

Original

Efecto de glucosa en la expresión de lipasa endotelial en células endoteliales humanas y en sujetos con diabetes mellitus tipo 2

C. Pierart¹, V. Serrano², L. Rubio³, R. Ebensperger³ y R. Fonca²

¹Departamento Nutrición. Facultad Medicina. Universidad de Chile. Santiago. Chile. ²Departamento Nutrición, Diabetes y Metabolismo. Facultad Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago. Chile. ³Departamento Farmacia. Facultad Química. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago. Chile.

Resumen

Introducción: Lipasa endotelial (LE), enzima que modula el metabolismo de HDL, es sobrerregulada por citoquinas-inflamatorias. Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) se ha asociado a inflamación subclínica, por lo que se plantea que estos pacientes tendrían niveles elevados de LE. El objetivo del estudio es determinar el efecto de glucosa en expresión de LE en células de cultivo y evaluar la relación entre los niveles de LE y el control glicémico en sujetos con DM2.

Método: Células endoteliales humanas (HUVEC) fueron estimuladas con distintas concentraciones de glucosa (5.5, 25 y 50 mmol/L) durante 24 h, se evaluó el efecto sobre la expresión de LE. En sujetos DM2 se midieron niveles de LE, glicemia y hemoglobina glicosilada fracción A1c (HbA1c). Se contó con un grupo control (8) para la determinación de los niveles de la enzima. LE se midió por inmunotransferencia, y los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias(UA).

Resultados: En células HUVEC la expresión de LE fue directamente proporcional a la concentración de glucosa extracelular ($p < 0,05$). Se evaluaron 24 sujetos diabéticos (15 mujeres y 9 hombres), edad promedio $60 \pm 9,7$ años, que presentaron niveles de LE mayores que el grupo control (14911UA y 10250, 18UA respectivamente, $p < 0,05$). No se encontró relación entre glicemia, HbA1c y LE.

Conclusión: En células HUVEC existe relación directa entre glucosa extracelular y LE. Los sujetos diabéticos tuvieron niveles mayores de LE que el grupo control, pero esto no se relacionó con control glicémico, lo que apunta a la existencia de otros factores que participan en el aumento de la expresión de LE.

(Nutr Hosp. 2011;26:916-921)

DOI:10.3305/nh.2011.26.4.5130

Palabras clave: Diabetes mellitus. Glucosa. Lipasa endotelial.

GLUCOSE EFFECT IN THE EXPRESSION OF ENDOTHELIAL LIPASE IN HUMAN ENDOTHELIAL CELLS AND IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 2

Abstract

Introduction: Endothelial Lipase (EL), enzyme that modulates HDL metabolism, is overregulated by inflammatory-cytokines. Type 2 Diabetes (DM2) has been associated with a subclinical inflammation, so it has been ruled that these patients could have high levels of EL. The objectives of the research are to determine the effect of glucose in the expression of EL in culturing cells and evaluate the relation between the levels of EL and the metabolic control in patients with DM2.

Method: During 24 hours, human endothelial cells (HUVEC) were stimulated with different concentrations of glucose (5.5, 25 and 50 mmol/L), the effect was evaluated over the expression of EL. In DM2 patients levels of EL, glucose and HbA1c were measured. We had a control group (8) to determine the levels of enzyme. EL was measured by immune transference, and the results were expressed by arbitrary units(AU).

Results: In HUVEC cells, the expression of EL was directly proportional extracellular glucose ($p < 0.05$). 24 diabetic patients were evaluated (15 females and 9 males) average age from $60 \pm 9,7$ years old. The studied group showed levels of EL bigger than the control group (14911AU and 10250, 18AU) respectively ($p < 0.05$). We found no relation between glucose, HbA1c and EL.

Conclusion: In HUVEC cells there is a direct relation between extracellular glucose and EL. The diabetic patients had higher levels of EL than the control group, but these was not related with glucose or HbA1c, these shows the existence of other factors that participate in the increase of EL.

