de lípides na camada íntima das artérias. O baço desempenha uma importante função imunológica, mas a sua participação no desenvolvimento da aterosclerose permanece controversa. Considerando que a incidência de esplenectomias totais ainda é alta e que a doença aterosclerótica é prevalente, é de grande importância que se verifique se o tecido esplênico influencia no processo de aterosclerose. Neste trabalho, o impacto da esplenectomia no desenvolvimento da aterosclerose foi avaliado em camundongos deficientes em apoproteína E (apoE). Os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle (CT), composto de camundongos deficientes em apoE submetidos a um procedimento cirúrgico simulado; e grupo esplenectomia total (ET), camundongos deficientes em apoE submetidos à esplenectomia total. Trinta dias após a cirurgia, os animais foram submetidos a uma dieta aterogênica enriquecida com 0,15% de colesterol. Após oito semanas, os animais foram eutanasiados e o sangue, o coração e a aorta foram submetidos à análise. Os níveis séricos de colesterol total e de anticorpos anti-LDL oxidada foram avaliados. As áreas de lesão aterosclerótica na raiz da aorta foram quantificadas por morfometria em cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina. As lesões ateroscleróticas nas porções torácica e abdominal das aortas foram determinadas pela porcentagem da superfície luminal corada com Sudan IV em relação à área total do vaso. Os resultados mostraram que os níveis séricos de colesterol total não foram alterados pela esplenectomia e que os títulos de anticorpos IgG anti-LDL oxidada foram semelhantes entre os grupos. No entanto, foi observada uma maior porcentagem de lesões ateroscleróticas nas porções torácica e abdominal das aortas de animais esplenectomizados. Além disso, camundongos esplenectomizados apresentaram lesões ateroscleróticas na raiz da aorta significativamente maiores do que os animais controles. Estes dados indicam, em conjunto, que a esplenectomia está associada ao aumento das lesões ateroscleróticas em camundongos deficientes em apoE submetidos à dieta aterogênica, sugerindo um papel ateroprotetor do baço no modelo estudado.

Palavras-chave: Esplenectomia. Baço. Aterosclerose. Colesterol. LDL oxidada. Anticorpos. Camundongos deficientes em apoE.

ABSTRACT

Atherosclerosis is an inflammatory immune disease associated with lipid accumulation in the intima layer of arteries. The spleen plays an important immune function, but its influence in development of atherosclerosis remains unclear. Evaluation of the role of the spleen in atherosclerosis is justified due to the high frequency of total splenectomies and the high prevalence of atherosclerotic disease. In this work, the effect of splenectomy on the development of atherosclerosis in apolipoprotein E (apoE) deficient mice was investigated. ApoE deficient mice were divided into a sham-operated control group (CT) and a splenectomized group (SP). Thirty days after surgery, animals were fed a high fat western diet (with 0.15% cholesterol). After eight weeks, mice were euthanized and their blood, heart, and aorta were subjected to analysis. Total serum cholesterol and anti-oxidized LDL antibodies were measured. Atherosclerotic lesion areas in the aortic root were stained with hematoxylin-eosin and quantified by morfometry. The atherosclerotic lesions in the thoracic and abdominal portions of aorta were determined by assessing the percentage of the luminal surface area stained by Sudan IV. Levels of total serum cholesterol did not vary significantly after splenectomy. Anti-oxidized LDL IgG antibodies were similar between groups. However, compared to the control group, atherosclerotic area in the thoracic and abdominal portions of aorta were significantly increased in splenectomized mice. These data were confirmed by the larger lesions in the aortic root in splenectomized mice. These data indicate that splenectomy increases atherosclerotic lesions in apoE deficient mice fed an atherogenic diet, suggesting a atheroprotector role of the spleen.

Keywords: Splenectomy. Spleen. Atherosclerosis. Cholesterol. Oxidized LDL. Antibodies. ApoE deficient mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama das camadas que constituem a parede arterial..... 23

Figura 2: Fotografia de uma lesão aterosclerótica inicial na porção proximal da artéria coronária esquerda..... 24

Figura 3: Diagrama dos eventos iniciais no desenvolvimento de estrias gordurosas..... 25

Figura 4: Diagrama da evolução da estria gordurosa para a lesão fibrogordurosa.. 26

Figura 5: Diagrama da placa fibrosa ou lesão avançada..... 27

Figura 6: Fotografia do procedimento cirúrgico de esplenectomia total em camundongo deficiente em apoE..... 37

Figura 7: Níveis séricos de colesterol total (mmol/L) em camundongos deficientes em apoE controles e esplenectomizados..... 47

Figura 8: Títulos séricos de anticorpos IgG anti-oxLDL de camundongos deficientes em apoE controles e esplenectomizados..... 48

Figura 9: Lesões ateroscleróticas nas porções torácica e abdominal das aortas.... 49

Figura 10: Efeito da esplenectomia nas lesões ateroscleróticas nas porções torácica e abdominal das aortas de camundongos deficientes em apoE..... 49

Figura 11: Lesões ateroscleróticas na raiz das aortas..... 50

Figura 12: Efeito da esplenectomia nas lesões ateroscleróticas na raiz das aortas de camundongos deficientes em apoE..... 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da dieta TD.88137..... 38

Tabela 2: Ganho de peso dos camundongos deficientes em apoE controles e esplenectomizados e consumo da dieta aterogênica nos grupos..... 45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Apo	Apoproteína
BHT	"Butylated hydroxytoluene" - Di-terc-butil metil fenol
CD	"Cluster of differentiation" - Marcador de diferenciação celular
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CT	Grupo Controle
EDTA	"Ethylene diamine tetracetic acid" - Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	"Enzyme-linked immunosorbent assay" - Ensaio imunoenzimático
ET	Grupo Esplenectomia Total
Foxp3+	"Forkhead box P3" - Fator de transcrição associado a células T regulatórias
HDL	"High-density lipoproteins" - Lipoproteínas de alta densidade
IDL	"Intermediate-density lipoproteins" - Lipoproteínas de densidade intermediária
IFN-γ	"Interferon-gamma" - Interferon gama
IFNγR	"Interferon-gamma receptor" - Receptor de interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LDL	"Low-density lipoproteins" - Lipoproteínas de baixa densidade
LIGHT	Equivale a TNFSF14: Ligante 14 da superfamília do fator de necrose tumoral
MCP-1	"Monocyte chemotactic protein 1" - Proteína quimiotática para monócitos 1
M-CSF	"Macrophage colony-stimulating factor" - Fator estimulador de colônia de macrófagos
mmLDL	"Minimally modified LDL" - LDL minimamente modificada ou oxidada
natLDL	LDL nativa
OPD	Ortofenileno-diamino
oxLDL	"Oxidized LDL" - LDL oxidada
PBS	"Phosphate buffered saline" - Salina tamponada com fosfato
PTX	Pentoxifilina
QM	Quilomícrons
ROS	"Reactive oxygen specimes" - Espécies reativas de oxigênio
SMC	"Smooth muscle cells" - Células musculares lisas

SRA	"Scavenger receptor A" - Receptores *scavengers* ou removedores A
ST2	Receptor solúvel de IL-33
TAG	Tiacilgliceróis
Th	"T helper" - Célula T auxiliadora
TNF-α	"Tumor necrosis factor alpha" Fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1	"Vascular cell adhesion molecule 1" - Molécula de adesão à célula vascular 1
VLDL	"Very low-density lipoproteins" - Lipoproteínas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 17
2.1 O baço..... 17
2.2 Metabolismo lipídico e aterosclerose..... 20
2.2.1 Lipoproteínas plasmáticas..... 20
2.2.2 O processo de aterosclerose..... 22
2.3 O baço no metabolismo lipídico e na aterosclerose..... 28
2.3.1 A participação do sistema imunológico nestes processos..... 28
2.3.2 O papel do baço no metabolismo lipídico e na aterosclerose..... 31
2.4 Modelo experimental..... 33
3 OBJETIVOS..... 35
3.1 Objetivo geral..... 35
3.2 Objetivos específicos..... 35
4 MATERIAL E MÉTODOS..... 36
4.1 Animais..... 36
4.2 Anestesia e intervenção cirúrgica..... 36
4.3 Dieta aterogênica..... 37
4.4 Coleta de sangue..... 39
4.5 Determinação dos níveis séricos de colesterol total..... 39
4.6 Ensaio dos títulos séricos de anticorpos anti-oxLDL..... 40
4.6.1 Preparação da LDL..... 40
4.6.2 Detecção de anticorpos anti-oxLDL..... 41
4.7 Avaliação das lesões ateroscleróticas..... 41
4.7.1 Aorta torácica e abdominal..... 42
4.7.2 Raiz da aorta..... 43
4.8 Análise estatística..... 44
4.9 Delineamento experimental..... 44
5 RESULTADOS..... 45
5.1 Consumo da dieta aterogênica e ganho de peso dos animais..... 45
5.2 Níveis séricos de colesterol total..... 46

5.3 Títulos séricos de anticorpos IgG anti-oxLDL..... 47
5.4 Lesões ateroscleróticas nas porções torácica e abdominal da aorta..... 48
5.5 Lesões ateroscleróticas na raiz da aorta..... 50
6 DISCUSSÃO..... 52
7 CONCLUSÃO..... 61
REFERÊNCIAS..... 62
ANEXO A - Linha de pesquisa em baço e implante esplênico autógeno..... 77
ANEXO B - Artigo..... 79

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade até poucas décadas atrás, o baço foi, para a maioria dos estudiosos, um órgão enigmático. Por ter suas funções pouco esclarecidas e por sua ausência ser compatível com a vida, este órgão era retirado indiscriminadamente no trauma e em diversas doenças hematológicas. Durante muito tempo, a esplenectomia total foi considerada a única opção terapêutica para tratamento das lesões esplênicas, independente da extensão e da gravidade dos ferimentos (MCCLUSKY et al., 1999; REZENDE et al., 2007).

A importância do baço no sistema imunológico passou a ser reconhecida no século XX, quando estudos determinaram o risco de sepse fulminante e maior susceptibilidade a infecções em pacientes esplenectomizados (KING e SHUMACKER, 1952; HORAN e COLEBATCH, 1962). Também já é conhecido o papel do tecido esplênico na fisiologia hematológica, na filtração de células e partículas (TRAUB et al., 1987; PETROIANU, 2003a; PEROBELLI et al., 2011). Uma nova atribuição vem sendo associada ao baço: a participação no metabolismo lipídico e no processo de aterosclerose (FATOUROS et al., 1995; PAULO e SILVA, 2001; PETROIANU et al., 2006).

O conhecimento das funções do baço trouxe uma nova orientação no tratamento das afecções esplênicas. Tanto a indicação quanto a abordagem cirúrgica tornaram-se mais conservadoras, e várias técnicas de preservação do tecido esplênico já foram descritas. Entretanto, nas lesões mais graves do órgão, a esplenectomia total ainda é inevitável (BUNTAIN e GOULD, 1985; RESENDE e PETROIANU, 2003; NUNES et al., 2005).

Atualmente, a preocupação com o metabolismo lipídico é crescente, já que os níveis plasmáticos de colesterol estão relacionados com a formação de placas ateroscleróticas (NISHI et al., 2002; STEINBERG, 2009). A doença aterosclerótica é extremamente frequente e manifesta-se através de eventos isquêmicos de alta morbidade e mortalidade, como o infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular cerebral (LLOYD-JONES, 2010).

Nas últimas décadas, a influência do sistema imunológico no metabolismo lipídico e no processo de aterosclerose vem sendo amplamente estudada (NILSSON,

HANSSON e SHAH, 2005; LO et al., 2007; HANSSON e HERMANSSON, 2011). A hipótese de participação do baço nestes processos surgiu a partir de observações clínicas, como o aumento das lipoproteínas plasmáticas e da frequência de doenças isquêmicas coronarianas observadas em indivíduos que sofreram esplenectomia por trauma (ROBINETTE e FRAUMENI, 1977). Alguns trabalhos experimentais também identificaram alterações nos níveis circulantes de lipoproteínas e na porcentagem de placas ateromatosas na aorta em animais esplenectomizados (ASAI et al., 1988; PAULO et al., 2005).

Considerando que as doenças ateroscleróticas são uma das principais causas de mortalidade no Brasil e no mundo (DAHLOF, 2010), e que a incidência de esplenectomias totais ainda é alta, é de grande importância que se verifique se o tecido esplênico influencia no metabolismo lipídico e no desenvolvimento da aterosclerose.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O baço

O baço humano é um órgão maciço, relativamente volumoso, tem cerca de 12 x 7 x 4cm e está situado à esquerda do abdome, abaixo do diafragma (SANTANA, 2003). É o maior órgão linfoide do organismo, abriga grande número de células do sistema imunológico – 25% de todos os linfócitos estão no baço (ANTUNES, 2003). É também o maior órgão do sistema reticuloendotelial, podendo ser definido como um grande filtro sanguíneo discriminatório. Localiza-se em uma região especial, entre a circulação sistêmica e a circulação porta, sendo o órgão mais vascularizado do corpo humano – 350 litros de sangue passam a cada 24 horas pelo parênquima esplênico (SANTANA, 2003).

Durante muito tempo, o baço foi considerado um órgão misterioso. Sua história é longa e cheia de mitos. Entretanto, nos últimos 50 anos, um progresso acentuado em relação aos seus aspectos morfofuncionais foi alcançado (CHRISTO, 2001; PETROIANU, 2003b). Atualmente, duas importantes atividades já foram atribuídas a este órgão: a função imunológica e a função fagocitária. Sua composição celular, sua estrutura peculiar e a riqueza de sua vascularização favorecem o desempenho destas funções. Cerca de metade das células do baço pertencem ao tecido linfoide e a outra metade são células fagocíticas mononucleares (ZAGO, 2003).

A função imunológica do baço foi amplamente reconhecida após 1952, quando King e Shumacker Junior publicaram um estudo sobre complicações infecciosas pós-esplenectomia que despertou a atenção da comunidade científica para a importância do tecido esplênico na prevenção de infecções graves. Os autores descreveram a sepse fulminante pós-esplenectomia, uma situação clínica grave, que apresenta uma mortalidade de 50 a 75% e pode ocorrer até quarenta anos após a cirurgia (KING e SHUMACKER, 1952).

Desde essa época, os estudos sobre a participação do baço no sistema imunológico tornaram-se cada vez mais frequentes. Várias alterações deste sistema

foram observadas e descritas após a realização de esplenectomias, como a diminuição dos níveis séricos de imunoglobulinas, a redução da atividade fagocítica a antígenos intravenosos e a queda da produção de tuftisina, peptídeo envolvido na atividade e resposta migratória de células fagocíticas (ORDA et al., 1981; RESENDE e MACHADO, 2003; SHIH-CHING et al., 2004).

A função fagocitária do tecido esplênico está muitas vezes associada à função imunológica. O baço é responsável pela fagocitose de uma variedade de antígenos intravenosos, principalmente microorganismos encapsulados, como o *S. pneumoniae* e o *H. Influenzae*, muito comuns em nosso meio, e frequentemente envolvidos em infecções fulminantes em pacientes esplenectomizados (FERNANDES et al., 2010; PETROIANU et al., 2010; PEROBELLI et al., 2011). Camundongos esplenectomizados e infectados com *S.aureus* exibem maior carga bacteriana nos pulmões e no fígado quando comparados com os animais controles, o que está associado a um maior infiltrado inflamatório e a alterações no perfil de citocinas nestes órgãos, além da diminuição dos títulos séricos de IgM e IgG1 específicas (TEIXEIRA et al., 2008). Resultados semelhantes foram observados em relação ao *S. Pneumoniae*. Fernandes e colaboradores (2010) descreveram que, após infecção intravenosa com *S. Pneumoniae*, camundongos esplenectomizados apresentaram maior contagem de bactérias nos pulmões e no fígado, e menores níveis séricos de IgM, IgG1 e IgG2a específicas. A produção de IL-17 e o recrutamento de neutrófilos para ambos os órgãos também foram menores nos animais esplenectomizados, em comparação com os demais grupos (FERNANDES et al., 2010). Nos dois trabalhos, a capacidade de resposta aos agentes infecciosos prejudicada pela esplenectomia foi restaurada pela realização dos implantes esplênicos autógenos, reforçando a importância do tecido esplênico no controle destas infecções.

Além da inquestionável relevância para o sistema imunológico, a atividade fagocítica também é de grande importância para a homeostase do compartimento sanguíneo. O tecido esplênico é responsável por retirar da circulação hemáceas alteradas e senescentes. Os corpúsculos de Howell-Jolly e de Heinz, constituídos por resíduos do processo de hemocaterese, assim como uma enorme variedade de outras substâncias, também devem ser depurados da corrente sanguínea pelo baço (TRAUB et al., 1987; PETROIANU, 2003a; MEBIUS e KRAAL, 2005). Em adição, após a fagocitose, os macrófagos esplênicos funcionam como unidade recicladora

capaz de fornecer matéria-prima para a confecção de novas hemáceas (ANTUNES, 2003).

A melhor compreensão das funções do baço e de sua importância para o organismo trouxe uma nova orientação no tratamento das afecções esplênicas. Em muitos casos, as lesões do baço podem ser conduzidas clinicamente e, quando o tratamento cirúrgico é necessário, a intervenção realizada deve ser conservadora. A remoção total do tecido esplênico não é mais a única opção terapêutica. Várias técnicas que conservam o baço integral ou parcialmente foram descritas, como a esplenorrafia, a ligadura da artéria esplênica, a esplenectomia subtotal, a hemiesplenectomia e os implantes esplênicos autógenos (BUYUKUNAL, DANISMEND e YEKER, 1987; RESENDE e PETROIANU, 2003; PETROIANU, TEIXEIRA e DE ALENCAR, 2009).

Entretanto, a incidência de esplenectomias totais continua elevada, não só porque as lesões esplênicas são bastante frequentes, já que o baço é o órgão mais afetado em traumatismos abdominais fechados, mas também pelo fato das técnicas conservadoras não serem amplamente conhecidas e permanecerem de difícil execução para cirurgiões menos experientes (ABRANTES et al., 2002; NUNES et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2008). A reparação parcial ou total do baço no seu sítio anatômico sempre foi considerada difícil (PISTERS e PACHTER, 1994; AVENDANO, 1997).

Recentemente, estudiosos têm apontado a participação do baço no metabolismo lipídico e na aterosclerose, uma nova atribuição que contribuiria para reforçar a importância da preservação deste órgão (JAMEL et al., 2002; WITZTUM, 2002). Porém, a influência do tecido esplênico nestes processos ainda é controversa e precisa ser melhor estudada.

2.2 Metabolismo lipídico e aterosclerose

2.2.1 Lipoproteínas plasmáticas

Os lípides constituem os componentes básicos das membranas celulares e a principal forma de estoque energético no organismo humano. São representados principalmente pelos triacilgliceróis (TAG), fosfolípides e colesterol, que, por não serem solúveis, precisam ser transportados na corrente sanguínea por lipoproteínas (ROSS, 1995).

As lipoproteínas plasmáticas são complexos macromoleculares de lípides e proteínas, constituídos por uma parte central de lípides hidrofóbicos circundados por uma monocamada de lípides polares e proteínas. De acordo com sua origem, composição, densidade e tamanho, as lipoproteínas podem ser classificadas em: quilomícrons (QM), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (GOTTO, POWNALL e HAVEL, 1986; GOLDBERG, 1996).

As lipoproteínas podem ser sintetizadas e secretadas pelo intestino (quilomícrons) ou fígado (VLDL); as demais são resultado de transformações sofridas por estas partículas iniciais, como é o caso da LDL, da IDL e da HDL. Essas macromoléculas têm duas funções principais: solubilizar os lípides no plasma e regular o movimento destes em sua entrada e saída de células alvo e tecidos específicos (STRYER, 1996; MAHLEY, WEISGRABER e FARESE, 2003).

As apoproteínas (apo) são as proteínas componentes das lipoproteínas, que conferem estabilidade a estas partículas e determinam seu direcionamento metabólico via interação com receptores específicos em células alvo. Receptores para apoE estão presentes em grande número no fígado, e receptores para apoB são comuns no endotélio vascular e outros tecidos extra-hepáticos (SEGREST et al., 1992; FIELDING, 2000).

A LDL possui uma única molécula de apoB-100 e sua principal função é transportar o colesterol do fígado para os tecidos que dele necessitam, funcionando como fonte de colesterol requerido para formação de membranas e síntese de

hormônios esteróides (ALVAREZ-LEITE, 1995). Quando a demanda tecidual de colesterol é alta, os receptores são ativados para aumentar a captação da LDL. Entretanto, quando a célula está repleta de colesterol, ocorre um mecanismo de regulação negativa do receptor que protege a célula contra os efeitos deletérios do acúmulo de lípides. Consequentemente, se a LDL está em excesso no sangue, ou seja, em quantidades superiores à demanda tecidual, ela acumula-se na circulação e pode ser depositada na parede dos vasos, que também possuem receptores para apoB-100. A LDL é considerada, portanto, uma lipoproteína pró-aterogênica (COBBE e SHEPHERD, 1993; FRANCESCHINI, 1996; STOCKER e KEANEY, 2004).

Por outro lado, a HDL possui a apoE e é responsável pelo transporte reverso de colesterol, que consiste na remoção do excesso de colesterol livre dos tecidos periféricos e lipoproteínas circulantes e subsequente depósito no fígado para secreção através da bile. A HDL é considerada, portanto, uma lipoproteína antiaterogênica (COBBE e SHEPHERD, 1993; ALVAREZ-LEITE, 1995).

As alterações nos níveis circulantes de lipoproteínas, conhecidas como dislipidemias, modificam significativamente o metabolismo lipídico e podem desencadear processos lesivos ao organismo. De acordo com a IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007), as dislipidemias são classificadas em: a) hipercolesterolemia isolada, que é a elevação isolada do LDL-colesterol (≥160 mg/dL); b) a hipertrigliceridemia isolada, elevação isolada dos triglicérides (≥150 mg/dL), que reflete o aumento do volume de partículas ricas em triglicérides como VLDL, IDL e quilomícrons; c) hiperlipidemia mista, valores aumentados de ambos LDL-colesterol (≥160 mg/dL) e triglicérides (≥150 mg/dL); d) HDL-colesterol baixo, que é a redução do HDL-colesterol (homens <40 mg/dL e mulheres <50 mg/dL) isolada ou em associação com aumento de LDL-colesterol ou de triglicérides.

As dislipidemias são comumente descritas em pacientes portadores de risco cardiovascular elevado. A mortalidade destes pacientes está associada principalmente a eventos aterotrombóticos, como o acidente vascular encefálico e o infarto agudo do miocárdio, secundários ao processo de aterosclerose (EINHORN et al., 2003; ALBERTI, ZIMMET e SHAW, 2005; LLOYD-JONES, 2010).

2.2.2 O processo de aterosclerose

A aterosclerose é uma doença sistêmica e progressiva que se caracteriza pela formação de placas de ateroma na parede dos vasos, como as artérias aorta, carótidas, coronárias, ilíacas e femorais (LIBBY, 2001; SCOTT, 2004). A aterosclerose resulta de uma combinação de dislipidemia e inflamação vascular. Entretanto, os mecanismos pelos quais a dislipidemia desencadeia um processo inflamatório na parede arterial ainda não foram totalmente esclarecidos (LIBBY, 2002; YAN e HANSSON, 2007).

As artérias são geralmente compostas de três camadas que, a partir da luz do vaso, são as túnicas íntima, média e adventícia. A túnica íntima apresenta uma camada contínua de células endoteliais (endotélio), apoiada numa camada de tecido conjuntivo frouxo, e age como uma barreira à entrada de diversas substâncias e outras células, como os monócitos, dentro da parede do vaso. A túnica média é constituída principalmente de camadas concêntricas de células musculares lisas organizadas de forma helicoidal, que contraem e mantêm o tônus da parede arterial. Na túnica adventícia, camada mais externa, o colágeno do tipo I e as fibras elásticas são os principais componentes (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008) (Figura 1).

A hipótese oxidativa da aterosclerose sugere que o processo aterosclerótico possa ser iniciado por danos no endotélio vascular, produzidos por modificações oxidativas da LDL (CHANG, ABDALLA e SEVANIAN, 1997; STOCKER e KEANEY, 2004). Altas concentrações de LDL no plasma podem levar ao acúmulo de LDL no espaço subendotelial. Essa LDL aprisionada na íntima pode modificar-se oxidativamente pela atividade de espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidas por células endoteliais, macrófagos residentes e células musculares lisas (WITZTUM, 1993; STEFFENS e MACH, 2004).

A oxidação da LDL ocorreria em dois estágios: o primeiro resulta da oxidação dos lípides da LDL, com pequena alteração na apoB-100, e ocorre antes que os monócitos sejam recrutados (BERLINER et al., 1995). Neste estágio, a LDL apresenta-se minimamente oxidada (mmLDL) e ainda pode ser reconhecida pelos receptores de LDL das células (NAVAB et al., 1996).

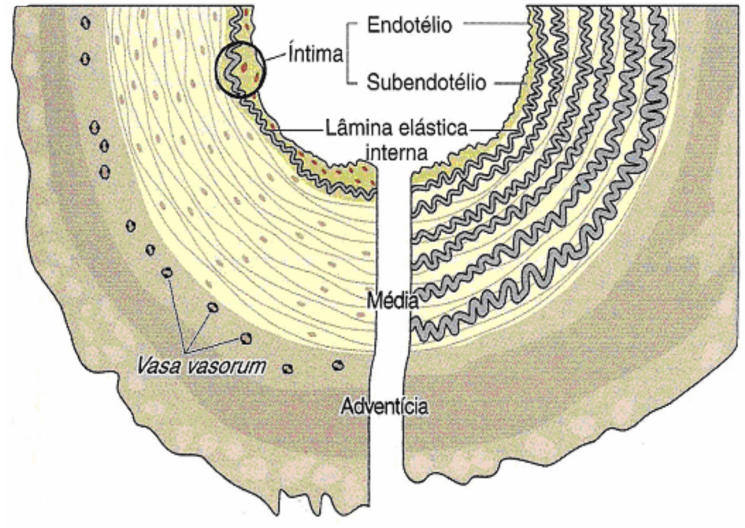


Figura 1: Diagrama das camadas que constituem a parede arterial. As artérias geralmente são compostas de três camadas: íntima, média e adventícia. O diagrama representa uma artéria muscular (esquerda) e uma artéria elástica (direita). A túnica média de uma artéria muscular contém predominantemente músculo liso, enquanto a túnica média das artérias elásticas é formada por camadas de músculo liso intercaladas por lâminas elásticas. A camada adventícia e a porção externa da média possuem vasos sanguíneos pequenos *(vasa vasorum)* e fibras elásticas e colágenas (Adaptado: JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

A LDL minimamente oxidada é capaz de causar injúria ao endotélio por alterar a expressão de algumas moléculas pelas células endoteliais. As células endoteliais, sob estímulo da mmLDL, aumentam a expressão de MCP-1 (proteína-1 quimiotática para monócitos) e do M-CSF (fator estimulador de colônia de macrófagos), além de moléculas de adesão (JIALAL e DEVARAJ, 1996; SANCHEZ-QUESADA et al., 2003).

O segundo estágio da oxidação da LDL começa quando monócitos são recrutados para a camada íntima e convertidos em macrófagos, aumentando a capacidade oxidativa. Nesta fase, os lípides da LDL são adicionalmente oxidados e a parte protéica da LDL também é modificada, originando a LDL oxidada (oxLDL). A oxLDL, devido a modificação da parte protéica, não pode mais ser reconhecida pelos receptores de LDL da maioria das células, tornando-se reconhecível apenas pelos receptores *scavengers* ou removedores presentes nos macrófagos e células musculares lisas (BERLINER et al., 1995; CHEN, MASAKI e SAWAMURA, 2002).

Estes receptores *scavengers*, tais como SRA-I, SRA-II e CD36, diferentemente dos receptores para LDL das outras células, não sofrem regulação negativa, isto é, sua expressão não é regulada pelo conteúdo intracelular de

colesterol. Consequentemente, a captação da oxLDL pelos macrófagos, pelas células endoteliais e células musculares lisas é rápida e contínua, levando ao acúmulo deste lípide. A oxLDL é degradada intracelularmente, o colesterol livre é esterificado e em seguida armazenado em gotas lipídicas, conferindo a estas células o aspecto de espuma (MITCHINSON e BALL, 1987; YANG et al., 1996). O acúmulo de células espumosas é a unidade básica da lesão aterosclerótica (STEINBERG, 1997; HANSSON, ROBERTSON e SODERBERG-NAUCLER, 2006) (Figura 2).

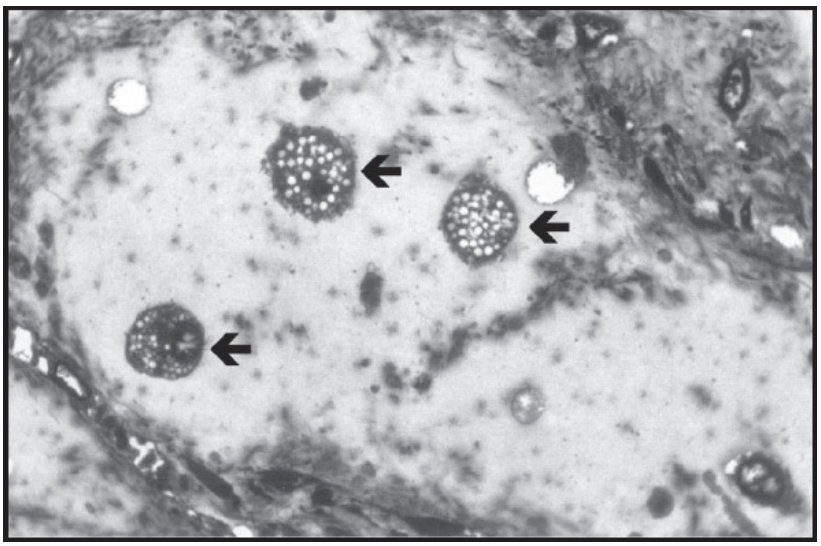


Figura 2: Fotografia de uma lesão aterosclerótica inicial na porção proximal da artéria coronária esquerda. Presença de células espumosas isoladas (setas) na camada íntima da parede arterial (Adaptado: BRANDÃO et al., 2004).

A primeira lesão observada na parede arterial é a *estria gordurosa*, composta principalmente por macrófagos transformados em células espumosas após internalização da oxLDL. A migração de monócitos para a parede arterial é um dos eventos iniciais na patogênese da aterosclerose (JIALAL e DEVARAJ, 1996; LUSIS, 2000). Embora seu recrutamento para a parede arterial e subsequente diferenciação em macrófagos possa inicialmente servir como função protetora, por remover partículas de LDL oxidada ou células apoptóticas, o acúmulo progressivo de macrófagos na parede do vaso e a captação de formas modificadas de LDL via receptores *scavengers* são responsáveis pela formação das células espumosas e das lesões ateroscleróticas iniciais (BERLINER et al., 1995; GLASS e WITZTUM, 2001) (Figura 3).

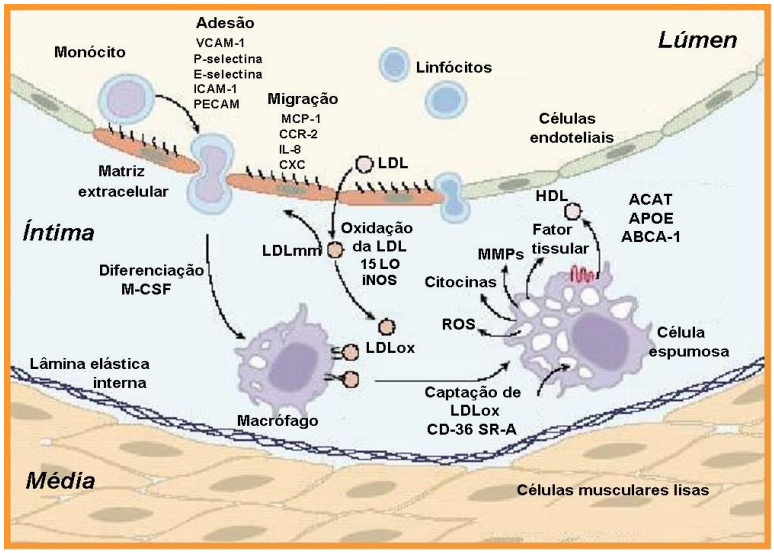


Figura 3: Diagrama dos eventos iniciais no desenvolvimento de estrias gordurosas. A LDL sofre modificações oxidativas no espaço subendotelial, progredindo de LDL minimamente oxidada (LDLmm ou mmLDL) para extensivamente oxidada (LDLox ou oxLDL). Monócitos aderem às células endoteliais que foram induzidas pela LDL minimamente oxidada a expressarem moléculas de adesão e citocinas inflamatórias. Monócitos que migraram para o espaço subendotelial se diferenciam em macrófagos. A captação de LDL oxidada pelos macrófagos via receptores *scavengers* resulta na formação de células espumosas. A LDL oxidada é degradada intracelularmente, o colesterol livre é esterificado e em seguida armazenado em gotas lipídicas (Adaptado: SCOTT, 2004).

A evolução de *estria gordurosa* para *lesão fibrogordurosa ou intermediária* é caracterizada pela migração de células musculares lisas (SMC) da camada média da parede arterial para a íntima ou espaço subendotelial. As SMC podem proliferar e captar oxLDL, contribuindo para formação de células espumosas. A migração e a proliferação de SMC são provocadas por fatores de crescimento e citocinas produzidos por células endoteliais, macrófagos e células T, sob estímulo da oxLDL (Figura 4). O consequente espessamento da camada íntima provoca o remodelamento da parede arterial, ou seja, uma dilatação da artéria, compensatória ao estreitamento do lúmen (RAINES e ROSS, 1993; YAN e HANSSON, 2007). A lesão intermediária contém os mesmos elementos celulares da estria gordurosa, porém alcança uma aparência mais complexa, consistindo de camadas alternadas de células espumosas e células musculares lisas, com uma grande quantidade de tecido conjuntivo. Esta fase de desenvolvimento da lesão é influenciada por interações entre macrófagos e células T, que resultam na aquisição de características de estado inflamatório crônico. As células T da lesão estão ativadas, expressando citocinas pró e anti-inflamatórias (Figura 4). Macrófagos, células

endoteliais e SMC também estão expressando e secretando mediadores inflamatórios, tais como TNF-α, IL-6 e MCP-1 (KHAN et al., 1995; HANSSON, 1997).

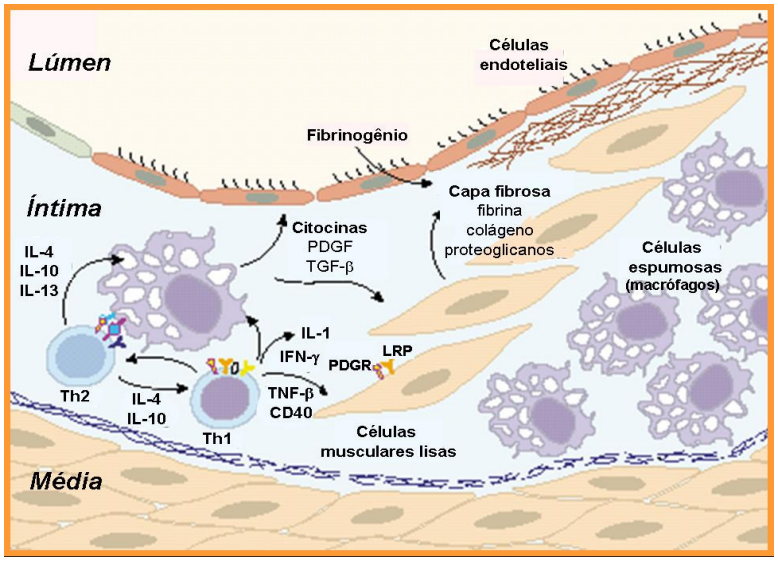


Figura 4: Diagrama da evolução da estria gordurosa para a lesão fibrogordurosa. Células musculares lisas (SMC) migram da camada média da parede arterial para a íntima ou espaço subendotelial. A migração e a proliferação de SMC é provocada por fatores de crescimento e citocinas produzidos por células endoteliais, macrófagos e células T, sob estímulo da LDL oxidada. Interações entre células espumosas, células Th1 e Th2 estabelecem um processo inflamatório crônico (Adaptado: SCOTT, 2004).

A *placa fibrosa ou lesão avançada* é formada por ciclos repetidos de acúmulo e ativação de macrófagos, migração e proliferação de células musculares lisas com produção de colágeno, que levam ao aumento progressivo da lesão até que se estruture uma capa fibrosa ao redor de um núcleo lipídico (ROSS, 1995; SCOTT, 2004). Este núcleo lipídico pode apresentar um centro necrótico que consiste de debris de células, material lipídico extracelular como cristais de colesterol e células espumosas (Figura 5). Neste estágio, a artéria já não consegue se dilatar adequadamente para compensar a obstrução parcial do lúmen, o que acarreta diminuição do fluxo sanguíneo (TSIMIKAS et al., 2003).

O excesso de células espumosas no núcleo lipídico e a presença de tecido necrótico tornam a placa mais frágil, facilitando uma fratura na capa fibrosa (DAVIES et al., 1993; LEE e LIBBY, 1997). Além disso, mediadores inflamatórios, liberados em parte como resposta à oxLDL, induzem a expressão de metaloproteinases da matriz extracelular, enzimas que digerem fibras de colágeno e elastina, contribuindo para a fragilização da capa da lesão (GALIS et al., 1994; CARMELIET, 2000). A

ruptura da capa fibrosa desencadeia a formação de trombos e a obstrução completa ou quase completa do vaso, induzindo isquemia tecidual (Figura 5). A ruptura da placa aterosclerótica é considerada a principal causa de eventos cardiovasculares agudos, como o infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular cerebral (LIBBY, 2001; SIQUEIRA, ABDALLA e FERREIRA, 2006).

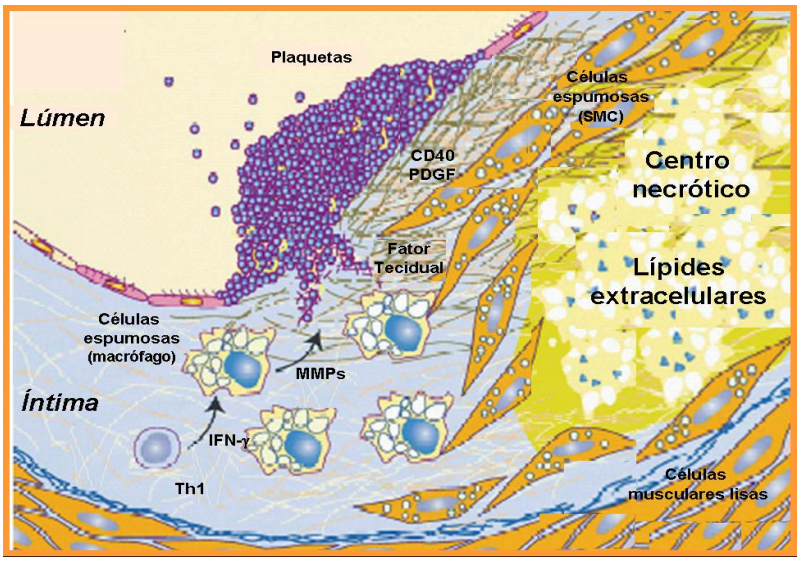


Figura 5: Diagrama da placa fibrosa ou lesão avançada. A placa fibrosa ou lesão avançada é formada por ciclos repetidos de migração, acúmulo e ativação de macrófagos e células musculares lisas, com produção de colágeno e formação de uma capa fibrosa ao redor de um núcleo lipídico. Este núcleo lipídico pode apresentar um centro necrótico que consiste de debris de células, material lipídico extracelular como cristais de colesterol e células espumosas. A secreção de metaloproteinases da matriz extracelular por macrófagos contribui para a instabilidade da placa fibrosa. A ruptura da placa desencadeia a coagulação, o recrutamento de plaquetas e a formação de trombos (Adaptado: SCOTT, 2004).

É evidente que, desde a disfunção endotelial até a ruptura das lesões na parede vascular, existe uma participação ativa da oxLDL como um agente pró-aterogênico, e do sistema imunológico como um importante mediador do processo de aterosclerose.

2.3 O baço no metabolismo lipídico e na aterosclerose

2.3.1 A participação do sistema imunológico nestes processos

Atualmente, a participação do sistema imunológico no metabolismo lipídico e no processo de aterosclerose é o alvo principal de muitas pesquisas (BINDER et al., 2002; HANSSON, 2005; ANDERSSON, LIBBY e HANSSON, 2010). Já existem evidências de que células T poderiam influenciar nos níveis circulantes de lipoproteínas e nas dislipidemias. Ligantes expressos em linfócitos T, como a linfotoxina e a LIGHT, podem se ligar a receptores específicos nos hepatócitos e alterar a atividade da enzima lipase hepática, que está diretamente associada à hidrólise de lípides no interior do fígado e aos níveis séricos de lipoproteínas (LO et al., 2007). Entretanto, a maior contribuição do sistema imunológico no processo de aterosclerose é a resposta imune-inflamatória que se estabelece na parede dos vasos.

A importância da imunidade inata no processo de aterosclerose já está bem estabelecida. O depósito de LDL na parede arterial está diretamente associado à ativação de uma resposta imunológica inata, elaborada inicialmente pelas células endoteliais, e uma vez estabelecido o processo inflamatório, por macrófagos e outras células recrutadas para a lesão (HANSSON, ROBERTSON e SODERBERG-NAUCLER, 2006).

Os macrófagos desempenham um papel fundamental no início do processo de aterosclerose. Monócitos recrutados para a lesão e convertidos em macrófagos internalizam a oxLDL via receptores *scavengers*, formando as células espumosas. O acúmulo de células espumosas caracteriza a estria gordurosa, primeira lesão observada na parede arterial (MITCHINSON e BALL, 1987; STEFFENS e MACH, 2004). Além disso, os macrófagos secretam citocinas como a IL-1, IL-6, TNF-α e outros mediadores pró-inflamatórios que contribuem para a manutenção da inflamação vascular e que atuam potencializando a ativação de linfócitos T e B via expressão de moléculas co-estimuladoras (HANSSON e HERMANSSON, 2011). São as células mais abundantes nas lesões com intensa resposta inflamatória. Portanto, os macrófagos também têm grande importância na progressão da lesão

aterosclerótica e podem estar envolvidos no remodelamento vascular e na desestabilização da placa (YAN e HANSSON, 2007).

Por outro lado, a participação da imunidade adquirida no processo de aterosclerose é cada vez mais evidente. Células T são recrutadas juntamente com os macrófagos para as lesões ateroscleróticas. Linfócitos T subtipo Th1 já foram identificados em vários estágios da lesão, desde a disfunção endotelial até a ruptura da placa (ANDERSSON, LIBBY e HANSSON, 2010). Células Th1 secretam IFN-γ, IL-2, TNF-α, citocinas com propriedades pró-inflamatórias. O IFN-γ é considerado uma das principais citocinas pró-aterogênicas e destaca-se como mediador chave na aterosclerose. Está relacionado com vários efeitos patogênicos nas placas ateroscleróticas, que incluem a diferenciação de monócitos para macrófagos, a ativação de macrófagos e linfócitos T, a indução das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-6, o recrutamento de monócitos e linfócitos T devido ao estímulo à produção de quimiocinas como a MCP-1 e moléculas de adesão (VCAM-1), e a formação de células espumosas através da regulação positiva de receptores *scavengers* (KOGA et al., 2007; HANSSON e HERMANSSON, 2011).

Em adição às células Th1, que predominam nas lesões, as placas ateroscleróticas apresentam quantidades moderadas de células TCD8+ e um pequeno número de células B. O papel pró-aterogênico das células Th1 já está bem estabelecido, porém a participação das células Th2 e linfócitos B no processo de aterosclerose ainda é controversa (WITZTUM, 2002; AIT-OUFELLA et al., 2010). Alguns trabalhos experimentais sugerem que as células B teriam um papel protetor associado, principalmente, ao desenvolvimento de uma resposta humoral e à produção de anticorpos contra a oxLDL (CALIGIURI et al., 2002; MAJOR, FAZIO e LINTON, 2002). No entanto, o papel destes anticorpos na origem e progressão da doença aterosclerótica ainda não foi completamente elucidado (TOSHIMA et al., 2000; SHOENFELD et al., 2004).

Modelos experimentais têm demonstrado um efeito protetor dos anticorpos anti-oxLDL. Camundongos imunizados com oxLDL apresentaram um aumento dos níveis séricos de IgG anti-oxLDL e uma redução do processo de aterosclerose (ZHOU et al., 2001). Anticorpos IgM anti-oxLDL murinos podem bloquear os receptores *scavengers* de macrófagos e alterar a formação de células espumosas e da estria gordurosa, atuando de forma benéfica no processo de aterosclerose (BINDER et al., 2002).

Em humanos, os resultados são bastante conflitantes. Anticorpos anti-oxLDL foram detectados tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes com aterosclerose e doença cardiovascular (SALONEN et al., 1992; ZEZINA et al., 2002). Karvonen e colaboradores (2003) mostraram uma associação inversa entre o grau de comprometimento da parede das artérias carótidas e os títulos de anticorpos IgM anti-oxLDL. Esta diferença permaneceu estatisticamente significativa mesmo após o ajuste de outros fatores que interferem no processo de aterosclerose, como idade, sexo, LDL-colesterol, pressão arterial sistólica e tabagismo (KARVONEN et al., 2003). Por ouro lado, em indivíduos com diabetes mellitus tipo 1, foi evidenciada uma correlação direta entre imunocomplexos formados por anticorpos anti-oxLDL e a oxLDL e a doença cardiovascular. A formação destes complexos parece ser importante no processo aterogênico de indivíduos diabéticos (LOPES-VIRELLA et al., 1999). Além disso, alguns trabalhos têm mostrado associações divergentes entre a IgM e a IgG anti-oxLDL e a aterosclerose, sugerindo que o efeito protetor ou patogênico destes anticorpos poderia estar relacionado com a classe dos mesmos (SHOENFELD et al., 2004; TSIMIKAS et al., 2007).

Atualmente, evidências sugerem que a participação dos linfócitos B e células Th2 no processo de aterosclerose não se resume apenas à produção de anticorpos e pode estar associada à modulação da resposta Th1, que é pró-aterogênica (MILLER et al., 2008). Além disso, as células B são importantes para diferenciação de células T CD4+ provenientes de populações periféricas em células T regulatórias (NGO, CORNALL e CYSTER, 2001; SUTO et al., 2002). Vários trabalhos já evidenciaram um efeito protetor das células T regulatórias em modelos de doença aterosclerótica (AIT-OUFELLA et al., 2006; TALEB, TEDGUI e MALLAT, 2008).

Como podemos observar, a participação do sistema imunológico no processo de aterosclerose vem sendo amplamente estudada. A aterosclerose já é definida por muitos autores como uma doença imune-inflamatória, na qual células imunocompetentes, tais como macrófagos e linfócitos, e outros mediadores imunológicos estão presentes em todos os estágios da lesão (STEFFENS e MACH, 2004; HANSSON e HERMANSSON, 2011).