(Nutr Hosp. 2011;26:916-921)

DOI:10.3305/nh.2011.26.4.5130

Key words: Diabetes mellitus. Glucose. Endothelial lipase.

Correspondencia: Camila Pierart.
Departamento de Nutrición. Universidad de Chile.
Independencia 1027.
Independencia. Santiago. Chile.
E-mail: cpierart@med.uchile.cl

Recibido: 10-XI-2010.
Aceptado: 4-III-2011.

Abreviaturas

- LE: Lipasa endothelial.
DM2: Diabetes Mellitus tipo 2.
HUVEC: Células endoteliales humanas de cordón umbilical.
HbA1c: Hemoglobina glicosilada A1c.
NF-κB: Factor nuclear kappa B.

Introducción

Lipasa endotelial (LE) es una enzima descrita el año 1999, con una homología estructural con lipasa hepática y lipasa lipoprotéica^{1,2,3}. La principal diferencia de LE con respecto a otras lipasas está en el sitio de unión a sustratos, determinando una actividad principalmente sobre fosfolípidos, con un efecto menor sobre triglicéridos^{1,4,5}. Entre los factores que han demostrado ser un potente estímulo para la expresión de esta enzima destaca el efecto de citoquinas pro-inflamatorias, cuya presencia se asocia a un aumento en los niveles plasmáticos de LE^{6,7}. Por otra parte, la actividad física ha demostrado reducir la actividad enzimática en plasma, mientras que las estatinas reducen la expresión de la misma⁸.

Existe evidencia que sugiere que LE tiene un papel importante en el metabolismo de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Estudios en animales han demostrado que la sobreexpresión hepática de LE se asocia a una reducción significativa de los niveles plasmáticos de colesterol HDL (c-HDL)^{1,9}. Ratones transgénicos que sobreexpresan la enzima presentan una disminución moderada del c-HDL¹⁰, mientras que ratones deficientes en LE (LE^{-/-}) presentan un aumento de hasta un 50% del c-HDL¹⁰. La inhibición de la actividad de LE en ratones, con un anticuerpo anti-LE, ha determinado un aumento de 25-60% de los niveles de c-HDL¹¹. El efecto de LE en el metabolismo de las HDL en humanos es menos claro. Estudios de polimorfismos genéticos del gen de LE han identificado variantes funcionales de LE en personas con c-HDL elevado¹².

Algunos estudios en humanos han relacionado a LE con algunas patologías, principalmente de tipo cardiovascular. Badellino et al.¹³ reportó que la concentración plasmática de LE se asocia con la presencia de síndrome metabólico y aterosclerosis subclínica en sujetos con historia familiar de enfermedad coronaria prematura, mientras que Paradis et al.^{14,15} demostró una relación entre LE y la presencia de obesidad visceral e inflamación en hombres sedentarios.

Es conocido que la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) se asocia a un bajo grado de inflamación subclínica secundario a la presencia de hiperglicemia^{16,17}, por otra parte, el año 2001 Shiu et al.¹⁸ reportó que pacientes portadores de DM2 presentaban niveles plasmáticos de LE mayores que aquellos sujetos sin la enfermedad. Hasta la fecha no hay estudios que muestren la relación que existe entre glucosa y LE, por lo que se plantea la hipó-

tesis de que la concentración de glucosa extracelular participaría en la regulación de los niveles plasmáticos de la enzima.

Sujetos y método

Cultivo de células HUVEC

Para investigar el efecto de glucosa en la expresión de LE se cultivaron células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVEC). Se utilizaron segmentos de cordón umbilical obtenidos de partos normales en el Servicio de Obstetricia del Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile, previa obtención del consentimiento informado de las pacientes. Los segmentos de cordón fueron transportados en solución tampón de fosfato (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH7,4) y penicilina/estreptomina (100 UI-100 mg). Luego se canularon ambos extremos de la vena umbilical y se llenó con una solución de colagenasa tipo II (0,3 mg/ml), posteriormente la vena umbilical se incubó por 15 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, se recolectó la solución de colagenasa y se realizó un lavado con 10 ml de PBS. La suspensión celular obtenida se centrifugó a 1.800 g por 5 minutos; el sedimento se suspendió en medio M199 (Invitrogen) con suplemento al 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina-estreptomina (100 UI-100 mg) y 0,04 ug/ml factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), 50 U/ml Heparina, 0,5 mg/ml Hidrocortisona. Los cultivos se incubaron en atmósfera controlada con 5% de CO₂ y temperatura de 37°C hasta observar confluencia.