2.3.2 O papel do baço no metabolismo lipídico e na aterosclerose

Apesar de o baço ser um importante órgão do sistema imunológico, a sua influência no metabolismo lipídico e no processo de aterosclerose permanece controversa (WITZTUM, 2002; REZENDE et al., 2007). A hipótese de participação do tecido esplênico nestes processos surgiu a partir de duas observações clínicas principais. Robinete e Fraumeni Júnior, em 1977, estudando a esplenectomia e sua subsequente mortalidade em veteranos que estiveram na 2ª Guerra Mundial, observaram um aumento dos lípides plasmáticos e da frequência de doenças isquêmicas coronarianas em pacientes esplenectomizados. Em paralelo, outros autores mostraram que pacientes com doenças mieloproliferativas demonstraram um declínio das concentrações plasmáticas de lípides, e este fenômeno estaria associado, a princípio, a uma hiperfunção do baço (AVIRAM et al., 1986; SUGIHARA, OTSUKA e YAWATA, 1989).

Trabalhos experimentais foram realizados na tentativa de estudar e confirmar estas observações. Em 1988, Asai e colaboradores observaram que coelhos esplenectomizados apresentavam aumento do colesterol total, dos triglicérides e redução do HDL-colesterol quando submetidos a uma dieta enriquecida com lípides, alterações que não foram registradas no grupo controle. Descreveram também que a porcentagem de placas ateromatosas na aorta foi maior no grupo submetido à esplenectomia (ASAI et al., 1988). Em 2006, Petroianu e colaboradores mostraram que a remoção total do tecido esplênico estava associada ao aumento do colesterol total, do LDL-colesterol e redução do HDL-colesterol em ratos. Por outro lado, em 2007, Rezende e colaboradores descreveram que a esplenectomia não modificou os níveis circulantes de lipoproteínas em camundongos. Ou seja, apesar das evidências clínicas iniciais, os resultados encontrados nos trabalhos experimentais que associam o baço ao metabolismo lipídico e à aterosclerose ainda são conflitantes.

Inicialmente, foi sugerido que o baço participaria do metabolismo lipídico e do processo de aterosclerose via alteração dos níveis circulantes de lipoproteínas (FATOUROS et al., 1995; PAULO e SILVA, 2001). Entretanto, os trabalhos citados acima mostraram que o impacto da esplenectomia nos níveis séricos de lipoproteínas ainda é controverso, com alguns estudos mostrando que a esplenectomia altera os níveis circulantes de lipoproteínas, e outros evidenciando

que a remoção total do tecido esplênico não influencia nos níveis séricos destas macromoléculas (ASAI et al., 1998; PETROIANU et al., 2006; REZENDE et al., 2007). O papel do baço no metabolismo lipídico e na aterosclerose pode ser muito mais amplo que a alteração dos níveis circulantes de lipoproteínas.

O baço é o maior reservatório orgânico de células do sistema imunológico. O tecido esplênico participa ativamente da migração, proliferação e ativação de linfócitos e macrófagos, células diretamente envolvidas nas várias etapas de formação da lesão aterosclerótica (WITZTUM, 2002; WLUKA e OLSZEWSKI, 2006). A ausência de tecido esplênico poderia alterar estes mecanismos, afetando, por exemplo, o recrutamento destas células para o local de lesão e até mesmo o seu estado de ativação. O baço também abriga grande número de células B, assim como células T regulatórias, que têm sido associadas a um efeito protetor na aterosclerose (CALIGIURI et al., 2002; MOR et al., 2007).

Além disso, o baço está associado classicamente ao desenvolvimento de respostas Th2 sistêmicas e à imunidade humoral. O baço é o principal local de apresentação antigênica e produção de anticorpos contra antígenos sanguíneos, como a oxLDL e outras lipoproteínas modificadas (CALIGIURI et al., 2002; ABBAS e LICHTMAN, 2007). Se os anticorpos anti-oxLDL realmente exercem um efeito protetor, o tecido esplênico estaria diretamente associado ao desenvolvimento e progressão da aterosclerose.

Em adição, o baço é um órgão do sistema mononuclear fagocitário, sendo fundamental no processo de fagocitose (MEBIUS e KRAAL, 2005). Os imunocomplexos formados pelos anticorpos anti-oxLDL e a oxLDL precisam ser processados por células fagocíticas, uma vez que sua permanência no endotélio, como já descrito anteriormente, seria prejudicial (LOPES-VIRELLA et al., 1999). Essa fagocitose seria realizada localmente por macrófagos teciduais e, sistemicamente, por macrófagos esplênicos (CALIGIURI et al., 2002).

Apesar dos trabalhos já descritos na literatura, a participação do baço no metabolismo lipídico e no processo de aterosclerose e os mecanismos pelos quais o tecido esplênico influenciaria nestes processos ainda não foram esclarecidos (ASAI et al., 1988; WITZTUM, 2002; REZENDE et al., 2007). Considerando que as doenças ateroscleróticas são um problema global de saúde pública (DAHLOF, 2010), é de grande importância a realização de estudos que conduzam a uma melhor

compreensão da influência do tecido esplênico no metabolismo lipídico e no processo de aterosclerose.

2.4 Modelo experimental

Atualmente, a maioria dos trabalhos que visam esclarecer os mecanismos envolvidos no processo de aterosclerose são realizados em modelos experimentais. Camundongos de diferentes linhagens têm sido utilizados ao longo do tempo para investigação das características e dos mecanismos de atuação do sistema imunológico (TEIXEIRA e KAUFMANN, 1994; CAMPOS et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2006). Considerando que a participação do tecido esplênico no metabolismo lipídico e no processo de aterosclerose está provavelmente associada ao desenvolvimento de uma resposta imunológica, tanto inata quanto adquirida, o modelo experimental murino seria adequado para avaliação desta função.

Além disso, o camundongo é o modelo animal mais utilizado para o estudo de lípides e aterosclerose (BRESLOW, 1996; FAZIO e LINTON, 2001). Camundongos selvagens são altamente resistentes ao desenvolvimento de aterosclerose. Em resposta a uma dieta com pequena quantidade de gordura e colesterol, os camundongos selvagens apresentam baixos níveis de colesterol total, assim como das frações LDL e VLDL, e a maioria do colesterol está na fração HDL (85%). Altos níveis de HDL podem justificar a resistência de camundongos selvagens ao desenvolvimento de aterosclerose (PLUMP et al., 1992; TIAN et al., 2006). Em humanos, a principal lipoproteína carreadora de colesterol é a LDL (65-85%). Apesar destas diferenças, camundongos e seres humanos possuem, com poucas exceções, o mesmo conjunto de genes que controlam o metabolismo de lipoproteínas (ZHANG et al., 1992; DE SILVA et al., 1994; NEUZIL et al., 1998).

O gene da apoproteína E (apoE) é um dos principais genes determinantes dos níveis de lípides no plasma em seres humanos e em camundongos (HOFKER, VAN VLIJMEN e HAVEKES, 1998). A apoE é uma apoproteína estrutural localizada na parte externa de QM, VLDL, IDL e HDL, cuja função principal é servir como ligante das lipoproteínas nos receptores de apoE do fígado (VAN REE et al., 1994; ALVAREZ-LEITE, 1995).

Camundongos deficientes em apoE têm sido criados por recombinação homóloga de células tronco embrionárias. A deficiência de apoE resulta em remoção defeituosa das lipoproteínas e em alterações nos níveis circulantes dessas macromoléculas, com acúmulo de remanescentes de QM e de VLDL no plasma, o que constitui um estímulo aterogênico nestes animais (BRESLOW, 1996). Camundongos deficientes em apoE desenvolvem uma hiperlipidemia mista semelhante à humana (GHISELLI et al., 1981), fornecendo evidências de que o papel da apoE nas duas espécies é bastante semelhante (FAZIO e LINTON, 2001).

Os animais deficientes em apoE possuem níveis de colesterol plasmático cerca de cinco vezes mais elevados do que o de camundongos selvagens, e as lesões iniciais de aterosclerose podem ser observadas na aorta proximal aos três meses de idade (ZHANG et al., 1992). Os camundongos deficientes em apoE contêm o espectro inteiro de lesões similares às observadas durante a aterogênese humana, e, como no homem, o processo pode ser acelerado pelo uso de dietas gordurosas (REDDICK, ZHANG e MAEDA, 1994; MOGHADASIAN, FROHLICH e MCMANUS, 2001). Sendo assim, camundongos deficientes em apoE constituem um modelo experimental adequado para o estudo dos vários fatores que controlam ou influenciam o desenvolvimento da placa aterosclerótica (HANSSON e HERMANSSON, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a participação do baço no metabolismo lipídico e no processo de aterosclerose de camundongos C57Bl/6 deficientes em apoproteína E.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o consumo da dieta aterogênica e o ganho de peso de camundongos deficientes em apoproteína E esplenectomizados e não esplenectomizados;

- Avaliar os níveis séricos de colesterol total de camundongos deficientes em apoproteína E esplenectomizados e não esplenectomizados;

- Avaliar a presença de uma reposta humoral específica contra a LDL oxidada em camundongos deficientes em apoproteína E esplenectomizados e não esplenectomizados, através da determinação dos títulos séricos de anticorpos anti-LDL oxidada;

- Avaliar o processo de aterosclerose em camundongos deficientes em apoproteína E esplenectomizados e não esplenectomizados, através da identificação e quantificação das lesões ateroscleróticas presentes nas porções abdominal e torácica, assim como na raiz da aorta destes animais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57Bl/6 deficientes em apoE, machos, a partir de seis semanas de idade. Os animais foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Bioquímica Nutricional e Aterosclerose da Universidade Federal de Minas Gerais e mantidos no setor de experimentação do Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os camundongos permaneceram em estante ventilada e gaiolas microisoladoras durante todo o experimento.

Os animais foram divididos em dois grupos: Grupo 1: Controle (CT) - 10 camundongos deficientes em apoE submetidos a um procedimento cirúrgico simulado, para afastar a interferência do trauma anestésico-cirúrgico nos experimentos; Grupo 2: Esplenectomia Total (ET) - 10 camundongos deficientes em apoE submetidos à esplenectomia total. Estes grupos têm por objetivo estudar o impacto da esplenectomia no metabolismo lipídico e no processo de aterogênese de camundongos C57Bl/6 deficientes em apoE.

O trabalho foi desenvolvido de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), após ter sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (Protocolo nº 060/2007).

4.2 Anestesia e intervenção cirúrgica

A anestesia e a intervenção cirúrgica foram realizadas nos animais com aproximadamente seis semanas de idade. Para a anestesia foi utilizada uma solução

composta por quetamina (5%), xilazina (2%) e solução salina (NaCl 0,9%), na proporção de 3:1:8, tendo sido aplicados 6ml/Kg, por via intraperitoneal.

A intervenção cirúrgica foi realizada em capela de fluxo laminar com material previamente esterilizado. Os animais do grupo controle foram submetidos a um procedimento cirúrgico simulado, sendo realizados laparotomia mediana e inventário da cavidade abdominal, mobilização do baço e isolamento dos vasos esplênicos, e posterior laparorrafia.

No grupo esplenectomizado foram realizados laparotomia mediana e esplenectomia total convencional, com ligadura do pedículo vascular e dos vasos do ligamento esplenogástrico com categute simples número 5-0 em separado, e posterior laparorrafia (Figura 6). A laparorrafia foi realizada em plano único com poligalactina número 4-0 em ambos grupos.

Figura 6: Fotografia do procedimento cirúrgico de esplenectomia total em camundongo deficiente em apoE. O pedículo vascular (seta à esquerda) e os vasos do ligamento esplenogástrico (seta à direita) foram ligados para a realização da esplenectomia total.

4.3 Dieta aterogênica

Para um melhor estudo do metabolismo lipídico e do processo de aterosclerose, os animais foram submetidos a uma dieta com alto teor de gorduras. Camundongos deficientes em apoE possuem uma remoção defeituosa das

lipoproteínas plasmáticas, o que constitui um estímulo aterogênico nestes animais (BRESLOW, 1996). O consumo de dietas ricas em gorduras e colesterol exacerba as lesões e acelera a evolução das mesmas (NAKASHIMA et al., 1994; MEIR e LEITERSDORF, 2004).

A dieta utilizada foi a TD.88137, comercializada pela Harlan Teklad, cuja fórmula original é da Rockefeller University (Tabela 1). É considerada uma dieta aterogênica, de padrão ocidental, utilizada em modelos murinos manipulados geneticamente e susceptíveis a aterosclerose.

Tabela 1: Composição da dieta TD.88137.

Fórmula	g/kg
Caseína	195,00
DL-Metionina	3,00
Sacarose	341,46
Amido de milho	150,00
Manteiga	210,00
Colesterol	1,50
Celulose	50,00
Mix mineral, AIN-76 (170915)	35,00
Mix vitamínico, Teklad (40060)	4,00
Carbonato de cálcio	10,00
BHT	0,04

Fonte: Harlan Teklad.

A dieta foi iniciada 30 dias após a intervenção cirúrgica, quando os animais estavam com aproximadamente dez semanas de idade, e mantida por oito semanas consecutivas. Inicialmente, foi padronizado que os camundongos C57Bl/6 deficientes em apoE, submetidos à dieta aterogênica TD.88137, ingerem aproximadamente 3,5g de ração por dia. Este valor serviu como base para calcular a quantidade de alimento adequada a ser colocada em cada gaiola, garantindo a todos os animais uma oferta satisfatória da ração qualitativa e quantitativamente. O consumo diário de dieta por animal foi avaliado e controlado durante todo o experimento.

Os animais foram pesados no início do experimento (intervenção cirúrgica) e depois, semanalmente, até a eutanásia. Os valores obtidos foram registrados e o ganho de peso neste período foi avaliado.

4.4 Coleta de sangue

Após oito semanas em uso da dieta aterogênica, com aproximadamente 18 semanas de idade, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e o sangue foi coletado do plexo orbital imediatamente antes da eutanásia. As amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm por dez minutos e o soro foi separado, aliquotado e armazenado a -20˚C. O volume de soro obtido foi satisfatório para análise posterior dos níveis séricos de colesterol total e dosagem de anticorpos anti-oxLDL.

4.5 Determinação dos níveis séricos de colesterol total

Com o objetivo de avaliar o impacto da esplenectomia nos níveis circulantes de colesterol de camundongos deficientes em apoE, os níveis séricos de colesterol total foram avaliados nos animais dos grupos controle e esplenectomizado, após jejum de 12 horas.

Os níveis séricos de colesterol total foram determinados pelo método da colesterol oxidase (ALLAIN et al., 1974), utilizando-se um kit comercial (Human GmbH, Wiesbaden, Alemanha). O método consiste na hidrólise de ésteres de colesterol pela colesterol esterase, produzindo colesterol livre. Este, em presença da colesterol oxidase e de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. A ação da peroxidase no peróxido de hidrogênio, em presença de fenol e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado (absorção máxima em 505 nm).

Os níveis de colesterol total no soro dos animais foram determinados por um ensaio em microplaca de 96 poços, de acordo com Fazio e colaboradores (1997). Inicialmente, 10 µL das amostras de soro foram diluídos em água destilada (1:200), para que as leituras de absorbância fossem adequadas à variação linear do teste.

Em seguida, 100 µL de reagente de colesterol total foram adicionados a 100 µL do soro diluído. Após um período de incubação de dez minutos a 37˚C, a absorbância foi lida a 492 nm em um leitor de microplaca (Molecular Devices, modelo Spectra Max 190).

4.6 Ensaio dos títulos séricos de anticorpos anti-oxLDL

Uma das hipóteses de participação do tecido esplênico no metabolismo lipídico e no processo de aterosclerose seria através da produção de anticorpos anti-LDL oxidada. Para avaliar esta possibilidade, os títulos séricos de anticorpos IgG anti-oxLDL foram dosados em camundongos controles e esplenectomizados.

4.6.1 Preparação da LDL

Amostras de sangue de voluntários saudáveis foram coletadas em tubos contendo EDTA e centrifugadas a 3.000 rpm por dez minutos a 4˚C. A seguir, o plasma foi coletado e, após ajuste da densidade com brometo de potássio, a LDL foi isolada por ultracentrifugação a 50.000 rpm por 150 minutos a 4˚C (Ultracentrífuga Sorvall Ultra Pro-80), usando um rotor 875T (CHUNG et al., 1986). A LDL isolada, ou LDL nativa (natLDL), foi dialisada em PBS por 18 horas, filtrada em filtro Millex 0,45 µm e armazenada a 4˚C protegida da luz. A oxidação da LDL foi realizada pela adição de 2,5 µmol/L de cloreto de cobre ($CuCl_2$) a 0,25 mg/mL de LDL (equivalente a 50 µg/mL de proteína) e posterior incubação por cinco horas a 37˚C. Após o período de incubação, foram adicionados 40 mmol/L de EDTA para quelar o cobre e parar a reação de oxidação (VAY et al., 2001). A oxLDL também foi dialisada em PBS por 18 horas, filtrada em filtro Millex 0,45 µm e armazenada a 4˚C protegida da luz. A oxidação da LDL foi monitorada pela dosagem da quantidade de proteínas pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

4.6.2 Detecção de anticorpos anti-oxLDL

Após a preparação da LDL nativa e da LDL oxidada, os soros de camundongos controles e esplenectomizados foram diluídos para detecção de anticorpos anti-natLDL e anti-oxLDL.

Microplacas de 96 poços (PolySorp; Nunc, Rochester, EUA) foram sensibilizadas com 100 µL/poço de natLDL ou oxLDL a 50 µg/mL em tampão fosfato pH 7,4 (PBS) e mantidas por 24 horas em temperatura ambiente. Após o período de sensibilização, as placas foram vertidas para descartar o excesso de LDL não aderida. Foram adicionados 200 µL/poço de uma solução de bloqueio (PBS contendo albumina de soro bovino a 1%), e as placas foram incubadas por uma hora a 37˚C. As placas foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween a 0,05%. Foram adicionados 100 µL/poço de soro nas diluições 1:10, 1:20 e 1:80, e as placas foram mantidas por 18 horas em temperatura ambiente. A seguir, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween e incubadas por duas horas a 37˚C com 100 µL/poço de anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase (Sigma, St. Louis, EUA), na diluição de 1:10.000. As placas foram lavadas dez vezes com PBS-Tween e incubadas com 100 µL/poço de uma solução contendo 1 mg de ortofenileno-diamino (OPD) por mL de tampão citrato-fosfato (pH=5) e 4 µL de H_2O_2. Após 20 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 30 µL/poço de H_2SO_4 a 1 mol/L diluído a 1:20. A absorbância foi analisada por leitor automático de microplaca (Molecular Devices, modelo Spectra Max 190) com leitura a 492 nm (NARVANEN, ERKKILA e YLA-HERTTUALA, 2001). O resultado final dos títulos séricos de anticorpos anti-oxLDL de cada animal foi calculado nas diferentes diluições pela relação das dosagens dos níveis séricos de anticorpos anti-oxLDL e dos níveis séricos de anticorpos anti-natLDL.

4.7 Avaliação das lesões ateroscleróticas

A aterosclerose é uma doença progressiva que se caracteriza pela formação de placas de ateroma na parede dos vasos, como a artéria aorta. Com o objetivo de

avaliar o impacto da esplenectomia na aterogênese de camundongos deficientes em apoE, foram analisadas as lesões ateroscleróticas nas porções abdominal e torácica, assim como na raiz da aorta de animais controles e esplenectomizados.

4.7.1 Aorta torácica e abdominal

Após a eutanásia (aprofundamento da anestesia), a aorta e o coração de camundongos deficientes em apoE controles e esplenectomizados foram retirados para avaliação das lesões de aterosclerose.

As deposições lipídicas nas porções torácica e abdominal das aortas foram detectadas utilizando-se o corante Sudan IV. As aortas foram dissecadas e toda a adventícia foi removida a partir do arco aórtico até a bifurcação ilíaca. As aortas foram abertas longitudinalmente e acondicionadas individualmente em placas de Petri (5 cm de diâmetro) para os procedimentos de fixação e coloração. As aortas foram fixadas por 18 horas com solução de formol-sacarose (4% paraformoldeído, 5% de sacarose, 20 µmol/L de BHT e 2 µmol/L EDTA; pH 7,4) a 4˚C. Depois de fixadas, as aortas foram submetidas a uma solução de etanol a 70% durante cinco minutos. As aortas foram então coradas, sob agitação, numa solução filtrada contendo 0,5% de Sudan IV (Sigma, St. Louis, EUA), 35% de etanol, e 50% de acetona, por dez minutos. Posteriormente, foram descoradas sob agitação por cinco minutos em solução de etanol a 80% (PALINSKI et al., 1994).

As imagens das aortas com as deposições lipídicas coradas com Sudan IV foram capturadas por uma câmera digital (FE-26, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio estereoscópico (SZ40, Olympus, Tóquio, Japão). Para aumentar a resolução, cada aorta foi capturada em dois segmentos. As imagens foram analisadas utilizando os programas Adobe Photo Impact versão 7.0 e Image Pro Plus.

O corante Sudan IV corou de vermelho as deposições lipídicas na parede das aortas. A área de lesão aterosclerótica foi determinada pela soma das medidas das deposições lipídicas coradas. O cálculo final foi feito como porcentagem da área de lesão aterosclerótica em relação à área total da aorta.

4.7.2 Raiz da aorta

As lesões ateroscleróticas também foram avaliadas na raiz da aorta de camundongos controles e esplenectomizados deficientes em apoE. Os corações foram retirados em bloco com a raiz da aorta, lavados em PBS, sendo então fixados em paraformaldeído tamponado a 4% em temperatura ambiente. Os corações já fixados foram recortados transversalmente sob visão estereoscópica, ao nível da borda atrial inferior direita, de modo a obter um fragmento contendo a porção proximal do coração e a raiz da aorta. Este fragmento foi processado conforme rotina para inclusão em parafina, e foram feitos cortes histológicos de 10 µm, rigorosamente consecutivos, a partir da superfície de inclusão. As lâminas foram numeradas em série e coradas com hematoxilina-eosina.

Todos os cortes histológicos obtidos foram examinados com o objetivo de localizar as estruturas anatômicas referenciais da valva aórtica na raiz da aorta. De acordo com a presença dessas estruturas referenciais, um corte histológico foi selecionado para tomada da medida inicial. A partir desse ponto, o primeiro de cada três cortes consecutivos foi selecionado para análise morfométrica da lesão, totalizando dez cortes histológicos por animal e amostrando uma extensão média de 250-300 µm, conforme Paigen e colaboradores (1987).

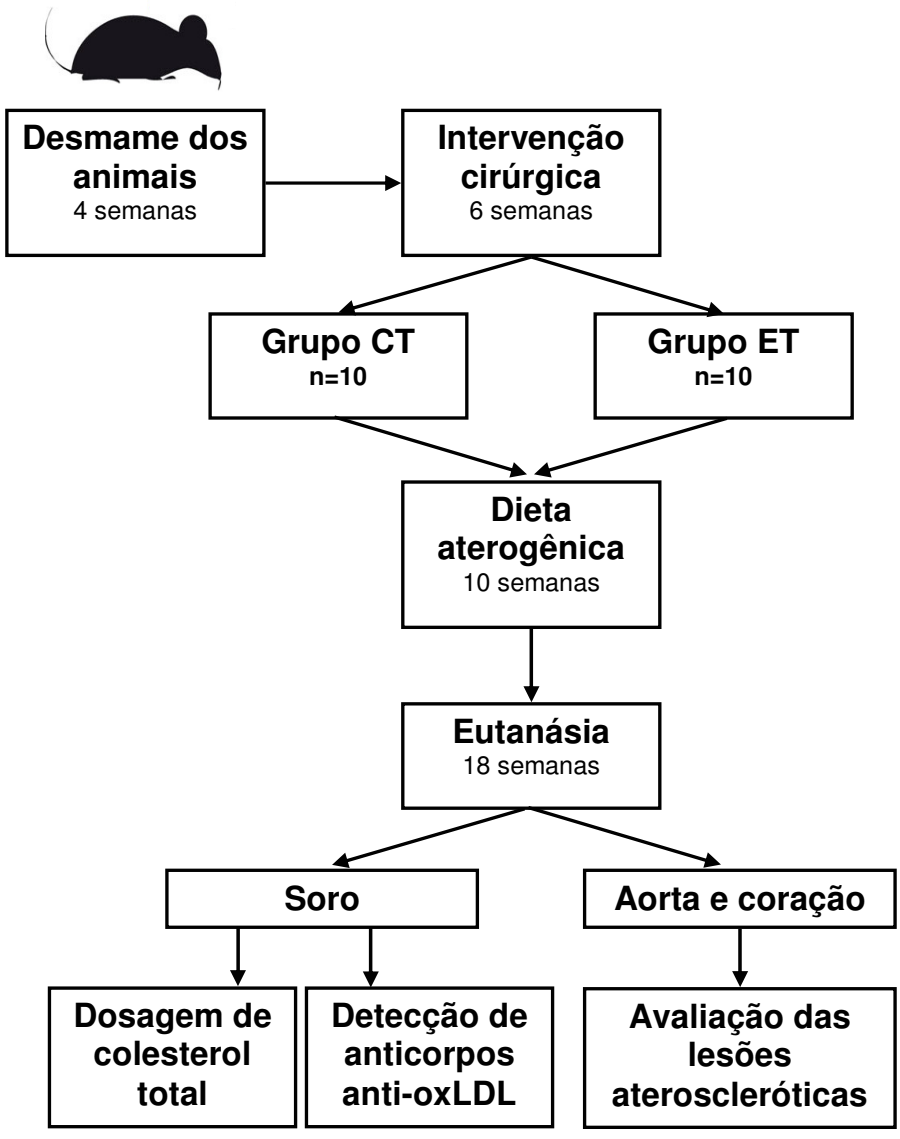
As imagens dos cortes selecionados foram obtidas por uma câmera digital (DSC-W35, Sony, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio óptico (N-180M, Coleman, Bristol, Reino Unido). O programa analisador de imagens Image Pro Plus foi utilizado para obtenção das medidas das áreas de lesão aterosclerótica.

A área da lesão aterosclerótica foi determinada em cada corte selecionado. O cálculo da lesão média/animal foi feito somando-se todas as medidas dos dez cortes selecionados, representando o valor real medido da lesão aterosclerótica na raiz da aorta.

4.8 Análise estatística

As variáveis numéricas foram avaliadas nos grupos pelo teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. A avaliação estatística das variáveis com distribuição normal foi realizada utilizando-se o teste paramétrico *t* de Student. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para as variáveis não-paramétricas. Os valores foram considerados significativos para $p < 0,05$. O software GraphPad Prism® 5.0 foi utilizado para a análise estatística e confecção dos gráficos.

4.9 Delineamento experimental



5 RESULTADOS

5.1 Consumo da dieta aterogênica e ganho de peso dos animais

Camundongos deficientes em apoE, com seis semanas de idade, foram submetidos à esplenectomia total ou à operação simulada. Trinta dias após a cirurgia, com dez semanas de idade, foi iniciada dieta aterogênica, mantida por oito semanas consecutivas. O consumo diário de dieta por animal foi avaliado e controlado durante todo o experimento. Não houve diferença entre os grupos controle (3,1 ± 0,1 g/animal/dia) e esplenectomizado (3,4 ± 0,2 g/animal/dia) no consumo diário da dieta aterogênica (Tabela 2).

Tabela 2: Ganho de peso dos camundongos deficientes em apoE controles e esplenectomizados e consumo da dieta aterogênica nos grupos.

	Grupo Controle	Grupo Esplenectomia Total
Peso inicial (g)	19,5 ± 0,6	20,4 ± 0,8
Peso final (g)	28,2 ± 0,8	28,2 ± 0,7
Ganho de peso (%)	45,5 ± 5,7	40,4 ± 7,3
Consumo da dieta (g/animal/dia)	3,1 ± 0,1	3,4 ± 0,2

Dados expressos como média ± erro padrão.

Em relação ao controle do peso corporal, os animais foram pesados no início do experimento e depois semanalmente até a eutanásia. Foi considerado peso inicial, o peso corporal dos animais no momento da intervenção cirúrgica, com aproximadamente 06 semanas de idade, e peso final, o peso corporal dos animais imediatamente antes da eutanásia, com aproximadamente 18 semanas de idade. A Tabela 2 mostra que o peso inicial dos animais foi semelhante nos grupos controle (19,5 ± 0,6 g) e esplenectomizado (20,4 ± 0,8 g). O peso final também foi similar entre os grupos (28,2 ± 0,8 g no grupo CT e 28,2 ± 0,7 g no grupo ET). Portanto, não

houve diferença no ganho de peso dos animais controles (45,5 ± 5,7%) e esplenectomizados (40,4 ± 7,3 %) durante o experimento.

A homogeneidade observada no consumo da dieta e no ganho de peso entre os animais controles e esplenectomizados é de grande importância para interpretação dos demais resultados, uma vez que as diferenças observadas entre os grupos em alguns parâmetros analisados não poderão ser associadas ou justificadas por discrepâncias na ingestão alimentar ou no peso corporal dos animais.

5.2 Níveis séricos de colesterol total

Atualmente, a aterosclerose é considerada uma associação de dislipidemia e inflamação vascular. Sabe-se que os níveis plasmáticos de colesterol total estão relacionados com a formação de placas de ateroma (LO et al., 2007; PORTUGAL, FERNANDES e ALVAREZ-LEITE, 2009). Para avaliar o impacto da esplenectomia neste parâmetro, os níveis séricos de colesterol total foram analisados no soro de animais controles e esplenectomizados.

A Figura 7 mostra que os animais controle apresentaram níveis séricos de colesterol total (30,2 ± 2,4 mmol/L) semelhantes aos observados nos animais esplenectomizados (32,2 ± 2,5 mmol/L). Este resultado evidencia que a remoção total do tecido esplênico não altera os níveis séricos de colesterol total de camundongos deficientes em apoE submetidos à dieta aterogênica.

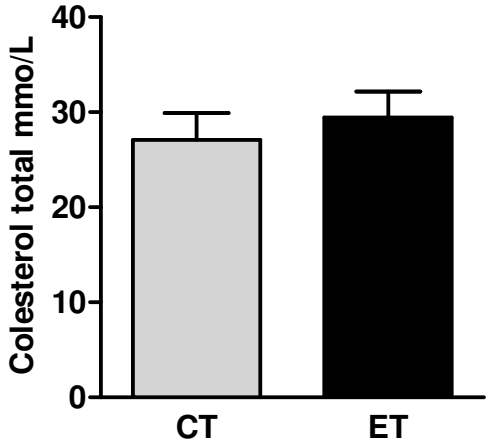


Figura 7: Níveis séricos de colesterol total (mmol/L) em camundongos deficientes em apoE controles e esplenectomizados. Após oito semanas em uso de dieta aterogênica, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e o sangue foi coletado para dosagem do colesterol total. CT: Grupo Controle (n=10). ET: Grupo Esplenectomia Total (n=10). Dados expressos como média ± erro padrão.

5.3 Títulos séricos de anticorpos IgG anti-oxLDL

O estabelecimento de uma reposta humoral contra a LDL oxidada vem sendo associado a um efeito protetor no processo de aterosclerose, porém os resultados ainda são controversos (SHOENFELD et al., 2004; VAN LEEUWEN et al., 2009).

Os títulos séricos de anticorpos IgG anti-oxLDL foram avaliados em diferentes diluições (1/10, 1/20 e 1/80) nos soros dos camundongos controles e esplenectomizados para avaliar o impacto da esplenectomia no desenvolvimento de uma resposta humoral específica para a LDL oxidada nestes animais.

A Figura 8 mostra que camundongos deficientes em apoE esplenectomizados tiveram um pequeno declínio dos títulos séricos de anticorpos IgG anti-oxLDL nas três diluições avaliadas quando comparados aos controles, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa. Estes dados sugerem que a esplenectomia não induz mudanças significativas na imunidade humoral específica para a LDL oxidada de camundongos deficientes em apoE submetidos à dieta aterogênica.

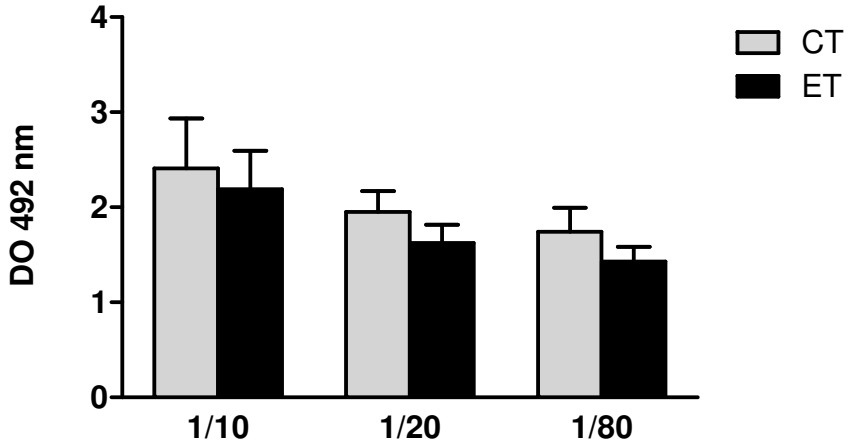


Figura 8: Títulos séricos de anticorpos IgG anti-oxLDL de camundongos deficientes em apoE controles e esplenectomizados. Anticorpos IgG anti-oxLDL foram dosados por ELISA em diferentes diluições (1/10, 1/20, 1/80). CT: Grupo Controle. ET: Grupo Esplenectomia Total. Dados expressos como média ± erro padrão.

5.4 Lesões ateroscleróticas nas porções torácica e abdominal da aorta

As lesões ateromatosas nas aortas de camundongos deficientes em apoE controles e esplenectomizados foram avaliadas para determinar o impacto da esplenectomia no processo de aterosclerose destes animais.

As placas ateromatosas nas porções torácica e abdominal das aortas dos camundongos foram detectadas utilizando o corante Sudan IV, que cora de vermelho as deposições lipídicas na parede dos vasos. A Figura 9 mostra que lesões ateroscleróticas foram identificadas tanto nos animais controles quanto nos animais esplenectomizados.

A área de lesão aterosclerótica foi determinada pela soma das medidas das deposições lipídicas coradas. O cálculo final foi expresso como porcentagem da área de lesão aterosclerótica em relação à área total do vaso. A Figura 10 mostra que os animais esplenectomizados apresentaram uma maior porcentagem de lesão aterosclerótica nas porções torácica e abdominal da aorta em relação à área total do vaso (2,30 ± 0,13 %) quando comparados aos animais controles (0,63 ± 0,03 %). Esses dados indicam que a esplenectomia está associada a um aumento de aproximadamente 265% das lesões ateroscleróticas nas porções torácica e abdominal das aortas de camundongos deficientes em apoproteína E.

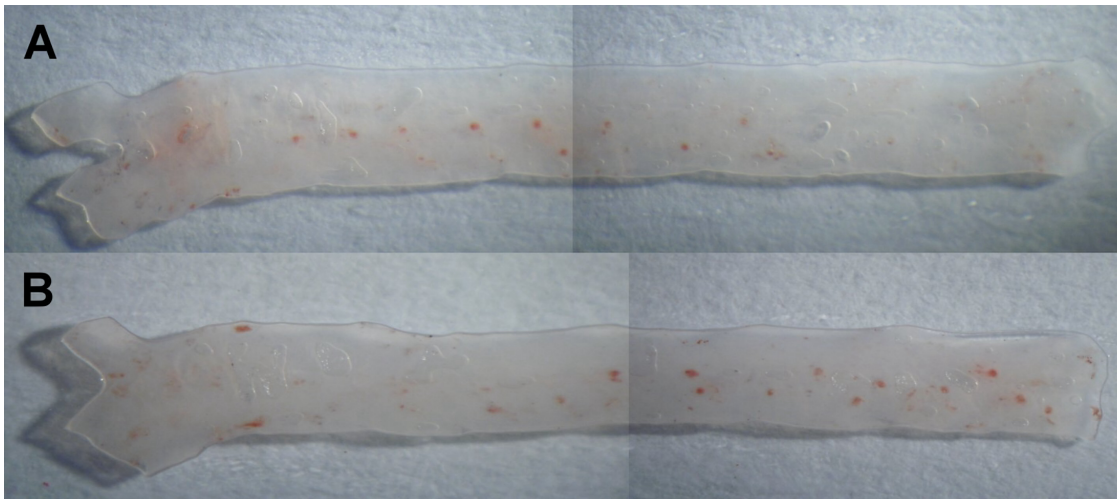


Figura 9: Lesões ateroscleróticas nas porções torácica e abdominal das aortas. Fotografias representativas de aortas de camundongos deficientes em apoE em uso de dieta aterogênica, x10. As imagens das aortas foram capturadas por uma câmera digital acoplada a um microscópio estereoscópico. As deposições lipídicas foram coradas em vermelho pelo corante Sudan IV. (A) Grupo Controle. (B) Grupo Esplenectomia Total.

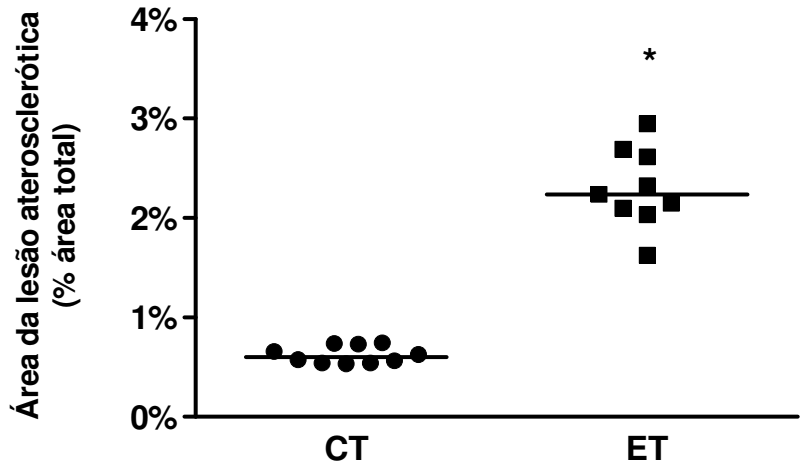


Figura 10: Efeito da esplenectomia nas lesões ateroscleróticas nas porções torácica e abdominal das aortas de camundongos deficientes em apoE. Os dados representam a porcentagem da área de lesão aterosclerótica em relação à área total do vaso. CT: Grupo Controle (n=10). ET: Grupo Esplenectomia Total (n=9). As barras representam as medianas. *p < 0,01 em relação ao grupo CT.

5.5 Lesões ateroscleróticas na raiz da aorta

As lesões ateroscleróticas também foram avaliadas na raiz da aorta de camundongos deficientes em apoE controles e esplenectomizados. Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina foram examinados com o objetivo de localizar as estruturas anatômicas referenciais da válvula aórtica na raiz da aorta. A partir desse ponto, o primeiro de cada três cortes consecutivos foi selecionado para análise morfométrica da lesão, totalizando dez cortes histológicos por animal e amostrando uma extensão média de 250-300 µm.

A Figura 11 mostra a presença de lesões ateroscleróticas na raiz da aorta, em nível das cúspides da valva aórtica, tanto em animais controles quanto em animais esplenectomizados.

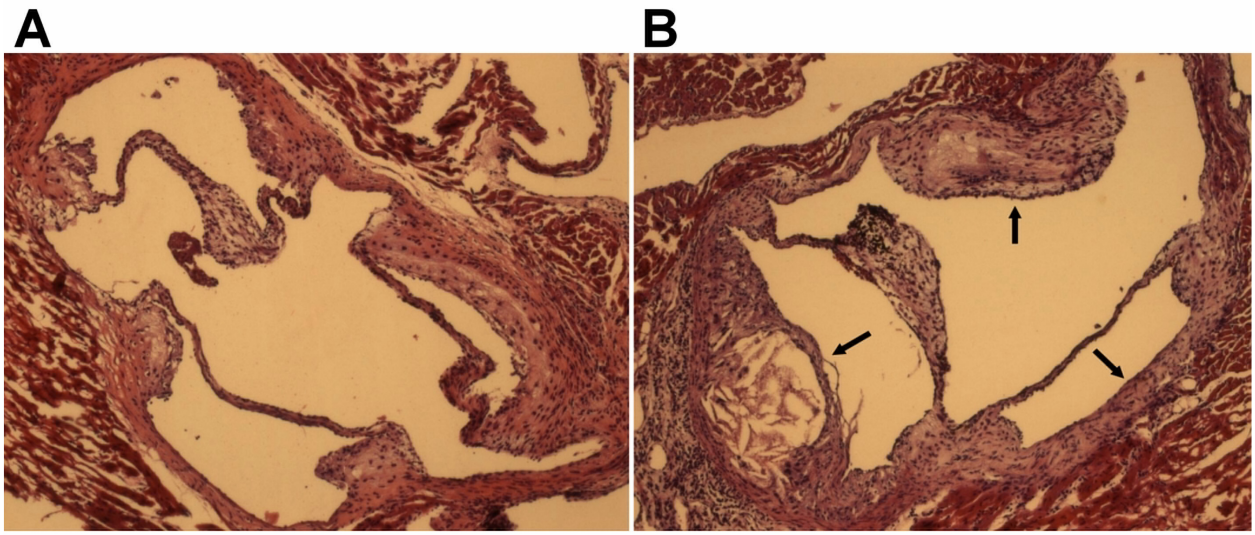


Figura 11: Lesões ateroscleróticas na raiz das aortas. Fotografias representativas de cortes corados com hematoxilina-eosina da raiz das aortas, em nível das cúspides da valva aórtica, de camundongos deficientes em apoE em uso de dieta aterogênica, x100. As imagens foram capturadas por uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico. (A) Grupo Controle. (B) Grupo Esplenectomia Total. As setas indicam a maior exuberância das lesões ateroscleróticas em nível das cúspides da valva aórtica no grupo esplenectomizado.

O cálculo da lesão média por animal foi feito somando-se as medidas das lesões dos dez cortes selecionados. A Figura 12 mostra que, em comparação com o grupo controle (1487 ± 17 μm^2 x 1000), a área da lesão aterosclerótica na raiz da aorta foi maior nos animais do grupo esplenectomia total (2317 ± 49 μm^2 x 1000).

Esses dados indicam que a esplenectomia está associada a um aumento de aproximadamente 56% da área da lesão aterosclerótica na raiz da aorta de camundongos deficientes em apoproteína E. Estes resultados confirmam o resultado anterior, que evidenciou uma maior porcentagem de lesões ateroscleróticas nas porções torácica e abdominal da aorta de animais esplenectomizados, e sugerem, em conjunto, que a esplenectomia está associada ao aumento das lesões ateroscleróticas em camundongos deficientes em apoE submetidos à dieta aterogênica.

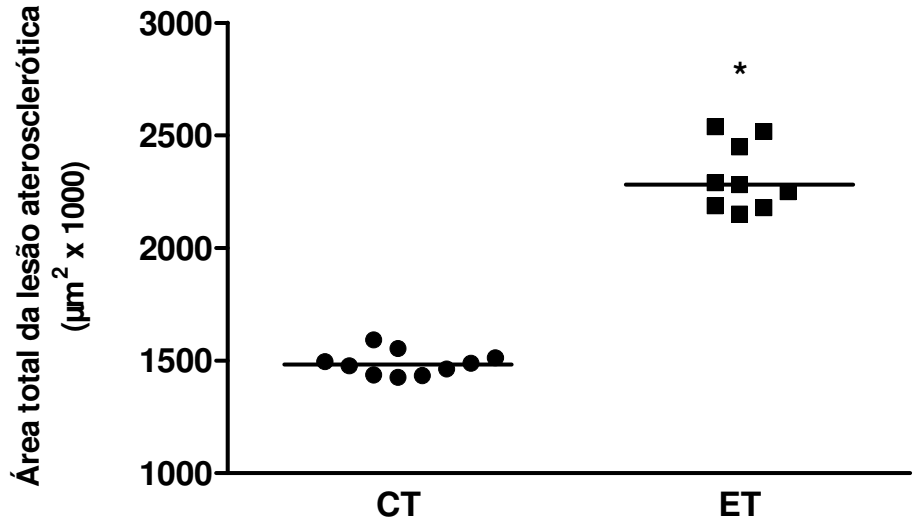


Figura 12: Efeito da esplenectomia nas lesões ateroscleróticas na raiz das aortas de camundongos deficientes em apoE. Os dados representam a área total (μm^2 x 1000) da lesão aterosclerótica na raiz da aorta (soma das medidas das lesões dos dez cortes selecionados). CT: Grupo Controle (n=10). ET: Grupo Esplenectomia Total (n=9). As barras representam as medianas. *p < 0,01 em relação ao grupo CT.

6 DISCUSSÃO

Atualmente a função imunológica do baço já é reconhecida, assim como sua participação na homeostase do compartimento sanguíneo, promovendo a remoção de células e partículas da circulação (MEBIUS e KRAAL, 2005; WLUKA e OLSZEWSKI, 2006; PEROBELLI et al., 2011). Alterações imunológicas e hematológicas importantes, além de graves complicações infecciosas, já foram descritas após a retirada do tecido esplênico (SIPKA et al., 2006; CRARY e BUCHANAN, 2009; FERNANDES et al., 2010). Apesar disso, a incidência de esplenectomias totais ainda é alta. O impacto da esplenectomia em diferentes funções orgânicas ainda não é conhecido por muitos profissionais. Além disso, as diferentes técnicas de conservação do tecido esplênico ainda não são amplamente realizadas (NUNES et al., 2005; PETROIANU, TEIXEIRA e DE ALENCAR, 2009).

O presente estudo mostrou que a esplenectomia não altera os níveis circulantes de colesterol total e não promove um declínio significativo dos títulos séricos de IgG anti-LDL oxidada de camundongos deficientes em apoE submetidos à dieta aterogênica. Entretanto, a esplenectomia está associada ao aumento das lesões ateroscleróticas na aorta destes animais, nas porções torácica e abdominal, assim como na raiz aórtica, no coração.

Estudos prévios já haviam sugerido uma relação entre o tecido esplênico e a aterosclerose. Asai e colaboradores (1988) mostraram um aumento das lesões ateroscleróticas nas porções torácica e abdominal das aortas de coelhos esplenectomizados, submetidos à dieta enriquecida com 1% de colesterol. O grupo esplenectomizado apresentou aproximadamente 27% da área total do vaso acometida pelas placas ateroscleróticas, quase o dobro do valor observado no grupo controle (aproximadamente 14%). Entretanto, devido a grandes variações individuais, esta diferença não foi significativa (ASAI et al., 1988). Posteriormente, Caligiuri e colaboradores (2002) descreveram que camundongos deficientes em apoE, em uso de dieta enriquecida com 0,15% de colesterol, apresentaram uma área significativamente maior de lesão aterosclerótica na raiz da aorta, aproximadamente o dobro da observada nos animais controles. Entretanto, o presente estudo foi o primeiro que evidenciou, em um modelo experimental de dislipidemia e aterosclerose,

que a esplenectomia está associada ao aumento das lesões ateroscleróticas tanto na porção torácica e abdominal da aorta, quanto na raiz aórtica.