Una vez obtenida la confluencia se seleccionaron 3 placas que fueron estimuladas con distintas concentraciones de glucosa extracelular (5,5, 25 y 50,1 mmol/L de glucosa) durante 24 horas a 4°C.

La LE fue determinada mediante inmunotransferencia con un anticuerpo policlonal específico para LE (Biocant). Para realizar el western blot se utilizaron geles de poliacrilamida al 9%. Se cargaron 40 µl de muestra diluida y denaturada por pocillo en cada gel. Se realizó una electroforesis vertical a 80V por 10 minutos y luego a 120 V por 1 hora; la transferencia fue realizada a 90 mA por 90 minutos. Se lavaron las membranas en 3 oportunidades con solución salina de fosfato con detergente tween (PBST) 0,1% a temperatura ambiente, en agitación durante 10 minutos. Posteriormente se bloqueó durante 1 hora con PBST- albúmina bovina (BSA) 3% a temperatura ambiente. Se realizó la incubación de las membranas con el anticuerpo anti-LE (anticuerpo policlonal de conejo) a una dilución de 1:1000 en PBST-BSA 1% a 4°C, durante toda la noche. Finalmente se incubaron las membranas con anticuerpo secundario anti-conejo (BioRad) en una dilución de 1:3000 en PBST 0,1% por 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron reveladas con kit de quimioluminiscencia (Thermo Fisher Scientific). El

análisis de los geles se realizó con el programa ImageJ 1.36b, for MacOs X (NIH, USA). Los resultados obtenidos se expresaron como unidades arbitrarias (UA).

Efecto de glucosa en LE plasmática en sujetos con DM2

Para la evaluación del efecto de glucosa en los niveles plasmáticos de LE en sujetos con DM2, se reclutaron 24 pacientes que se encontraban bajo control en la unidad de diabetes del Centro Médico San Joaquín de la Pontificia Universidad Católica de Chile, entre abril y diciembre del año 2006, se recolectaron datos clínicos y de laboratorio. Se formó un grupo control con 8 muestras de sangre históricas provenientes de voluntarios sanos de edades similares. El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile y se obtuvo consentimiento informado de todos los sujetos incluidos en el estudio.

La glucosa plasmática fue medida en condiciones de ayuno por métodos enzimáticos (Roche/Hitachi) y la Hemoglobina glicosilada fracción A1c (HbA1c), por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc. Versión 4.0c para Macintosh, 1994-2005). Los resultados se expresaron como promedio y rango de distribución o desviación estándar. Para determinar la correlación entre las distintas variables, se utilizó el test estadístico de Pearson para el cálculo del coeficiente de correlación (r). En el caso de los datos sin distribución normal, se utilizaron test estadísticos no paramétricos (test de Wilcoxon y coeficiente de correlación de Spearman). Se consideró una diferencia estadísticamente significativa con un $p < 0,05$.

Resultados

Efecto de glucosa sobre la expresión de lipasa endotelial en células endoteliales humanas

LE se expresa en células HUVEC en condiciones basales, donde se reconocen en el experimento de western blot una banda de aproximadamente 55 kD que corresponde a la forma silvestre de la proteína¹. La realización de un experimento de western blot con concentraciones crecientes de proteína total (0, 20 y 40 ug), produce una curva proporcional en los niveles de LE, lo que sugiere que la enzima es específicamente detectada por el anticuerpo y que las variaciones en sus niveles pueden ser detectados por la técnica utilizada (no hay reacción en ausencia de proteína total y no hay