Uma das principais justificativas para a participação do tecido esplênico no desenvolvimento da aterosclerose seria a alteração nos níveis circulantes de lipoproteínas observada após a esplenectomia (JAMEL et al., 2002; PETRIANU et al., 2006; SIMÕES et al., 2007). As alterações nos níveis séricos de lipoproteínas, também conhecidas como dislipidemias, estão diretamente associadas ao desenvolvimento e progressão da doença aterosclerótica (ALBERTI, ZIMMET e SHAW, 2005; LLOYD-JONES, 2010). Akan e colaboradores (2008) mostraram, recentemente, um aumento de todas as lipoproteínas circulantes, incluindo a HDL-colesterol, em ratos Wistar esplenectomizados e submetidos à dieta enriquecida com 1% de colesterol. Por outro lado, Petroianu e colaboradores (2008) também utilizaram ratos Wistar para avaliar os efeitos da esplenectomia e de algumas técnicas de conservação do tecido esplênico no perfil lipídico, e obtiveram resultados diferentes do estudo anterior. Foi observado aumento do colesterol total e do LDL-colesterol nos animais esplenectomizados, associado a redução do HDL-colesterol, enquanto os níveis de VLDL-colesterol e de triglicérides não foram diferentes do grupo controle (PETROIANU et al., 2008). No presente trabalho, os níveis de colesterol total de camundongos deficientes em apoE submetidos à dieta aterogênica, enriquecida com 0,15% de colesterol, não foram alterados pela esplenectomia. Esta diferença nos resultados encontrados pode estar associada à utilização de modelos experimentais distintos. Todavia, nossos dados coincidem com os resultados de um estudo anterior que utilizou o mesmo modelo experimental, camundongos deficientes em apoE, e dieta aterogênica com o mesmo teor de colesterol, e que também evidenciou que os níveis séricos de colesterol total não foram alterados pela esplenectomia (CALIGIURI et al., 2002). É importante ressaltar que camundongos deficientes em apoE são considerados um modelo experimental adequado para avaliação de hiperlipidemia e aterosclerose (MEIR e LEITERSDORF, 2004; HANSSON e HERMANSSON, 2011). Além disso, se considerarmos que todos os trabalhos citados que descreveram mudanças nos níveis circulantes de lipoproteínas após a esplenectomia sempre evidenciaram modificações nos níveis séricos de colesterol total, a não alteração deste parâmetro do perfil lipídico sugere que as demais lipoproteínas também não foram modificadas (AVIRAM et al., 1986; ASAI et al., 1988; PAULO e SILVA, 2001; JAMEL et al., 2002; PAULO et al., 2005;

PETROIANU et al., 2006; SIMÕES et al., 2007; AKAN et al. 2008; PETROIANU et al., 2008). Portanto, nossos resultados indicam que a participação do tecido esplênico no processo de aterosclerose pode ser mais abrangente que a simples modulação dos níveis circulantes de lipoproteínas.

A resposta inata tem uma importante participação no desenvolvimento e progressão da aterosclerose, assim como a resposta celular, subtipo Th1, já associada a um papel pró-aterogênico em vários trabalhos (PORTUGAL, FERNANDES e ALVAREZ-LEITE, 2009; ANDERSSON, LIBBY e HANSSON, 2010; LUNDBERG e HANSSON, 2010). Macrófagos e linfócitos T subtipo Th1 já foram identificados em vários estágios da lesão, desde a disfunção endotelial até a ruptura da placa (YAN e HANSSON, 2007; DUEWELL et al., 2010; HERMANSSON et al., 2010). O baço abriga 25% dos linfócitos do organismo e desempenha um papel importante na homeostase do sistema imunológico (CALIGIURI et al., 2002; WITZTUM, 2002). Estudos prévios mostraram que a esplenectomia influencia na fagocitose e atividade bactericida de células de Kupffer, macrófagos peritoneais e macrófagos alveolares, sugerindo que o tecido esplênico é capaz de modular a função de células imunológicas em diferentes compartimentos do organismo (SHIH-CHING et al., 2004; KONO et al., 2011). Portanto, a participação do tecido esplênico no processo de aterosclerose pode estar associada à influência do baço na migração, proliferação e ativação de células como macrófagos e linfócitos T.

Além disso, o tecido esplênico abriga a maior reserva corporal de células B, incluindo linfócitos B de memória, e desempenha um papel importante na maturação destas células (WITZTUM, 2002). As células B têm sido associadas a um papel antiaterogênico. Caligiuri e colaboradores, em 2002, descreveram que a transferência adotiva de células B esplênicas provenientes de camundongos deficientes em apoE com doença aterosclerótica reduziu as lesões de aterosclerose na raiz da aorta de camundongos esplenectomizados. O mesmo foi observado em camundongos submetidos à operação simulada, porém neste grupo o impacto da transferência foi menor. Estes resultados evidenciaram um efeito protetor das células B, mas também a relação destas células com o tecido esplênico (CALIGIURI et al., 2002). Major, Fazio e Linton (2002) avaliaram o efeito de uma deficiência total e específica de células B na aterogênese, e também demonstraram um papel protetor destas células durante o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em camundongos deficientes no receptor de LDL. A deficiência de células B foi

prejudicial tanto para as lesões iniciais, as estrias gordurosas, bem como para as lesões mais avançadas na aorta proximal dos animais (MAJOR, FAZIO e LINTON, 2002). Nos dois estudos relatados, o efeito antiaterogênico das células B foi observado sem alterações significativas dos níveis séricos de colesterol que justificassem as diferenças observadas entre os grupos de animais experimentais e controles.

Um dos possíveis mecanismos de participação das células B e do tecido esplênico no processo de aterosclerose seria através da produção de anticorpos anti-oxLDL. O baço é o principal local de produção de anticorpos contra antígenos circulantes como a LDL oxidada (CALIGIURI et al., 2002). A teoria oxidativa sugere que o processo aterosclerótico pode ser iniciado por danos no endotélio vascular, produzidos pelo depósito da LDL oxidada (STOCKER e KEANEY, 2004; STEINBERG, 2009). A produção de anticorpos anti-oxLDL poderia alterar o depósito desta macromolécula no endotélio vascular e consequentemente influenciar o desenvolvimento e progressão da aterosclerose (MATSUURA, HUGHES e KHAMASHTA, 2008; VAN LEEUWEN et al., 2009).

Trabalhos experimentais têm mostrado que anticorpos anti-oxLDL teriam um efeito ateroprotetor. A infusão de anticorpos IgG1 anti-LDL reduziu a extensão da aterosclerose nas aortas de camundongos deficientes em apoE submetidos à dieta enriquecida com 0,15% de colesterol (SCHIOPU et al., 2004). Em adição, a deficiência de IgM sérica aumentou a extensão e a complexidade das lesões ateroscleróticas na raiz da aorta de camundongos deficientes em receptores de LDL, submetidos a dietas com baixo e alto teor de gorduras. Nestes animais, a formação de cristais de colesterol foi acelerada e houve um aumento de células musculares lisas nas lesões da aorta (LEWIS et al., 2009). Estes trabalhos sugerem que, em modelos experimentais, os anticorpos anti-oxLDL, tanto IgG quanto IgM, são protetores na aterosclerose.

Entretanto, em humanos, os resultados são bastante conflitantes, com estudos mostrando que não há associação entre os níveis de anticorpos anti-oxLDL e o desenvolvimento e progressão da aterosclerose, e trabalhos evidenciando correlações tanto positivas quanto negativas (SHOENFELD et al., 2004; HANSSON e HERMANSSON, 2011). Um estudo realizado com jovens do sexo masculino portadores de doença arterial coronariana, relacionou os títulos de anticorpos contra a LDL modificada com os achados angiográficos e o prognóstico destes pacientes

durante 11 anos de acompanhamento. Nenhuma associação consistente foi encontrada entre os títulos de anticorpos anti-LDL e a gravidade global ou o prognóstico da doença aterosclerótica coronariana (TORNVALL et al., 2003). Por outro lado, Tsimikas e colaboradores (2007) avaliaram, de forma semelhante, a relação entre anticorpos anti-oxLDL e a doença arterial coronariana, e evidenciaram que a IgG e a IgM anti-oxLDL apresentavam relações divergentes com o processo de aterosclerose. Enquanto a IgM foi inversamente associada à presença da doença coronariana na angiografia, a IgG mostrou uma correlação positiva com as lesões ateroscleróticas (TSIMIKAS et al., 2007). Soto e colaboradores (2009) também descreveram uma relação inversa entre os níveis séricos de IgM anti-oxLDL e a presença de aterosclerose, ao avaliarem pacientes portadores de doença coronariana e voluntários saudáveis.

Em adição, o efeito protetor ou patogênico dos anticorpos anti-oxLDL poderia estar, segundo alguns autores, relacionado não apenas com a classe, mas também com a subclasse dos mesmos. A IgG3 fixa melhor o complemento e adere a receptores Fc com maior avidez e estaria associada a um maior potencial patogênico na aterosclerose que a IgG2, por exemplo (WU e LEFVERT, 1995; SHOENFELD et al., 2004). Outros trabalhos têm mostrado que o efeito benéfico ou prejudicial dos anticorpos anti-oxLDL seria regulado por anticorpos anti-idiotípicos. A imunoglobulina intravenosa humana de diferentes laboratórios contém tanto anticorpos anti-oxLDL quanto anticorpos anti-idiotípicos contra eles (KRAUSE et al., 2002; WU et al., 2003). Entretanto, as diferenças entre classes e subclasses de anticorpos anti-oxLDL, assim como o papel de anticorpos anti-idiotípicos no processo de aterosclerose, ainda não foram esclarecidos.

Nossos dados mostraram que, em camundongos deficientes em apoE submetidos à dieta aterogênica, não há alteração nos títulos séricos de anticorpos IgG anti-oxLDL após a esplenectomia em nenhuma das diluições avaliadas, e sugerem que a participação do tecido esplênico na aterosclerose está muito além da produção de anticorpos específicos para a LDL oxidada.

As células B podem regular a resposta imunológica em outras patologias inflamatórias tais como a colite ulcerativa e o diabetes mellitus tipo 1, por mecanismos independentes da produção de anticorpos (TIAN et al., 2001; MIZOGUCHI et al., 2002). As células B são importantes para diferenciação de células T CD4+ provenientes de populações periféricas em células T regulatórias

(CD4+CD25+) (NGO, CORNALL e CYSTER, 2001; SUTO et al., 2002). As células T regulatórias são capazes de modular a inflamação e auxiliar no controle de doenças inflamatórias como a aterosclerose. Mor e colaboradores (2007) descreveram que camundongos deficientes em apoE com doença aterosclerótica possuem, em relação aos controles, um número reduzido de células T regulatórias e um comprometimento da capacidade supressiva destas células. Além disso, camundongos deficientes em apoE tratados por via oral com anti-CD3 apresentaram um aumento de células T regulatórias (CD25+ Foxp3+) na população de linfócitos T CD4+, o que foi associado a uma redução das lesões ateroscleróticas na raiz da aorta e do acúmulo de macrófagos e células T nas placas destes animais (SASAKI et al., 2009). Major, Fazio e Linton (2002) sugeriram que as células B podem não ter um efeito local direto nas lesões ateroscleróticas na parede das artérias. Porém, na ausência de células B, um subconjunto de células regulatórias que modulam a resposta inflamatória na lesão ou inibem a migração de linfócitos para as placas não é ativado na periferia. É fundamental ressaltar que o baço é o maior reservatório corporal de células B, mas também abriga células T regulatórias, e é um local de diferenciação e proliferação destas células (CALIGIURI et al., 2002; PRE et al., 2011). Camundongos deficientes em apoE esplenectomizados exibiram um aumento do número de células T CD4+ nas lesões arteriais; esta concentração diminuiu para os níveis dos animais controle após a transferência de células B do baço (CALIGIURI et al., 2002).

Em adição, o baço poderia exercer um papel imunomodulador no desenvolvimento da aterosclerose por contribuir para um equilíbrio entre os padrões Th1 e Th2 da imunidade. O tecido esplênico está associado classicamente à presença de células B e à produção de anticorpos, ou seja, ao desenvolvimento de respostas tipo Th2 (WITZTUM, 2002; TEIXEIRA et al., 2008). A elaboração de uma resposta Th2 acaba inibindo as vias da resposta Th1, seja pelas citocinas secretadas ou por outros mecanismos. Citocinas secretadas por células Th1 como a IL-12, o IFN-γ e o TNF-α são pró-inflamatórias e promovem o desenvolvimento e progressão da doença aterosclerótica, ao passo que citocinas do perfil Th2, como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, são consideradas ateroprotetoras e podem neutralizar a produção e a atividade de citocinas Th1 (CALCAGNI e ELENKOV, 2006; KLEEMANN, ZADELAAR e KOOISTRA, 2008). A IL-12 é produzida por vários tipos de células inflamatórias presentes nas lesões ateroscleróticas, incluindo os

macrófagos. Sua produção no início da resposta inflamatória vascular é um estímulo à diferenciação de células Th1 (TRINCHIERI, 2003; AIT-OUFELLA et al., 2011). O bloqueio funcional da IL-12 endógena, por autoanticorpos anti-IL-12 induzidos por vacinação, resultou em uma redução significativa de 68,5% nas lesões ateromatosas das artérias carótidas de camundongos deficientes nos receptores de LDL submetidos a uma dieta aterogênica, além de melhorar o grau de estabilidade das placas (HAUER et al., 2005). De forma semelhante, o bloqueio do IFN-γ pela administração de uma proteína inibitória, que funciona como um receptor solúvel de interferon (sIFNγR), não só impediu a progressão das placas ateroscleróticas nas aortas, como também estabilizou placas avançadas de camundongos deficientes em apoproteína E em uso de dieta enriquecida com 0,15% de colesterol (KOGA et al., 2007). Por outro lado, a IL-10 é produzida por uma variedade de células do sistema imunológico, inclusive células Th2, e pode inibir uma ampla variedade de respostas imunológicas e inflamatórias. Devido à sua propriedade anti-inflamatória, a IL-10 é considerada uma citocina com potencial antiaterogênico (LIU et al., 2006; KLEEMANN, ZADELAAR e KOOISTRA, 2008). A terapia gênica com IL-10 reduziu significativamente a área das placas ateroscleróticas e o infiltrado de macrófagos nas lesões de camundongos deficientes em apoE submetidos a uma dieta enriquecida com colesterol. Estas reduções foram associadas ao aumento dos níveis plasmáticos de IL-10 e à diminuição de citocinas Th1, como a IL-12 e o IFN-γ, na ausência de alterações dos níveis circulantes de colesterol (NAMIKI et al., 2004). Em adição, um estudo recente evidenciou que crianças portadoras de hipercolesterolemia familiar, quando comparadas com os controles saudáveis, possuem níveis séricos diminuídos de IL-10 em associação com níveis séricos aumentados de TNF-α, e sugeriu que estas alterações contribuem para o estado pró-inflamatório e para o processo de aterosclerose acelerado característicos destas crianças (NARVERUD et al., 2011).

Alguns trabalhos têm sugerido que a aterosclerose é uma doença inflamatória impulsionada por um desequilíbrio na diferenciação de células T CD4+ em direção ao perfil Th1, com diminuição dos linfócitos Th2 (BENAGIANO et al., 2003; MILLER et al., 2008). Em uma série de doenças autoimunes inflamatórias, tais como a doença de Crohn, a artrite reumatoide e a aterosclerose, as células Th1 predominam sobre as células Th2, o que leva a um excesso de citocinas pró-inflamatórias, que

regulam a imunidade mediada por células e podem ativar macrófagos, fenômeno crucial no desenvolvimento e progressão da aterosclerose (KOSIEWICZ et al., 2001; HAUER et al., 2005). Estudos sobre a encefalomielite autoimune experimental têm mostrado que a tendência a uma resposta Th2 pode proteger contra a patologia ao estimular vias inibitórias da resposta Th1, diretamente associada à patogênese da doença (SAOUDI et al., 1995). Durante a aterosclerose, as células Th2 são menos abundantes e a produção de citocinas anti-inflamatórias e ateroprotetoras como a IL-10 é muito baixa para prevenir a formação da placa (HAUER et al., 2005; AIT-OUFELLA et al., 2011). Camundongos deficientes em apoE tratados diariamente com pentoxifilina (PTX), um conhecido inibidor da diferenciação Th1, exibiram uma redução de 60% no tamanho das lesões ateroscleróticas na raiz da aorta (LAURAT et al., 2001). Além disso, os animais tratados com PTX desenvolveram lesões que ficaram limitadas ao grau de estrias gordurosas, enquanto os camundongos controle desenvolveram lesões ateroscleróticas mais avançadas. Ou seja, a PTX protegeu os camundongos da aterosclerose, reduzindo a polarização de linfócitos T para o perfil Th1(LAURAT et al., 2001). Em adição, camundongos deficientes em apoproteína E, em uso de dieta enriquecida com 0,15% de colesterol, tratados com IL-33 recombinante, tiveram uma redução importante das lesões ateroscleróticas na raiz da aorta em comparação aos animais controles (MILLER et al., 2008). A IL-33 é uma citocina recentemente descrita, pertencente à superfamília da IL-1, que induz a produção de citocinas Th2. A redução das lesões ateroscleróticas observada por Miller e colaboradores foi associada a um aumento acentuado dos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13, e à diminuição dos níveis de IFN-γ no soro e nos linfonodos dos animais, o que é consistente com a mudança de perfil de Th1 para Th2. Por outro lado, neste mesmo trabalho, camundongos tratados com ST2 solúvel, um receptor não funcional da IL-33 que neutraliza esta citocina, desenvolveram placas ateroscleróticas significativamente maiores na raiz da aorta. Em conclusão, a IL-33 pode desempenhar um papel protetor no desenvolvimento da aterosclerose por induzir preferencialmente a produção de citocinas como a IL-5 e a IL-13, contribuindo para direcionamento da resposta imunológica para o perfil Th2 (MILLER et al., 2008). Portanto, é possível que a ausência do tecido esplênico prejudique as respostas Th2 e o equilíbrio entre os dois padrões de imunidade, favorecendo as respostas Th1 e contribuindo para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose.

Apesar das várias hipóteses discutidas para justificar a associação do tecido esplênico com a aterosclerose, os trabalhos que avaliam o papel do baço nesta patologia ainda são raros e os mecanismos pelos quais o tecido esplênico influencia no desenvolvimento e progressão da aterosclerose ainda não estão estabelecidos. O presente trabalho mostrou que a esplenectomia está associada ao aumento das lesões ateroscleróticas em camundongos deficientes em apoE submetidos à dieta aterogênica, tanto nas porções torácica e abdominal da aorta, quanto na raiz aórtica. Esses resultados reforçam a participação do baço no processo de aterosclerose e destacam a necessidade de que mais estudos sejam realizados para esclarecer pontos ainda controversos do mecanismo desta patologia, como a importância do perfil Th2 e das células B.

Além disso, se considerarmos que as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte em muitos países, respondendo por 16,7 milhões de óbitos a cada ano (DAHLOF, 2010; LLOYD-JONES, 2010), e que os pacientes esplenectomizados seriam mais susceptíveis a aterosclerose e a estas patologias, o presente trabalho também reforça a necessidade de uma conduta mais conservadora na condução das diferentes afecções e lesões que acometem o baço, visando sempre à preservação do tecido esplênico. É necessária uma ampla conscientização dos profissionais de saúde a este respeito, além de uma maior difusão e aplicação das técnicas cirúrgicas que preservam o baço integral ou parcialmente.

7 CONCLUSÃO

A esplenectomia está associada ao aumento das lesões ateroscleróticas nas aortas de camundongos deficientes em apoproteína E submetidos à dieta aterogênica, sugerindo que o baço participa do processo de aterosclerose destes animais e que desempenha um papel ateroprotetor no modelo estudado.

A participação do tecido esplênico na aterogênese de camundongos deficientes em apoproteína E não está associada a alterações nos níveis séricos de colesterol total ou ao desenvolvimento de uma resposta humoral específica contra a LDL oxidada, e pode estar relacionada a outros mecanismos imunológicos como o desequilíbrio entre os perfis Th1 e Th2 da imunidade.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Introdução ao sistema imunológico. In: ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Básica. Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009, p. 1-22.

ABRANTES, W.L.; SILVA, R.C.O.; RIANI, E.B.; FREITAS, M.A.M. Preservação do baço na pancreatectomia distal por trauma. **Rev Col Bras Cir**, v. 29, n. 2, p. 83-87, 2002.

AIT-OUFELLA, H.; HERBIN, O.; BOUAZIZ, J. D.; BINDER, C. J.; UYTTENHOVE, C.; LAURANS, L.; TALEB, S.; VAN VRE, E.; ESPOSITO, B.; VILAR, J.; SIRVENT, J.; VAN SNICK, J.; TEDGUI, A.; TEDDER, T. F.; MALLAT, Z. B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice. **J Exp Med,** v. 207, n. 8, p. 1579-1587, 2010.

AIT-OUFELLA, H.; SALOMON, B. L.; POTTEAUX, S.; ROBERTSON, A. K.; GOURDY, P.; ZOLL, J.; MERVAL, R.; ESPOSITO, B.; COHEN, J. L.; FISSON, S.; FLAVELL, R. A.; HANSSON, G. K.; KLATZMANN, D.; TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. **Nat Med,** v. 12, n. 2, p. 178-180, 2006.

AIT-OUFELLA, H.; TALEB, S.; MALLAT, Z.; TEDGUI, A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol,** v. 31, n. 5, p. 969-979, 2011.

AKAN, A. A.; SENGUL, N.; SIMSEK, S.; DEMIRER, S. The effects of splenectomy and splenic autotransplantation on plasma lipid levels. **J Invest Surg,** v. 21, n. 6, p. 369-372, 2008.

ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P.; SHAW, J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. **Lancet,** v. 366, n. 9491, p. 1059-1062, 2005.

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

ALVAREZ-LEITE, J.I. Lipoproteínas e transporte de lipídios no organismo. In: VIEIRA E.C.; FIGUEIREDO E.A.; ALVAREZ-LEITE, J.I.; GOMEZ, M.V. **Química Fisiológica**. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 1995, p. 17-31.

ANDERSSON, J.; LIBBY, P.; HANSSON, G. K. Adaptive immunity and atherosclerosis. **Clin Immunol,** v. 134, n. 1, p. 33-46, 2010.

ANTUNES, L.J. Generalidades sobre imunologia e baço. In: PETROIANU, A. **O Baço**. 1ª ed. São Paulo: CRL Balieiro, 2003. p. 43-48.

ASAI, K.; KUZUYA, M.; NAITO, M.; FUNAKI, C.; KUZUYA, F. Effects of splenectomy on serum lipids and experimental atherosclerosis. **Angiology,** v. 39, n. 6, p. 497-504, 1988.

AVENDAÑO H., R. Traumatismo esplênico. **Cuad Cir**, v. 11, n.1, p. 71-78, 1997.

AVIRAM, M.; BROOK, J. G.; TATARSKY, I.; LEVY, Y.; CARTER, A. Increased low-density lipoprotein levels after splenectomy: a role for the spleen in cholesterol metabolism in myeloproliferative disorders. **Am J Med Sci,** v. 291, n. 1, p. 25-28, 1986.

BENAGIANO, M.; AZZURRI, A.; CIERVO, A.; AMEDEI, A.; TAMBURINI, C.; FERRARI, M.; TELFORD, J. L.; BALDARI, C. T.; ROMAGNANI, S.; CASSONE, A.; D'ELIOS, M. M.; DEL PRETE, G. T helper type 1 lymphocytes drive inflammation in human atherosclerotic lesions. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 100, n. 11, p. 6658-6663, 2003.

BERLINER, J. A.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A. M.; FRANK, J. S.; DEMER, L. L.; EDWARDS, P. A.; WATSON, A. D.; LUSIS, A. J. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. **Circulation,** v. 91, n. 9, p. 2488-2496, 1995.

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

BRANDÃO, A.A.; MAGALHÃES, M.E.C.; FREITAS, E.V.; POZZAN, R.; BRANDÃO, A.P. Prevenção da doença cardiovascular: a aterosclerose se inicia na infância? **Rev SOCERJ**, v. 17, n. 1, p. 37-44, 2004.

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

BUNTAIN, W. L.; GOULD, H. R. Splenic trauma in children and techniques of splenic salvage. **World J Surg,** v. 9, n. 3, p. 398-409, 1985.

BUYUKUNAL, C.; DANISMEND, N.; YEKER, D. Spleen-saving procedures in paediatric splenic trauma. **Br J Surg,** v. 74, n. 5, p. 350-352, 1987.

CALCAGNI, E.; ELENKOV, I. Stress system activity, innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune-related diseases. **Ann N Y Acad Sci,** v. 1069, p. 62-76, 2006.

CALIGIURI, G.; NICOLETTI, A.; POIRIER, B.; HANSSON, G. K. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. **J Clin Invest,** v. 109, n. 6, p. 745-753, 2002.

CAMPOS, M. A.; ROSINHA, G. M.; ALMEIDA, I. C.; SALGUEIRO, X. S.; JARVIS, B. W.; SPLITTER, G. A.; QURESHI, N.; BRUNA-ROMERO, O.; GAZZINELLI, R. T.; OLIVEIRA, S. C. Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to Brucella abortus infection in mice. **Infect Immun,** v. 72, n. 1, p. 176-186, 2004.

CARMELIET, P. Proteinases in cardiovascular aneurysms and rupture: targets for therapy? **J Clin Invest,** v. 105, n. 11, p. 1519-1520, 2000.

CHANG, Y. H.; ABDALLA, D. S.; SEVANIAN, A. Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein. **Free Radic Biol Med,** v. 23, n. 2, p. 202-214, 1997.

CHEN, M.; MASAKI, T.; SAWAMURA, T. LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. **Pharmacol Ther,** v. 95, n. 1, p. 89-100, 2002.

CHRISTO, M.C. Baço, cirurgia e história. **Rev Med Minas Gerais**, v. 11, n. 4, p. 251-254, 2001.

CHUNG, B. H.; SEGREST, J. P.; RAY, M. J.; BRUNZELL, J. D.; HOKANSON, J. E.; KRAUSS, R. M.; BEAUDRIE, K.; CONE, J. T. Single vertical spin density gradient ultracentrifugation. **Methods Enzymol,** v. 128, p. 181-209, 1986.

COBBE, S. M.; SHEPHERD, J. Cholesterol reduction in the prevention of coronary heart disease: therapeutic rationale and guidelines. The British Hyperlipidaemia Association. **Br Heart J,** v. 69, n. 1 Suppl, p. S63-69, 1993.

CRARY, S. E.; BUCHANAN, G. R. Vascular complications after splenectomy for hematologic disorders. **Blood,** v. 114, n. 14, p. 2861-2868, 2009.

DAHLOF, B. Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment. **Am J Cardiol,** v. 105, n. 1 Suppl, p. 3A-9A, 2010.

DAVIES, M. J.; RICHARDSON, P. D.; WOOLF, N.; KATZ, D. R.; MANN, J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. **Br Heart J,** v. 69, n. 5, p. 377-381, 1993.

DE SILVA, H. V.; MAS-OLIVA, J.; TAYLOR, J. M.; MAHLEY, R. W. Identification of apolipoprotein B-100 low density lipoproteins, apolipoprotein B-48 remnants, and apolipoprotein E-rich high density lipoproteins in the mouse. **J Lipid Res,** v. 35, n. 7, p. 1297-1310, 1994.

DUEWELL, P.; KONO, H.; RAYNER, K. J.; SIROIS, C. M.; VLADIMER, G.; BAUERNFEIND, F. G.; ABELA, G. S.; FRANCHI, L.; NUNEZ, G.; SCHNURR, M.; ESPEVIK, T.; LIEN, E.; FITZGERALD, K. A.; ROCK, K. L.; MOORE, K. J.; WRIGHT, S. D.; HORNUNG, V.; LATZ, E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. **Nature,** v. 464, n. 7293, p. 1357-1361, 2010.

EINHORN, D.; REAVEN, G. M.; COBIN, R. H.; FORD, E.; GANDA, O. P.; HANDELSMAN, Y.; HELLMAN, R.; JELLINGER, P. S.; KENDALL, D.; KRAUSS, R. M.; NEUFELD, N. D.; PETAK, S. M.; RODBARD, H. W.; SEIBEL, J. A.; SMITH, D. A.; WILSON, P. W. American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. **Endocr Pract,** v. 9, n. 3, p. 237-252, 2003.

FATOUROS, M.; BOURANTAS, K.; BAIRAKTARI, E.; ELISAF, M.; TSOLAS, O.; CASSIOUMIS, D. Role of the spleen in lipid metabolism. **Br J Surg,** v. 82, n. 12, p. 1675-1677, 1995.

FAZIO, S.; BABAEV, V. R.; MURRAY, A. B.; HASTY, A. H.; CARTER, K. J.; GLEAVES, L. A.; ATKINSON, J. B.; LINTON, M. F. Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 94, n. 9, p. 4647-4652, 1997.

FAZIO, S.; LINTON, M. F. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. **Front Biosci,** v. 6, p. D515-525, 2001.

FERNANDES, B. F.; REZENDE, A. B.; ALVES, C. C.; TEIXEIRA, F. M.; FARIAS, R. E.; FERREIRA, A. P.; TEIXEIRA, H. C. Splenic autotransplantation restores IL-17 production and antibody response to Streptococcus pneumoniae in splenectomized mice. **Transpl Immunol,** v. 22, n. 3-4, p. 195-197, 2010.

FIELDING, C.J. Lipoprotein synthesis, transport, and metabolism. In: STIPANUK, M.H. **Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition**. 1st ed. Philadelphia: Saunders Company, 2000. p. 351-364.

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

GALIS, Z. S.; SUKHOVA, G. K.; LARK, M. W.; LIBBY, P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. **J Clin Invest,** v. 94, n. 6, p. 2493-2503, 1994.

GHISELLI, G.; SCHAEFER, E. J.; GASCON, P.; BRESER, H. B., JR. Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E deficiency. **Science,** v. 214, n. 4526, p. 1239-1241, 1981.

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

GOLDBERG, I. J. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. **J Lipid Res,** v. 37, n. 4, p. 693-707, 1996.

GOTTO, A. M., JR.; POWNALL, H. J.; HAVEL, R. J. Introduction to the plasma lipoproteins. **Methods Enzymol,** v. 128, p. 3-41, 1986.

HANSSON, G. K. Cell-mediated immunity in atherosclerosis. **Curr Opin Lipidol,** v. 8, n. 5, p. 301-311, 1997.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N Engl J Med,** v. 352, n. 16, p. 1685-1695, 2005.

HANSSON, G. K.; HERMANSSON, A. The immune system in atherosclerosis. **Nat Immunol,** v. 12, n. 3, p. 204-212, 2011.

HANSSON, G. K.; ROBERTSON, A. K.; SODERBERG-NAUCLER, C. Inflammation and atherosclerosis. **Annu Rev Pathol,** v. 1, p. 297-329, 2006.

HAUER, A. D.; UYTTENHOVE, C.; DE VOS, P.; STROOBANT, V.; RENAULD, J. C.; VAN BERKEL, T. J.; VAN SNICK, J.; KUIPER, J. Blockade of interleukin-12 function by protein vaccination attenuates atherosclerosis. **Circulation,** v. 112, n. 7, p. 1054-1062, 2005.

HERMANSSON, A.; KETELHUTH, D. F.; STRODTHOFF, D.; WURM, M.; HANSSON, E. M.; NICOLETTI, A.; PAULSSON-BERNE, G.; HANSSON, G. K. Inhibition of T cell response to native low-density lipoprotein reduces atherosclerosis. **J Exp Med,** v. 207, n. 5, p. 1081-1093, 2010.

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

HORAN, M.; COLEBATCH, J. H. Relation between splenectomy and subsequent infection. A clinical study. **Arch Dis Child,** v. 37, p. 398-414, 1962.

JAMEL, M.J.; REFINETI, R.A.; SILVA, M.M.; MACIEL, A.C.C.; MARELLI, G.B. Papel do remanescente esplênico no perfil lipídico. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, v. 15, n. 3, p. 105-107, 2002.

JIALAL, I.; DEVARAJ, S. The role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. **J Nutr,** v. 126, n. 4 Suppl, p. 1053S-1057S, 1996.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Sistema circulatório. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 204-220.

KARVONEN, J.; PAIVANSALO, M.; KESANIEMI, Y. A.; HORKKO, S. Immunoglobulin M type of autoantibodies to oxidized low-density lipoprotein has an inverse relation to carotid artery atherosclerosis. **Circulation,** v. 108, n. 17, p. 2107-2112, 2003.

KHAN, B. V.; PARTHASARATHY, S. S.; ALEXANDER, R. W.; MEDFORD, R. M. Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. **J Clin Invest,** v. 95, n. 3, p. 1262-1270, 1995.

KING, H.; SHUMACKER, H. B., JR. Splenic studies. I. Susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy. **Ann Surg,** v. 136, n. 2, p. 239-242, 1952.

KLEEMANN, R.; ZADELAAR, S.; KOOISTRA, T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. **Cardiovasc Res,** v. 79, n. 3, p. 360-376, 2008.

KOGA, M.; KAI, H.; YASUKAWA, H.; YAMAMOTO, T.; KAWAI, Y.; KATO, S.; KUSABA, K.; KAI, M.; EGASHIRA, K.; KATAOKA, Y.; IMAIZUMI, T. Inhibition of progression and stabilization of plaques by postnatal interferon-gamma function blocking in ApoE-knockout mice. **Circ Res,** v. 101, n. 4, p. 348-356, 2007.

KONO, H.; FUJII, H.; OGIKU, M.; HARA, M.; TSUCHIYA, M.; ISHII, K.; HOSOMURA, N. The Kupffer Cell Inhibition Exacerbates but Splenectomy Prevents Mortality in a Rat Septic Peritonitis Model. **J Surg Res**, 2011.

KOSIEWICZ, M. M.; NAST, C. C.; KRISHNAN, A.; RIVERA-NIEVES, J.; MOSKALUK, C. A.; MATSUMOTO, S.; KOZAIWA, K.; COMINELLI, F. Th1-type responses mediate spontaneous ileitis in a novel murine model of Crohn's disease. **J Clin Invest,** v. 107, n. 6, p. 695-702, 2001.

KRAUSE, I.; BLANK, M.; SHERER, Y.; GILBURD, B.; KVAPIL, F.; SHOENFELD, Y. Induction of oral tolerance in experimental antiphospholipid syndrome by feeding with polyclonal immunoglobulins. **Eur J Immunol,** v. 32, n. 12, p. 3414-3424, 2002.

LAURAT, E.; POIRIER, B.; TUPIN, E.; CALIGIURI, G.; HANSSON, G. K.; BARIETY, J.; NICOLETTI, A. In vivo downregulation of T helper cell 1 immune responses reduces atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. **Circulation,** v. 104, n. 2, p. 197-202, 2001.

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

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

LIBBY, P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. **Circulation,** v. 104, n. 3, p. 365-372, 2001.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature,** v. 420, n. 6917, p. 868-874, 2002.

LIU, Y.; LI, D.; CHEN, J.; XIE, J.; BANDYOPADHYAY, S.; ZHANG, D.; NEMARKOMMULA, A. R.; LIU, H.; MEHTA, J. L.; HERMONAT, P. L. Inhibition of atherogenesis in LDLR knockout mice by systemic delivery of adeno-associated virus type 2-hIL-10. **Atherosclerosis,** v. 188, n. 1, p. 19-27, 2006.

LLOYD-JONES, D. M. Cardiovascular risk prediction: basic concepts, current status, and future directions. **Circulation,** v. 121, n. 15, p. 1768-1777, 2010.

LO, J. C.; WANG, Y.; TUMANOV, A. V.; BAMJI, M.; YAO, Z.; REARDON, C. A.; GETZ, G. S.; FU, Y. X. Lymphotoxin beta receptor-dependent control of lipid homeostasis. **Science,** v. 316, n. 5822, p. 285-288, 2007.

LOPES-VIRELLA, M. F.; VIRELLA, G.; ORCHARD, T. J.; KOSKINEN, S.; EVANS, R. W.; BECKER, D. J.; FORREST, K. Y. Antibodies to oxidized LDL and LDL-containing immune complexes as risk factors for coronary artery disease in diabetes mellitus. **Clin Immunol,** v. 90, n. 2, p. 165-172, 1999.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem,** v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUNDBERG, A. M.; HANSSON, G. K. Innate immune signals in atherosclerosis. **Clin Immunol,** v. 134, n. 1, p. 5-24, 2010.

LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature,** v. 407, n. 6801, p. 233-241, 2000.

MAHLEY, R.W.; WEISGRABER, K.H.; FARESE, R.V. Disorders of lipid metabolism. In: **Williams textbook of endocrinology**. 10th edition. New York: Elservier Science, 2003. p. 1646-1652.

MAJOR, A. S.; FAZIO, S.; LINTON, M. F. B-lymphocyte deficiency increases atherosclerosis in LDL receptor-null mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol,** v. 22, n. 11, p. 1892-1898, 2002.

MATSUURA, E.; HUGHES, G. R.; KHAMASHTA, M. A. Oxidation of LDL and its clinical implication. **Autoimmun Rev,** v. 7, n. 7, p. 558-566, 2008.

MCCLUSKY, D. A., 3RD; SKANDALAKIS, L. J.; COLBORN, G. L.; SKANDALAKIS, J. E. Tribute to a triad: history of splenic anatomy, physiology, and surgery--part 1. **World J Surg,** v. 23, n. 3, p. 311-325, 1999.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nat Rev Immunol,** v. 5, n. 8, p. 606-616, 2005.

MEIR, K. S.; LEITERSDORF, E. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. **Arterioscler Thromb Vasc Biol,** v. 24, n. 6, p. 1006-1014, 2004.

MILLER, A. M.; XU, D.; ASQUITH, D. L.; DENBY, L.; LI, Y.; SATTAR, N.; BAKER, A. H.; MCINNES, I. B.; LIEW, F. Y. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. **J Exp Med,** v. 205, n. 2, p. 339-346, 2008.

MITCHINSON, M. J.; BALL, R. Y. Macrophages and atherogenesis. **Lancet,** v. 2, n. 8551, p. 146-148, 1987.

MIZOGUCHI, A.; MIZOGUCHI, E.; TAKEDATSU, H.; BLUMBERG, R. S.; BHAN, A. K. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. **Immunity,** v. 16, n. 2, p. 219-230, 2002.

MOGHADASIAN, M. H.; FROHLICH, J. J.; MCMANUS, B. M. Advances in experimental dyslipidemia and atherosclerosis. **Lab Invest,** v. 81, n. 9, p. 1173-1183, 2001.

MOR, A.; PLANER, D.; LUBOSHITS, G.; AFEK, A.; METZGER, S.; CHAJEK-SHAUL, T.; KEREN, G.; GEORGE, J. Role of naturally occurring CD4+ CD25+ regulatory T cells in experimental atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol,** v. 27, n. 4, p. 893-900, 2007.

NAKASHIMA, Y.; PLUMP, A. S.; RAINES, E. W.; BRESLOW, J. L.; ROSS, R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. **Arterioscler Thromb,** v. 14, n. 1, p. 133-140, 1994.

NAMIKI, M.; KAWASHIMA, S.; YAMASHITA, T.; OZAKI, M.; SAKODA, T.; INOUE, N.; HIRATA, K.; MORISHITA, R.; KANEDA, Y.; YOKOYAMA, M. Intramuscular gene transfer of interleukin-10 cDNA reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. **Atherosclerosis,** v. 172, n. 1, p. 21-29, 2004.

NARVANEN, O.; ERKKILA, A.; YLA-HERTTUALA, S. Evaluation and characterization of EIA measuring autoantibodies against oxidized LDL. **Free Radic Biol Med,** v. 31, n. 6, p. 769-777, 2001.

NARVERUD, I.; UELAND, T.; NENSETER, M. S.; RETTERSTOL, K.; TELLE-HANSEN, V. H.; HALVORSEN, B.; OSE, L.; AUKRUST, P.; HOLVEN, K. B. Children with familial hypercholesterolemia are characterized by an inflammatory imbalance between the tumor necrosis factor alpha system and interleukin-10. **Atherosclerosis,** v. 214, n. 1, p. 163-168, 2011.

NAVAB, M.; BERLINER, J. A.; WATSON, A. D.; HAMA, S. Y.; TERRITO, M. C.; LUSIS, A. J.; SHIH, D. M.; VAN LENTEN, B. J.; FRANK, J. S.; DEMER, L. L.; EDWARDS, P. A.; FOGELMAN, A. M. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. **Arterioscler Thromb Vasc Biol,** v. 16, n. 7, p. 831-842, 1996.

NEUZIL, J.; CHRISTISON, J. K.; IHEANACHO, E.; FRAGONAS, J. C.; ZAMMIT, V.; HUNT, N. H.; STOCKER, R. Radical-induced lipoprotein and plasma lipid oxidation in normal and apolipoprotein E gene knockout (apoE-/-) mice: apoE-/- mouse as a model for testing the role of tocopherol-mediated peroxidation in atherogenesis. **J Lipid Res,** v. 39, n. 2, p. 354-368, 1998.

NGO, V. N.; CORNALL, R. J.; CYSTER, J. G. Splenic T zone development is B cell dependent. **J Exp Med,** v. 194, n. 11, p. 1649-1660, 2001.

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

NISHI, K.; ITABE, H.; UNO, M.; KITAZATO, K. T.; HORIGUCHI, H.; SHINNO, K.; NAGAHIRO, S. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. **Arterioscler Thromb Vasc Biol,** v. 22, n. 10, p. 1649-1654, 2002.

NUNES, S. I.; REZENDE, A. B.; TEIXEIRA, F. M.; FERREIRA, A. P.; ALVES, M. M.; JAMEL, N.; ASSIS, R. V.; TEIXEIRA, H. C. Antibody response of autogenous splenic tissue implanted in the abdominal cavity of mice. **World J Surg,** v. 29, n. 12, p. 1623-1629, 2005.

ORDA, R.; BARAK, J.; BARON, J.; SPIRER, Z.; WIZNITZER, T. Postsplenectomy splenic activity. **Ann Surg,** v. 194, n. 6, p. 771-774, 1981.

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

PALINSKI, W.; ORD, V. A.; PLUMP, A. S.; BRESLOW, J. L.; STEINBERG, D.; WITZTUM, J. L. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. **Arterioscler Thromb,** v. 14, n. 4, p. 605-616, 1994.

PAULO, D.N.S.; SILVA, A. L. Lipídios plasmáticos após esplenectomia total e parcial em cães. **Rev Col Bras Cir**, v. 28, n. 3, p. 264-270, 2001.

PAULO, I.C.A.L.; PAULO, D.N.S.; SILVA, A.L.; FOLETTO, R.M.; COLNAGO, G.L.; VARGAS, P.M. Níveis de lípides plasmáticos em ratos submetidos à esplenectomia total, ligadura simultânea dos vasos esplênicos e a esplenectomia subtotal com preservação do pólo inferior. **Rev Col Bras Cir,** v. 32, n. 5, p. 229-236, 2005.

PEROBELLI, S. M.; ALVES, C. C.; REZENDE, A. B.; FARIAS, R. E.; NUNES, S. I.; TEIXEIRA, H. C. Splenic autotransplantation reverses interferon-gamma and nitric oxide production and resistance to Listeria monocytogenes in splenectomized mice. **Transpl Infect Dis,** v. 13, n. 2, p. 154-160, 2011.

PETROIANU, A. Avaliação da função fagocitária em remanescentes de esplenectomia subtotal e auto-implante esplênico autógeno. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 25, n. 1, p. 25-30, 2003a.

PETROIANU, A. Aspectos históricos do baço e da cirurgia esplênica. In: PETROIANU, A. **O Baço**. 1ª ed. São Paulo: CRL Balieiro, 2003b. p.3-15.

PETROIANU, A.; DA SILVA, R. G.; NASCIMENTO CARDOSO, V.; ALBERTI, L. R.; DA SILVA, M. G. Effect of spleen surgeries on Escherichia coli distribution on the mononuclear phagocytic system. **Int J Surg,** v. 8, n. 1, p. 48-51, 2010.

PETROIANU, A.; TEIXEIRA, B. C.; DE ALENCAR, L. F. Partial splenectomy for treatment of splenic hemangioma. **Chirurgia (Bucur),** v. 104, n. 4, p. 483-486, 2009.

PETROIANU, A.; VELOSO, D. F.; ALBERTI, L. R.; DE SOUZA VASCONCELLOS, L. Plasma lipid alterations after total splenectomy, subtotal splenectomy and splenic auto-implants in rats. **J Gastroenterol Hepatol,** v. 23, n. 7 Pt 2, p. e221-224, 2008.

PETROIANU, A.; VELOSO, D.F.M.; COSTA, G.R.; ALBERTI, L.R. Efeitos de operações sobre o baço no lipidograma de ratas. **Rev Assoc Med Bras**, v. 52, n. 1, p. 56-59, 2006.

PISTERS, P. W.; PACHTER, H. L. Autologous splenic transplantation for splenic trauma. **Ann Surg,** v. 219, n. 3, p. 225-235, 1994.

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

PORTUGAL, L. R.; FERNANDES, L. R.; ALVAREZ-LEITE, J. I. Host cholesterol and inflammation as common key regulators of toxoplasmosis and artherosclerosis development. **Expert Rev Anti Infect Ther,** v. 7, n. 7, p. 807-819, 2009.

PRE, M. F.; KOZIJN, A. E.; VAN BERKEL, L. A.; BORG, M. N.; LINDENBERGH-KORTLEVE, D.; JENSEN, L. T.; KOOY-WINKELAAR, Y.; KONING, F.; BOON, L.; NIEUWENHUIS, E. E.; SOLLID, L. M.; FUGGER, L.; SAMSOM, J. N. Tolerance to Ingested Deamidated Gliadin in Mice is Maintained by Splenic, Type 1 Regulatory T Cells. **Gastroenterology**, 2011.

RAINES, E. W.; ROSS, R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. **Br Heart J,** v. 69, n. 1 Suppl, p. S30-37, 1993.

REDDICK, R. L.; ZHANG, S. H.; MAEDA, N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. **Arterioscler Thromb,** v. 14, n. 1, p. 141-147, 1994.

RESENDE, L.S.R.; MACHADO, P.E.A. Complicações da esplenectomia. In: PETROIANU, A. **O Baço**. 1ª ed. São Paulo: CRL Balieiro, 2003. p.302-306.

RESENDE, V.; PETROIANU, A. Functions of the splenic remnant after subtotal splenectomy for treatment of severe splenic injuries. **Am J Surg,** v. 185, n. 4, p. 311-315, 2003.

REZENDE, A. B.; NUNES, S. I.; FARIAS, R. E.; VIEIRA, F. R.; PETROIANU, A.; TEIXEIRA, H. C. Influência do baço, da asplenia e do implante esplênico autógeno no metabolismo lipídico de camundongos. **Rev Col Bras Cir,** v. 34, n. 3, p. 177-182, 2007.

ROBINETTE, C. D.; FRAUMENI, J. F., JR. Splenectomy and subsequent mortality in veterans of the 1939-45 war. **Lancet,** v. 2, n. 8029, p. 127-129, 1977.

ROSS, R. Cell biology of atherosclerosis. **Annu Rev Physiol,** v. 57, p. 791-804, 1995.