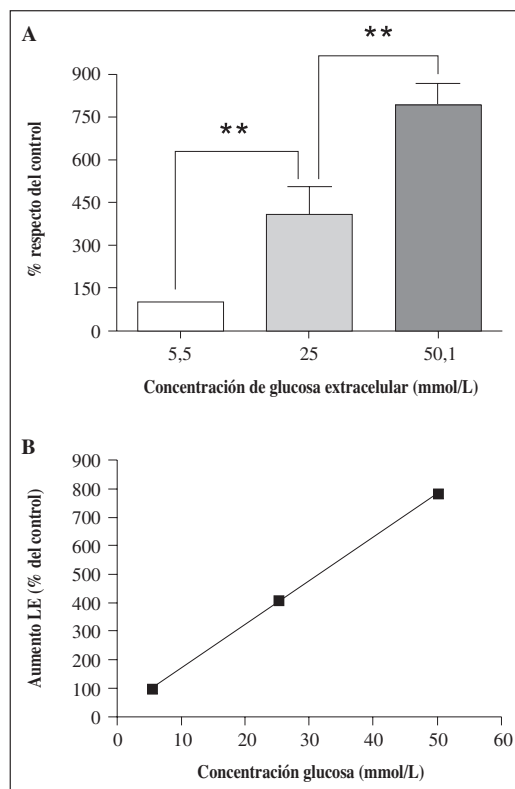


Fig. 1.—La cantidad relativa de lipasa endotelial es proporcional a los niveles extracelulares de D-glucosa. A) Niveles relativos de LE representados como porcentaje respecto del control normoglicémico (5,5 mmol/L) en células HUVEC expuestas durante 24 h a 5,5, 25 y 50,1 mmol/L de D-glucosa. B) Análisis de regresión lineal de los niveles relativos de LE y la concentración extracelular de D-glucosa mostrados en A. $n = 3$, $* p < 0,05$.

saturación al cargar mayor cantidad de proteínas). La realización de un experimento de western blot en ausencia de anticuerpo primario contra LE no produce la presencia de ninguna banda (dato no mostrado).

La estimulación de las células de cultivo con una concentración de 25 mmol/L de glucosa extracelular durante 24 horas se asoció a un aumento significativo en los niveles relativos de LE ($p < 0,005$). En las células que fueron estimuladas con una concentración de glucosa extracelular de 50,1 mmol/L durante el mismo período de tiempo, los niveles relativos de LE aumentaron aún más, $p < 0,005$ (figura 1A). Para descartar que este efecto fuera producto del cambio en la osmolaridad del medio extracelular, se realizó el mismo experimento utilizando manitol en las mismas concentraciones que la glucosa por 24 horas, sin que se observara un cambio en los niveles de LE (dato no mostrado). El aumento de glucosa extracelular y el aumento de lipasa fueron proporcionales (fig. 1B), lo que sugiere que en células HUVEC existe un efecto directo y que a mayor concentración de glucosa extracelular mayor es la expresión enzimática.

Tabla I
Características generales del grupo estudiado

	Hombres	Mujeres	Grupo total
n	9	15	24
Edad (años)	54,5 (42-67)	63,3 (45-83)	60 (42-83)
Tiempo de evolución (años)	9,2 (0,25-20)	11,7 (3-25)	10,7 (0,25-25)
HTA	4	13	17
DLP	4	13	17
Tabaco	5	0	5
IMC (kg/m ²)	27,2 (22,6-33,7)	29,1 (22-38,5)	28,5 (22-38,5)
CC (cm)	93,1 (82-113)	99,03 (83-119)	96,8 (82-119)

HTA = hipertensión arterial; DLP = dislipidemia; IMC = índice de masa corporal; CC = circunferencia de cintura; n = 24.

Tabla II
Niveles plasmáticos de lipasa endotelial y parámetros de control metabólico en pacientes diabéticos tipo 2

Parámetro	Resultados medición
Lipasa endotelial (UA)	14,911 ± 5,377
Glicemia (mg/dl)	168 ± 56,9
HbA1c (%)	10,28 ± 1,11

Los datos se presentan como promedio ± desviación estándar; n = 24; HbA1c = hemoglobina glicosilada fracción A1c; UA = unidades arbitrarias; NS = no significativo.