SALONEN, J. T.; YLA-HERTTUALA, S.; YAMAMOTO, R.; BUTLER, S.; KORPELA, H.; SALONEN, R.; NYYSSONEN, K.; PALINSKI, W.; WITZTUM, J. L. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. **Lancet,** v. 339, n. 8798, p. 883-887, 1992.

SANCHEZ-QUESADA, J. L.; CAMACHO, M.; ANTON, R.; BENITEZ, S.; VILA, L.; ORDONEZ-LLANOS, J. Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells. **Atherosclerosis,** v. 166, n. 2, p. 261-270, 2003.

SANTANA, E.M. Anatomia do baço. In: PETROIANU, A. **O Baço**. 1ª ed. São Paulo: CRL Balieiro, 2003. p.23-36.

SAOUDI, A.; SIMMONDS, S.; HUITINGA, I.; MASON, D. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis in rats by targeting autoantigen to B cells: evidence that the protective mechanism depends on changes in the cytokine response and migratory properties of the autoantigen-specific T cells. **J Exp Med,** v. 182, n. 2, p. 335-344, 1995.

SASAKI, N.; YAMASHITA, T.; TAKEDA, M.; SHINOHARA, M.; NAKAJIMA, K.; TAWA, H.; USUI, T.; HIRATA, K. Oral anti-CD3 antibody treatment induces regulatory T cells and inhibits the development of atherosclerosis in mice. **Circulation,** v. 120, n. 20, p. 1996-2005, 2009.

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

SCOTT, J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. **Curr Opin Genet Dev,** v. 14, n. 3, p. 271-279, 2004.

SEGREST, J. P.; JONES, M. K.; DE LOOF, H.; BROUILLETTE, C. G.; VENKATACHALAPATHI, Y. V.; ANANTHARAMAIAH, G. M. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. **J Lipid Res,** v. 33, n. 2, p. 141-166, 1992.

SHIH-CHING, K.; CHOUDHRY, M. A.; MATSUTANI, T.; SCHWACHA, M. G.; RUE, L. W.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. Splenectomy differentially influences immune responses in various tissue compartments of the body. **Cytokine,** v. 28, n. 3, p. 101-108, 2004.

SHOENFELD, Y.; WU, R.; DEARING, L. D.; MATSUURA, E. Are anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies pathogenic or protective? **Circulation,** v. 110, n. 17, p. 2552-2558, 2004.

SIMÕES, F.C.; MARQUES R.G.; DIESTEL, C.F.; CAETANO, C.E.R.; DINIS, A.P.G.; HORST, N.L.; NETO, J.F.N.; PORTELA, M.C. Perfil lipídico em ratos submetidos a esplenectomia total isolada ou combinada com auto-implante esplênico. **Acta Cir Bras**, v. 22, n.1, p. 46-51, 2007.

SIPKA, S., JR.; BRATH, E.; TOTH, F. F.; ALEKSZA, M.; KULCSAR, A.; FABIAN, A.; BARATH, S.; BALOGH, P.; SIPKA, S.; FURKA, I.; MIKO, I. Cellular and serological changes in the peripheral blood of splenectomized and spleen autotransplanted mice. **Transpl Immunol,** v. 16, n. 2, p. 99-104, 2006.

SIQUEIRA, A.F.A.; ABDALLA, D.S.P.; FERREIRA, S.R.G. LDL: da síndrome metabólica à instabilização da placa aterosclerótica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 2, p. 334-343, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arq Bras Cardiol**, v. 88, n. 1 Suppl, p. S2-19, 2007.

SOTO, Y.; CONDE, H.; AROCHE, R.; BRITO, V.; LUACES, P.; NASIFF, A.; OBREGON, A.; VAZQUEZ LOPEZ, A. M. Autoantibodies to oxidized low density lipoprotein in relation with coronary artery disease. **Hum Antibodies,** v. 18, n. 3, p. 109-117, 2009.

STEFFENS, S.; MACH, F. Inflammation and atherosclerosis. **Herz,** v. 29, n. 8, p. 741-748, 2004.

STEINBERG, D. A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis. **Atherosclerosis,** v. 131 Suppl, p. S5-7, 1997.

STEINBERG, D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. **J Lipid Res,** v. 50 Suppl, p. S376-381, 2009.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F., JR. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol Rev,** v. 84, n. 4, p. 1381-1478, 2004.

STRYER, L. Biosynthesis of membrane lipids and steroids. In: STRYER, L. **Biochemistry**. 4th edition. New York: WH Freeman, 1996. p. 697-698.

SUGIHARA, T.; OTSUKA, A.; YAWATA, Y. [Contribution of the spleen to the lipid metabolism in plasma and red cells. On hereditary spherocytosis and hereditary high red cell membrane phosphatidylcholine hemolytic anemia]. **Rinsho Ketsueki,** v. 30, n. 8, p. 1248-1255, 1989.

SUTO, A.; NAKAJIMA, H.; IKEDA, K.; KUBO, S.; NAKAYAMA, T.; TANIGUCHI, M.; SAITO, Y.; IWAMOTO, I. CD4(+)CD25(+) T-cell development is regulated by at least 2 distinct mechanisms. **Blood,** v. 99, n. 2, p. 555-560, 2002.

TALEB, S.; TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Regulatory T-cell immunity and its relevance to atherosclerosis. **J Intern Med,** v. 263, n. 5, p. 489-499, 2008.

TEIXEIRA, F. M.; FERNANDES, B. F.; REZENDE, A. B.; MACHADO, R. R.; ALVES, C. C.; PEROBELLI, S. M.; NUNES, S. I.; FARIAS, R. E.; RODRIGUES, M. F.; FERREIRA, A. P.; OLIVEIRA, S. C.; TEIXEIRA, H. C. Staphylococcus aureus infection after splenectomy and splenic autotransplantation in BALB/c mice. **Clin Exp Immunol,** v. 154, n. 2, p. 255-263, 2008.

TEIXEIRA, F. M.; TEIXEIRA, H. C.; FERREIRA, A. P.; RODRIGUES, M. F.; AZEVEDO, V.; MACEDO, G. C.; OLIVEIRA, S. C. DNA vaccine using Mycobacterium bovis Ag85B antigen induces partial protection against experimental infection in BALB/c mice. **Clin Vaccine Immunol,** v. 13, n. 8, p. 930-935, 2006.

TEIXEIRA, H. C.; KAUFMANN, S. H. Role of NK1.1+ cells in experimental listeriosis. NK1+ cells are early IFN-gamma producers but impair resistance to Listeria monocytogenes infection. **J Immunol,** v. 152, n. 4, p. 1873-1882, 1994.

TIAN, J.; PEI, H.; SANDERS, J. M.; ANGLE, J. F.; SAREMBOCK, I. J.; MATSUMOTO, A. H.; HELM, G. A.; SHI, W. 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.

TIAN, J.; ZEKZER, D.; HANSSEN, L.; LU, Y.; OLCOTT, A.; KAUFMAN, D. L. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. **J Immunol,** v. 167, n. 2, p. 1081-1089, 2001.

TORNVALL, P.; WAEG, G.; NILSSON, J.; HAMSTEN, A.; REGNSTROM, J. Autoantibodies against modified low-density lipoproteins in coronary artery disease. **Atherosclerosis,** v. 167, n. 2, p. 347-353, 2003.

TOSHIMA, S.; HASEGAWA, A.; KURABAYASHI, M.; ITABE, H.; TAKANO, T.; SUGANO, J.; SHIMAMURA, K.; KIMURA, J.; MICHISHITA, I.; SUZUKI, T.; NAGAI, R. Circulating oxidized low density lipoprotein levels. A biochemical risk marker for coronary heart disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol,** v. 20, n. 10, p. 2243-2247, 2000.

TRAUB, A.; GIEBINK, G. S.; SMITH, C.; KUNI, C. C.; BREKKE, M. L.; EDLUND, D.; PERRY, J. F. Splenic reticuloendothelial function after splenectomy, spleen repair, and spleen autotransplantation. **N Engl J Med,** v. 317, n. 25, p. 1559-1564, 1987.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol,** v. 3, n. 2, p. 133-146, 2003.

TSIMIKAS, S.; BERGMARK, C.; BEYER, R. W.; PATEL, R.; PATTISON, J.; MILLER, E.; JULIANO, J.; WITZTUM, J. L. Temporal increases in plasma markers of oxidized low-density lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes. **J Am Coll Cardiol,** v. 41, n. 3, p. 360-370, 2003.

TSIMIKAS, S.; BRILAKIS, E. S.; LENNON, R. J.; MILLER, E. R.; WITZTUM, J. L.; MCCONNELL, J. P.; KORNMAN, K. S.; BERGER, P. B. Relationship of IgG and IgM autoantibodies to oxidized low density lipoprotein with coronary artery disease and cardiovascular events. **J Lipid Res,** v. 48, n. 2, p. 425-433, 2007.

VAN LEEUWEN, M.; DAMOISEAUX, J.; DUIJVESTIJN, A.; TERVAERT, J. W. The therapeutic potential of targeting B cells and anti-oxLDL antibodies in atherosclerosis. **Autoimmun Rev,** v. 9, n. 1, p. 53-57, 2009.

VAN REE, J. H.; VAN DEN BROEK, W. J.; DAHLMANS, V. E.; GROOT, P. H.; VIDGEON-HART, M.; FRANTS, R. R.; WIERINGA, B.; HAVEKES, L. M.; HOFKER, M. H. Diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice. **Atherosclerosis,** v. 111, n. 1, p. 25-37, 1994.

VAY, D.; PARODI, M.; ROLLA, R.; MOTTARAN, E.; VIDALI, M.; BELLOMO, G.; ALBANO, E. Circulating antibodies recognizing malondialdehyde-modified proteins in healthy subjects. **Free Radic Biol Med,** v. 30, n. 3, p. 277-286, 2001.

WITZTUM, J. L. Role of oxidised low density lipoprotein in atherogenesis. **Br Heart J,** v. 69, n. 1 Suppl, p. S12-18, 1993.

WITZTUM, J. L. Splenic immunity and atherosclerosis: a glimpse into a novel paradigm? **J Clin Invest,** v. 109, n. 6, p. 721-724, 2002.

WLUKA, A.; OLSZEWSKI, W. L. Innate and adaptive processes in the spleen. **Ann Transplant,** v. 11, n. 4, p. 22-29, 2006.

WU, R.; LEFVERT, A. K. Autoantibodies against oxidized low density lipoproteins (oxLDL): characterization of antibody isotype, subclass, affinity and effect on the macrophage uptake of oxLDL. **Clin Exp Immunol,** v. 102, n. 1, p. 174-180, 1995.

WU, R.; SHOENFELD, Y.; SHERER, Y.; PATNAIK, M.; MATSUURA, E.; GILBURD, B.; KOIKE, T.; PETER, J. B. Anti-idiotypes to oxidized LDL antibodies in intravenous immunoglobulin preparations--possible immunomodulation of atherosclerosis. **Autoimmunity,** v. 36, n. 2, p. 91-97, 2003.

YAN, Z. Q.; HANSSON, G. K. Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. **Immunol Rev,** v. 219, p. 187-203, 2007.

YANG, X.; GALEANO, N. F.; SZABOLCS, M.; SCIACCA, R. R.; CANNON, P. J. Oxidized low density lipoproteins alter macrophage lipid uptake, apoptosis, viability and nitric oxide synthesis. **J Nutr,** v. 126, n. 4 Suppl, p. 1072S-1075S, 1996.

ZEZINA, L.; DIMENY, E.; VESSBY, B.; FELLSTROM, B. Serum levels of antibodies against oxidised LDL in kidney graft recipients. **Am J Nephrol,** v. 22, n. 5-6, p. 539-547, 2002.

ZAGO, M.A. Funções do baço e sua avaliação. In: PETROIANU, A. **O Baço**. 1ª ed. São Paulo: CRL Balieiro, 2003. p.37-42.

ZHANG, S. H.; REDDICK, R. L.; PIEDRAHITA, J. A.; MAEDA, N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. **Science,** v. 258, n. 5081, p. 468-471, 1992.

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

ANEXO A - Linha de pesquisa em baço e implante esplênico autógeno

Em 2001, o Laboratório de Imunologia do ICB/UFJF implementou uma nova linha de pesquisa voltada para avaliar as funções do baço e a preservação destas funções pelo implante esplênico autógeno, da qual participo ativamente. Inicialmente esta linha de pesquisa era voltada para avaliação da importância do tecido esplênico na resposta imunológica e no combate a diferentes infecções.

Atualmente, esta linha de pesquisa também abrange o papel do baço no metabolismo lipídico e na aterosclerose. O presente trabalho implementou um novo modelo experimental (modelo de aterosclerose) no nosso Laboratório, em parceria com o Laboratório de Bioquímica Nutricional e Aterosclerose do ICB/UFMG. A padronização de novas técnicas e a transferência de tecnologia foram demoradas, além da realização da própria pesquisa, que envolveu animais manipulados geneticamente de difícil obtenção e reprodução. O artigo referente a este trabalho (ANEXO B) já foi aceito para publicação no JSR (Journal of Surgical Research).

Além disso, três trabalhos relacionados à linha de pesquisa em baço e implante esplênico autógeno já foram publicados nesses últimos quatro anos:

1. TEIXEIRA, F. M.; FERNANDES, B. F.; REZENDE, A. B.; MACHADO, R. R.; ALVES, C. C.; PEROBELLI, S. M.; NUNES, S. I.; FARIAS, R. E.; RODRIGUES, M. F.; FERREIRA, A. P.; OLIVEIRA, S. C.; TEIXEIRA, H. C. Staphylococcus aureus infection after splenectomy and splenic autotransplantation in BALB/c mice. **Clin Exp Immunol,** v. 154, n. 2, p. 255-263, 2008.

2. FERNANDES, B. F.; REZENDE, A. B.; ALVES, C. C.; TEIXEIRA, F. M.; FARIAS, R. E.; FERREIRA, A. P.; TEIXEIRA, H. C. Splenic autotransplantation restores IL-17 production and antibody response to Streptococcus pneumoniae in splenectomized mice. **Transpl Immunol,** v. 22, n. 3-4, p. 195-197, 2010.

3. PEROBELLI, S. M.; ALVES, C. C.; REZENDE, A. B.; FARIAS, R. E.; NUNES, S. I.; TEIXEIRA, H. C. Splenic autotransplantation reverses interferon-gamma and nitric oxide production and resistance to Listeria monocytogenes in splenectomized mice. **Transpl Infect Dis,** v. 13, n. 2, p. 154-160, 2011.

O artigo citado abaixo é referente à minha participação em outra linha de pesquisa do Laboratório, que aborda a resposta imunológica às micobactérias e co-infecções, e também já foi aceito para publicação.

DIAS, A.T.; CASTRO, S.B.R.; ALVES, C.C.S.; REZENDE, A.B.; RODRIGUES, M.F.; MACHADO, R.R.P.; FERNANDES, A.; NEGRÃO-CORRÊA, D.; TEIXEIRA, H.C.; FERREIRA, A.P. Lower production of IL-17A and increased susceptibility to *Mycobacterium bovis* in mice coinfected with *Strongyloides venezuelensis.* **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 617-619, 2011.

ANEXO B - Artigo

Splenectomy increases atherosclerotic lesions in apoliprotein E deficient mice

Alice B. Rezende, MD, PhD[1,2], Náira N. Neto[2], Luciana R. Fernandes, PhD[3], Ana Cecília C. Ribeiro, BSc[3], Jacqueline I. Alvarez-Leite, PhD[3], Henrique C. Teixeira, PhD[2]

[1]Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, Brazil

[2]Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, Brazil

[3]Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, 30161-970 Belo Horizonte, Brazil

Running title: Splenectomy increases atherosclerosis

Categorization of manuscript: Transplantation/Immunology

Corresponding author: Prof. Henrique C. Teixeira, Ph.D.

Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

36036-900 Juiz de Fora – MG – Brazil. Tel/fax: 55-32-21023214.

E-mail adress: henrique.teixeira@ufjf.edu.br

Abstract

Background: Atherosclerosis is an inflammatory immune disease associated with lipid accumulation in the intima layer of arteries. The spleen plays an important immune function, but its influence in development of atherosclerosis remains unclear. Evaluation of the role of the spleen in atherosclerosis is justified due to the high frequency of total splenectomies. In this work, the effect of splenectomy on the development of atherosclerosis in apolipoprotein E (ApoE) deficient mice was investigated.

Methods: ApoE deficient mice were divided into a sham-operated control group (CT) and a splenectomized group (SP). Thirty days after surgery, animals were fed a high fat western diet. After 8 wk, mice were euthanized and their blood, heart, and aorta were subjected to analysis. Atherosclerotic lesion areas in the aortic root were stained with hematoxylin-eosin and quantified by morfometry. The atherosclerotic lesions in the thoracic and abdominal portions of aorta were determined by assessing the percentage of the luminal surface area stained by Sudan IV. Total serum cholesterol and anti-oxidized LDL antibodies were measured.

Results: Levels of total serum cholesterol did not vary significantly after splenectomy. Anti-oxidized LDL IgG antibodies were similar between groups. However, compared to the control group, lesions in the aortic root were significantly larger in splenectomized mice ($P < 0.01$). These data were confirmed by the increase of atherosclerotic area in the thoracic and abdominal portions of aorta in splenectomized mice.

Conclusions: These data indicate that splenectomy increases atherosclerotic lesions in ApoE deficient mice fed an atherogenic diet, suggesting a atheroprotector role of the spleen.

Keywords: Splenectomy, Spleen, Atherosclerosis, Cholesterol, Antibodies, ApoE mice.

Introduction

From antiquity and up to a few decades ago, the spleen was, for most scholars, an enigmatic organ. Because its importance has seldom been explored and because life is possible in its absence, the spleen has been removed indiscriminately in cases of trauma and several hematological diseases. For a long time, total splenectomy was considered the only therapeutic option for treatment of injured spleens, regardless of the extent or gravity of the injuries (1,2).

The description of post-splenectomy fulminant sepsis in the 1950s awakened the scientific community to the importance of splenic tissue in preventing serious infections (3). The spleen functions as a blood filter that removes old and abnormal blood cells, produces antibodies, and facilitates phagocytosis and elimination of foreign antigens (2,4). Splenectomy renders individuals more susceptible to infections, particularly by bacteria such as Pneumococcus, Meningococcus, and Staphylococcus, organisms that are typically removed through opsonization and phagocytosis (2,4,5).

Because of the growing recognition of its importance, splenic preservation is becoming more desirable in the treatment of splenic injuries (5,6). Several techniques that preserve the integral or partial spleen have been described, such as splenorrhaphy, partial splenectomy, subtotal splenectomy, arterial ligatures, application of hemostatic agents, and splenic implants (7,8). However, because the spleen is the organ most affected in closed abdominal trauma, and because the conservation techniques are not widely known, the incidence of total splenectomy is still rising. In addition, the partial or total mending of the spleen in its anatomical site was always considered difficult (1,6).

Concern with lipid metabolism and atherosclerosis has recently increased, since the disease is extremely common and is manifested through ischemic events of high morbidity and mortality such as acute myocardial infarction and cerebrovascular accident (9,10). Atherosclerosis results from a combination of dyslipidemia and vascular inflammation (10). High plasma levels of total cholesterol, and especially LDL-cholesterol, have been linked to atheromatous plaque formation. The oxidative theory suggests that the atherosclerotic process could be initiated by damage to the vascular endothelium, produced by deposit of LDL followed by oxidative modifications in the LDL molecule. It is believed that the progression of the disease is maintained by the interaction between the modified lipoproteins, such as oxidized LDL (oxLDL), and macrophages, T cells, B cells, and normal cellular constituents of the arterial wall (11). Th1 lymphocytes, which are involved in IFN-□ production and macrophage activation, are directly associated with the process of atherosclerosis, and have been identified in several stages of the injury, from the endothelial dysfunction up to plaque rupture (12,13). In this scenario, the contribution of the Th2 cells, which are involved in IL-4 production and antibody responses, is poorly defined. The oxLDL stimulates the production of anti-oxLDL antibodies by B cells, but the role played by these antibodies in atherosclerosis still has not been established (14,15).

The spleen is an organ classically associated with the development of Th2 responses, since it is responsible for a large antibody production. It is also the principal organ responding to blood antigens such as oxLDL (16,17). The increase of plasma lipids and the frequency of ischemic coronary diseases in individuals who underwent splenectomy due to trauma led to the hypothesis that the spleen participates in lipid metabolism and atherosclerosis (18). However, experiments in splenectomized animals have yielded conflicting results regarding alterations in

circulating lipoprotein levels and in percentage of atheromatous plaques in the aorta (19,20).

Atherosclerotic disease is one the main causes of mortality throughout the world (9), and total splenectomy is a frequently-performed procedure. The objective of this work was to investigate the effect of splenectomy on total serum cholesterol levels, anti-oxLDL antibody response, and development of aortic atherosclerotic lesions using mice deficient in ApoE as an animal model.

Materials and Methods

Animals

Male ApoE deficient mice ($ApoE^{-/-}$) originally from Jackson Laboratories were obtained from the animal facility of the Laboratory of Atherosclerosis and Nutritional Biochemistry (UFMG, Belo Horizonte, Brazil). $ApoE^{-/-}$ mice spontaneously develop hypercholesterolemia and atherosclerotic lesions similar to those seen in humans, making them useful in studying atherosclerosis. This study was approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Federal University of Juiz de Fora ($n^{o.}$ 060/2007).

Surgical protocol

C57BL/6 $ApoE^{-/-}$ mice, 6-wk old, were divided into two groups of ten mice each as follows: (i) sham-operated control group (CT), mice were subjected to midline laparotomy with subsequent laparorrhaphy; (ii) splenectomized group (SP). The mice received 6ml/Kg of an anesthetic solution (0.9% NaCl, 2% xylazine, 10% ketamine) intraperitoneally before the execution of a midline laparotomy,

splenectomy and binding of the vascular pedicle and short vessels using 5.0 catgut (Shalon, Goiânia, Brazil). Skin closure was performed using a 4.0 running polyglactin suture. In the CT group, midline laparotomy and spleen mobilization were performed with subsequent laparorrhaphy. All operations were done under sterile conditions.

Atherogenic diet

Thirty days after surgery, at 10 wk of age, mice began a high fat western diet (with 0.15% cholesterol) maintained for the subsequent 8 wk. The atherogenic diet (in g/100g) was composed of sucrose (34.15), casein (19.5), corn starch (15.0), anhydrous milkfat (21.0), cellulose (5.0), mineral mixture (3.5), vitamin mixture (1.0), calcium carbonate (0.4), methionine (0.3), ethoxyquin (0.005) and cholesterol (0.15). The consumption of a diet rich in fats and cholesterol exacerbates the atherosclerotic injuries and accelerates their evolution. Body weight (weekly) and food intake (daily) were evaluated throughout the experiment.

LDL preparations and serum assays

At 18 wk of age, animals were euthanized under anesthesia after fasting for twelve hours. Blood was collected from the retro-orbital plexus. The heart and aorta (from the aortic arch to the iliac bifurcation) were removed for analysis of the atherosclerotic lesions. Blood samples were centrifuged at 3.500 rpm for ten minutes and the sera were used for determination of total serum cholesterol and anti-oxLDL antibodies. LDL was obtained under sterile conditions by ultracentrifugation of human plasma collected from healthy donors (21). LDL oxidation was performed as described (22). The titers of specific anti-oxLDL antibodies were measured by ELISA (23) using a peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma, St. Louis, MO).

Total serum cholesterol concentration was determined using a commercial cholesterol oxidase kit (Human GmbH, Wiesbaden, Germany).

En Face Plaque Area

Mice were euthanized under anesthesia, and their aortas were subsequently excised, fixed, and stained as described for quantification of en face plaque area (24). Briefly, after the adventitial tissue was carefully removed, the aorta was opened longitudinally from the aortic arch to the iliac bifurcation, fixed at 4℃ overnight in 4% formaldehyde and 5% saccharose solution, and stained with 0.5% Sudan IV (Sigma, St. Louis, MO). En face images were obtained using a stereomicroscope (SZ40, Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera (FE-26, Olympus). To increase resolution, each aorta was captured in at least two segments. Images were analyzed using Adobe Photo Impact ver. 7.0 and Image Pro Plus software. The percentage of the luminal surface area stained by Sudan IV was determined.

Histological analysis of atherosclerotic lesions

The heart and proximal section of the aorta were removed from animals and cleaned of adventitial tissue. The top halves of the hearts were obtained under stereoscopic observation and fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline at room temperature. The specimens were routinely processed for paraffin embedding and analyzed according to the method described by Paigen *et al.* with modifications as briefly described below (25). Every consecutive section (10 μm thick) throughout the aortic root area (250 - 300 μm) was stained with hematoxylin and eosin. The aortic root area was identified by the proximal presence of aortic valve leaflets. One of every three sections (a total of ten sections per mouse)

was kept for morphometric analysis with an image analyzer (Image Pro Plus software) to process images obtained from a microscope (N-180M, Coleman, Bristol, UK) coupled to a digital camera (DSC-W35, Sony, Tokyo, Japan). The total lesion area of each animal was calculated as the sum of lesion areas obtained from the ten selected sections.

Statistical analysis

D'Agostino's and Pearson's tests were used in order to analyze normality of the data. Statistical analyzes were performed using the Student's t-test for parametric values and the Mann-Whitney test for non-parametric values with the level of significance set at $p < 0.05$. A computer software package, GraphPad Prism®5.0, was used for the analyzes.

Results

Body weight and food intake

ApoE deficient mice were splenectomized or sham-operated at 6 wk of age and kept on a chow diet. 30 days after surgery, mice were fed a high fat western diet maintained for 8 wk. There was no difference in food and water intake or body weight between the two groups (Table 1).

Splenectomy had no effect on total serum cholesterol levels and anti-oxLDL IgG response

The levels of total serum cholesterol were similar in the splenectomized group compared to the sham-operated control group (Table 1). Splenectomized mice

exhibited antibody titers of anti-oxLDL IgG slightly lower in comparison to the CT group, but with no significant differences (Fig. 1). This data indicates that splenectomy did not induce significant changes in total serum cholesterol and anti-oxLDL antibody response.

Increased atherosclerosis in splenectomized ApoE$^{-/-}$ mice

The quantification of en face plaque area stained by Sudan IV in the thoracic and abdominal portions of aorta showed that the aortic plaque area of splenectomized animals (2.30±0.13%) was larger compared to sham-operated control mice (0.63±0.03%) (Fig. 2). In addition, atherosclerotic lesions were quantified in sections taken from the aortic root stained with hematoxylin-eosin. The total lesion area of each animal was the sum of lesion areas obtained from the ten selected sections. Compared to sham-operated ApoE$^{-/-}$ controls, the total lesion area increased significantly in splenectomized mice (2317±49 μm^2 x 1000 for SP and 1487±17μm^2 x 1000 for CT) (Fig. 3). These data confirm previous results of atherosclerotic lesions in the thoracic and abdominal portions of aorta and indicate that splenectomy increases atherosclerosis in ApoE deficient mice fed an atherogenic diet.

Discussion

The current study indicates that splenectomy does not alter total cholesterol levels circulating in the blood and does not promote a significant decline of IgG anti-oxLDL serum titers. Splenectomy, however, induces an increase of atherosclerotic

lesions in the thoracic and abdominal portions of the aorta, as well as in the root of the aorta.

Previous studies suggested a relation between splenic tissue and atherosclerosis (17,18). Splenectomized rabbits fed a normal chow diet supplemented with 1% cholesterol for 12 wk exhibited increased atherosclerotic lesions in the aorta (19). ApoE deficient mice fed a western diet presented more extensive and severe atherosclerotic lesions in the root of the aorta compared to controls (16). The present study is the first showing that splenectomy induces an increase of atherosclerotic lesions both in the thoracic and abdominal portions of the aorta, and in the aortic root, using the $ApoE^{(-/-)}$ model of hyperlipidemia and atherosclerosis.

The spleen´s participation in lipid metabolism and atherosclerosis was initially suspected because of alterations in the circulating levels of lipoproteins observed after splenectomy (19,20). Splenectomized Wistar rats subjected to a diet rich in cholesterol had high levels of all blood lipoproteins, including HDL (26). In contrast, similar animals showed a high level of total cholesterol and LDL but a low level of HDL, while levels of VLDL and triglicerides were not altered (27). Studies showing a change in a lipoprotein levels also reported total cholesterol change, strongly suggesting a correlation (19, 26, 27). In the present work, the levels of total cholesterol in ApoE deficient mice subjected to an atherogenic diet were not altered by splenectomy. These discrepancies can be explained by the different experimental models used. The currently preferred animal model for the study of hyperlipidemia and atherosclerosis is the mouse deficient in ApoE or in LDL receptors (10). Our data, however, coincide with the results of a previous study that used ApoE deficient mice, which also found no alterations in the levels of total cholesterol after splenectomy

(16). Our results indicate that the spleen does not participate in the development of artherosclerosis through modulation of total cholesterol levels, which suggests the involvement of an immune-mediated mechanism. The innate and the Th1 acquired immune responses are believed to play important roles in atherosclerosis (13,28). Macrophages and Th1 cell involvement has already been described in several stages of the process of atherosclerotic lesion development, from endothelial dysfunction to plaque rupture (28,29). The spleen hosts 25% of all lymphocytes of the body, and fulfills an important role in the homeostasis of the immune system, promoting cellular homing, activation and proliferation of lymphocytes and macrophages (16,17,30). In addition, splenic tissue hosts the largest pool of B cells and plays an important role in B cell maturation (16). B cell activation has been associated with protection against atherosclerosis (31,32). The spleen also hosts regulatory T cells (T_{regs}), which are reported to have a protective role in atherosclerotic lesion formation (33). Consequently, the spleen´s participation in atherosclerosis could be associated with the production of cells such as macrophages, T cells and B cells, and their migration and activation at the lesion site.

The spleen is associated with the development of systemic Th2 immune responses, being the principal organ responding to blood antigens such as oxLDL (16,17). The oxidative theory suggests that the atherosclerotic process could be initiated by damage to the vascular endothelium, produced by the deposit of oxLDL and other molecules resulting from oxidative modifications suffered by LDL (11). Experimental reports have indicated that an increase in anti-oxLDL antibody titers could be associated with the reduction of atherosclerotic lesions (10,16). However, studies in humans show conflicting results, with both positive and negative correlations between the anti-oxLDL antibody response and the development and

progression of atherosclerosis having been observed (14,15). Our data show that there is no significant decline in serum titers of anti-oxLDL antibodies after splenectomy, suggesting that the spleen's participation in atherosclerosis goes beyond the simple production of antibodies. We may speculate that the absence of splenic tissue might lead to an imbalance between the Th1/Th2 patterns of immunity, favoring a dominant Th1 response and the development of atherosclerosis (32). Studies on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) have shown that a tendency towards a Th2 response, mediated by B cells and antibodies, can protect against EAE, by stimulating inhibitory pathways of the Th1 response, which is directly associated with the pathogenesis of the disease (34).

This work showed that splenectomy increases atherosclerotic lesions in ApoE deficient mice, both in the thoracic and abdominal portions of aorta, and in its root in the heart. Our results suggest that the spleen participates in the development of artherosclerosis by a mechanism other than one that directly modifies total serum cholesterol or anti-oxLDL antibody levels. Further experimental and human studies are needed to clarify the mechanism of the spleen's involvement in preventing atherosclerosis. Since atherosclerosis leads to cardiovascular disease, this work reinforces the necessity of a more conservative direction in the treatment of splenic injuries.

Acknowledgments

This research was supported by CNPq (305941/2009), FAPEMIG (CBB PPM 0216/10) and CAPES. A.B.R. was given a doctoral fellowship from FAPEMIG.

References

1. McClusky DA, 3rd, Skandalakis LJ, Colborn GL, Skandalakis JE. Tribute to a triad: history of splenic anatomy, physiology, and surgery--part 1. World J Surg 1999;23:311.

2. Teixeira FM, Fernandes BF, Rezende AB, Machado RR, Alves CC, Perobelli SM, Nunes SI, Farias RE, Rodrigues MF, Ferreira AP, Oliveira SC, Teixeira HC. Staphylococcus aureus infection after splenectomy and splenic autotransplantation in BALB/c mice. Clin Exp Immunol 2008;154:255.

3. King H, Shumacker HB, Jr. Splenic studies. I. Susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy. Ann Surg 1952;136:239.

4. Perobelli SM, Alves CC, Rezende AB, Farias RE, Nunes SI, Teixeira HC. Splenic autotransplantation reverses interferon-gamma and nitric oxide production and resistance to Listeria monocytogenes in splenectomized mice. Transpl Infect Dis 2011;13:154.

5. Fernandes BF, Rezende AB, Alves CC, Teixeira FM, Farias RE, Ferreira AP, Teixeira HC. Splenic autotransplantation restores IL-17 production and antibody response to Streptococcus pneumoniae in splenectomized mice. Transpl Immunol 2010;22:195.

6. Nunes SI, Rezende AB, Teixeira FM, Ferreira AP, Alves MM, Jamel N, Assis RV, Teixeira HC. Antibody response of autogenous splenic tissue implanted in the abdominal cavity of mice. World J Surg 2005;29:1623.

7. Grikscheit TC, Sala FG, Ogilvie J, Bower KA, Ochoa ER, Alsberg E, Mooney D, Vacanti JP. Tissue-engineered spleen protects against overwhelming pneumococcal sepsis in a rodent model. J Surg Res 2008;149:214.

8. Petroianu A, Teixeira BC, de Alencar LF. Partial splenectomy for treatment of splenic hemangioma. Chirurgia (Bucur) 2009;104:483.

9. Dahlof B. Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment. Am J Cardiol 2010;105:3A.

10. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. Nat Immunol 2011;12:204.

11. Steinberg D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. J Lipid Res 2009;50 Suppl:S376.

12. Koga M, Kai H, Yasukawa H, Yamamoto T, Kawai Y, Kato S, Kusaba K, Kai M, Egashira K, Kataoka Y, Imaizumi T. Inhibition of progression and stabilization of plaques by postnatal interferon-gamma function blocking in ApoE-knockout mice. Circ Res 2007;101:348.

13. Portugal LR, Fernandes LR, Alvarez-Leite JI. Host cholesterol and inflammation as common key regulators of toxoplasmosis and artherosclerosis development. Expert Rev Anti Infect Ther 2009;7:807.

14. Tsimikas S, Brilakis ES, Lennon RJ, Miller ER, Witztum JL, McConnell JP, Kornman KS, Berger PB. Relationship of IgG and IgM autoantibodies to oxidized low density lipoprotein with coronary artery disease and cardiovascular events. J Lipid Res 2007;48:425.

15. van Leeuwen M, Damoiseaux J, Duijvestijn A, Tervaert JW. The therapeutic potential of targeting B cells and anti-oxLDL antibodies in atherosclerosis. Autoimmun Rev 2009;9:53.

16. Caligiuri G, Nicoletti A, Poirier B, Hansson GK. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. J Clin Invest 2002;109:745.

17. Witztum JL. Splenic immunity and atherosclerosis: a glimpse into a novel paradigm? J Clin Invest 2002;109:721.

18. Robinette CD, Fraumeni JF, Jr. Splenectomy and subsequent mortality in veterans of the 1939-45 war. Lancet 1977;2:127.

19. Asai K, Kuzuya M, Naito M, Funaki C, Kuzuya F. Effects of splenectomy on serum lipids and experimental atherosclerosis. Angiology 1988;39:497.

20. Rezende AB, Nunes SI, Farias RE, Vieira FR, Petroianu A, Teixeira HC. Influence of the spleen, asplenism and autologous splenic implants on lipid metabolism in mice. Rev Col Bras Cir 2007;34:177.

21. Chung BH, Segrest JP, Ray MJ, Brunzell JD, Hokanson JE, Krauss RM, Beaudrie K, Cone JT. Single vertical spin density gradient ultracentrifugation. Methods Enzymol 1986;128:181.

22. Vay D, Parodi M, Rolla R, Mottaran E, Vidali M, Bellomo G, Albano E. Circulating antibodies recognizing malondialdehyde-modified proteins in healthy subjects. Free Radic Biol Med 2001;30:277.

23. Narvanen O, Erkkila A, Yla-Herttuala S. Evaluation and characterization of EIA measuring autoantibodies against oxidized LDL. Free Radic Biol Med 2001;31:769.

24. Palinski W, Ord VA, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. Arterioscler Thromb 1994;14:605.

25. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. Atherosclerosis 1987;68:231.

26. Akan AA, Sengul N, Simsek S, Demirer S. The effects of splenectomy and splenic autotransplantation on plasma lipid levels. J Invest Surg 2008;21:369.

27. Petroianu A, Veloso DF, Alberti LR, de Souza Vasconcellos L. Plasma lipid alterations after total splenectomy, subtotal splenectomy and splenic auto-implants in rats. J Gastroenterol Hepatol 2008;23:e221.

28. Lundberg AM, Hansson GK. Innate immune signals in atherosclerosis. Clin Immunol 2010;134:5.

29. Hermansson A, Ketelhuth DF, Strodthoff D, Wurm M, Hansson EM, Nicoletti A, Paulsson-Berne G, Hansson GK. Inhibition of T cell response to native low-density lipoprotein reduces atherosclerosis. J Exp Med 2010;207:1081.

30. Kono H, Fujii H, Ogiku M, Hara M, Tsuchiya M, Ishii K, Hosomura N. The Kupffer Cell Inhibition Exacerbates but Splenectomy Prevents Mortality in a Rat Septic Peritonitis Model. J Surg Res 2011 (in press).

31. Major AS, Fazio S, Linton MF. B-lymphocyte deficiency increases atherosclerosis in LDL receptor-null mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002;22:1892.

32. Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y, Sattar N, Baker AH, McInnes IB, Liew FY. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. J Exp Med 2008;205:339.

33. Sasaki N, Yamashita T, Takeda M, Shinohara M, Nakajima K, Tawa H, Usui T, Hirata K. Oral anti-CD3 antibody treatment induces regulatory T cells and inhibits the development of atherosclerosis in mice. Circulation 2009;120:1996.

34. Saoudi A, Simmonds S, Huitinga I, Mason D. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis in rats by targeting autoantigen to B cells: evidence that the protective mechanism depends on changes in the cytokine response and migratory properties of the autoantigen-specific T cells. J Exp Med 1995;182:335.

Figure legends

FIG. 1.

Effect of splenectomy on anti-oxLDL IgG serum titers. After 8 wk on a high fat western diet, IgG antibodies to oxLDL were measured in splenectomized (SP) and sham-operated (CT) ApoE deficient mice by ELISA. Different serum dilutions (1/10, 1/20, 1/80) were tested. Data represent mean ± SEM of eight mice/group from a representative experiment.

FIG. 2.

Effect of splenectomy on atherosclerotic lesions in the thoracic and abdominal portions of aorta. Representative en face aortic photographs showing the Sudan IV stained atherosclerotic plaques (red spots) in ApoE deficient mice. (A) Sham-operated control group (CT, n=10). (B) Splenectomized group (SP, n=9). (C) Percentage of the luminal surface area stained by Sudan IV. Bars represent the median. $*P < 0.01$ *versus* CT group.

FIG. 3.

Effect of splenectomy on atherosclerotic lesions in the aortic root of $ApoE^{-/-}$ mice. Photograph of hematoxylin-eosin stained lesions from the level of the aortic cusps, x 100. (A) Sham-operated control group (CT, n=10). (B) Splenectomized group (SP, n=9) . Note the presence of larger atherosclerotic lesions in the aortic cusps of SP mice (arrows). (C) Sum of atherosclerotic lesion area (μm^2 x 1000) in SP and CT $ApoE^{-/-}$ mice. Bars represent the median. $*P < 0.01$ *versus* CT group.

TABLE 1

Body Weight, Food Intake, and Total Serum Cholesterol Levels of Sham-Operated Control and Splenectomized ApoE Deficient Mice

	Sham-operated control group	Splenectomized group
Initial body weight (g)	19.5 ± 0.6	20.4 ± 0.8
Final body weight (g)	28.2 ± 0.8	28.2 ± 0.7
Weight increase (%)	45.5 ± 5.7	40.4 ± 7.3
Food intake (g/mice/d)	3.1 ± 0.1	3.4 ± 0.2
Total serum cholesterol (mmol/L)	30.2 ± 2.4	32.2 ± 2.5

Data are expressed as mean ± standard error.

FIG. 1.

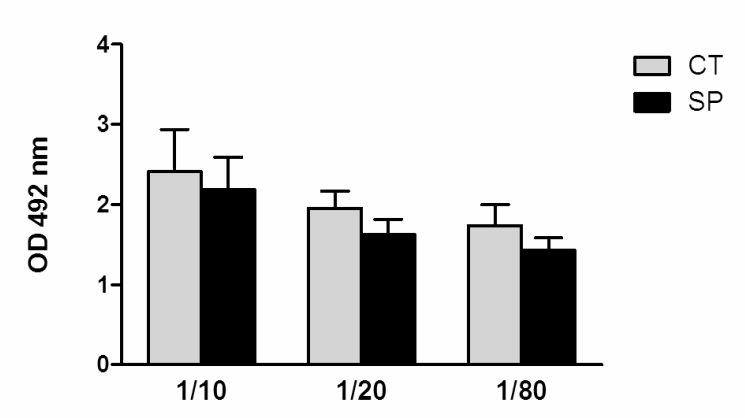


FIG. 2.

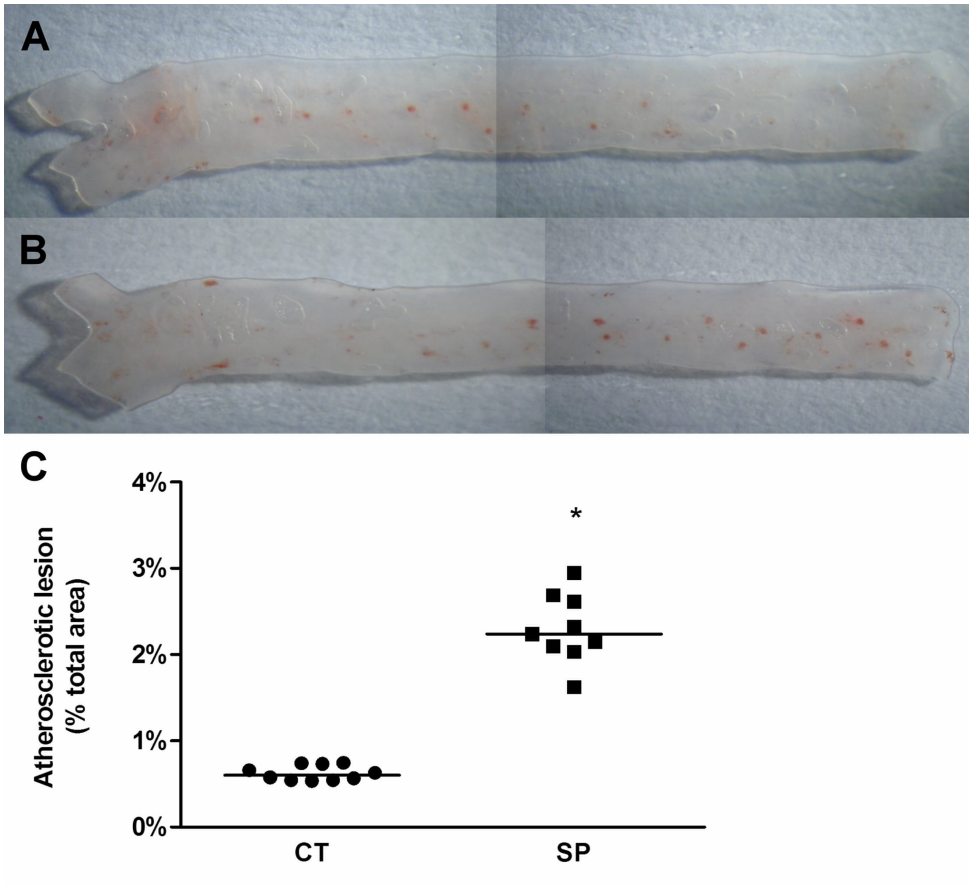
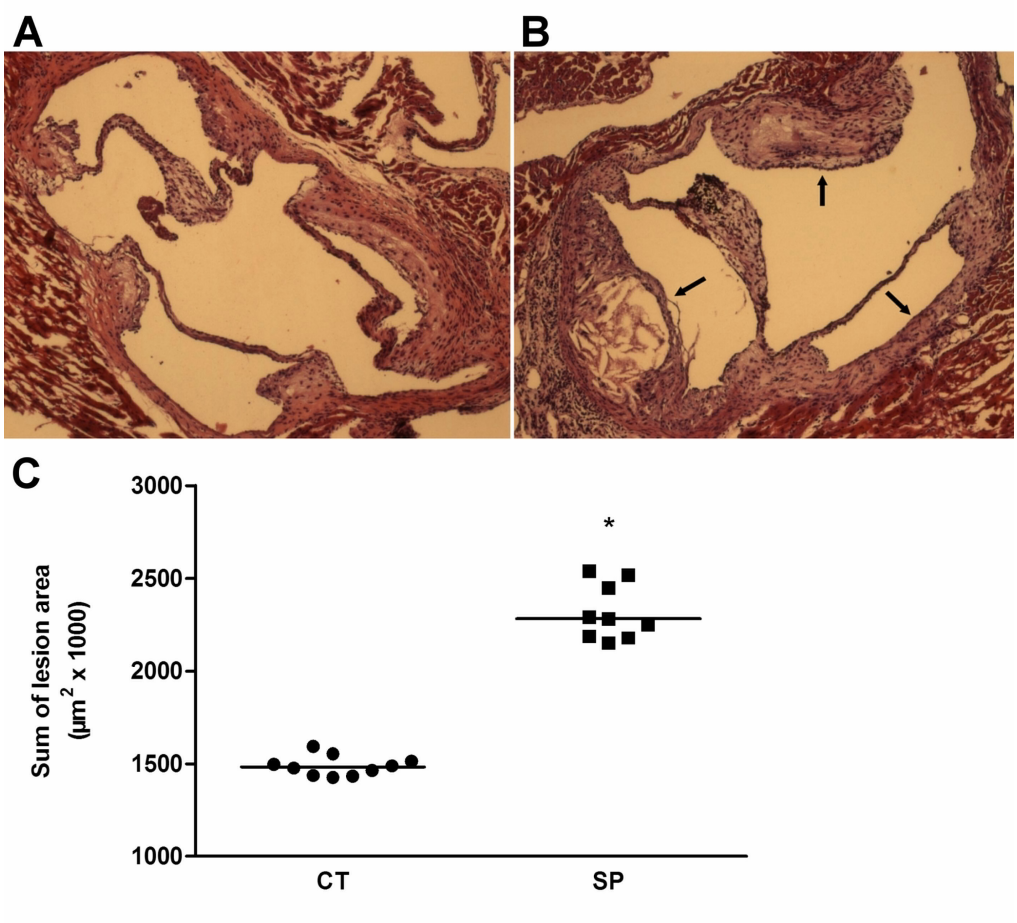


FIG. 3.


A
B
C
Sum of lesion area
(µm² x 1000)
3000
2500
2000
1500
1000
*
CT
SP