Determinación de las diferencias en los niveles relativos de lipasa endotelial en el suero de pacientes diabéticos tipo 2 y en sujetos sanos

El grupo de estudio estaba compuesto por 24 pacientes, 62,5% de ellos mujeres, edad promedio de 60 ± 9,7 años. En la tabla I se resumen las características generales del grupo estudiado. En la tabla II se muestran los resultados de las mediciones de LE y de los parámetros metabólicos analizados. Se formó un grupo control con 8 muestras de sangre históricas de voluntarios que cumplieron con el requisito de no presentar antecedentes médicos y con un estado nutricional normal al momento de la toma de la muestra. En este grupo se midió sólo LE.

Los sujetos no diabéticos presentan niveles comparables de lipasa endotelial medida en idénticas condiciones experimentales, con un promedio de dos mediciones de 10.250,18 UA (7.140-14.021 UA, p > 0,05, n = 8). Los niveles medios de LE en pacientes diabéticos tipo 2 fueron de 14.911 UA (5.844-28.429 UA, p < 0,05, n = 24). En la figura 2 se muestra la diferencia que existe en los niveles medios de LE entre el grupo control y el grupo de pacientes diabéticos estudiados (p = 0,02).

Basándose en los hallazgos en células HUVEC, se estudió la relación que existe entre los niveles de la enzima en plasma y la glicemia de ayuno en el grupo de pacientes diabéticos. Como se muestra en la figura

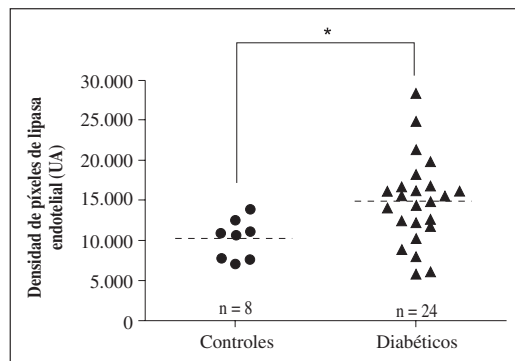


Fig. 2.—Los niveles plasmáticos de lipasa endotelial son mayores en diabéticos tipo 2 que en sujetos no diabéticos. Gráfico que muestra los valores relativos de LE medidos a través de densitometría de píxeles y expresados en unidades arbitrarias (UA) de 8 sujetos controles (círculos) y 24 sujetos diabéticos tipo 2 (triángulos). Cada punto representa el promedio de dos mediciones en cada individuo. * = p < 0,05.

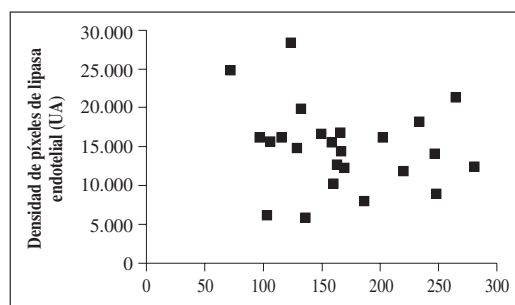


Fig. 3.—Los niveles plasmáticos de lipasa endotelial no se relacionan con la glicemia de ayuno en pacientes con diabetes tipo 2. Diagrama de dispersión que muestra los valores de glicemia (mg/dl) y LE (UA). n = 24, p > 0,05.

3, a diferencia de lo encontrado en el cultivo celular, no hubo asociación entre la glicemia basal y LE (r -0,18, IC 95% -0,54-0,23, p = 0,39). Al realizar el mismo análisis utilizando la HbA1c como parámetro para determinar el control metabólico, tampoco se encontró correlación con los niveles de LE (r -0,17, IC 95% -0,54-0,24, p = 0,41) (fig. 4).

Discusión

Estudios in vitro, en modelos animales y en humanos han determinado que LE participaría en la regulación de los niveles plasmáticos de c-HDL, reconocido actualmente como un factor de riesgo cardiovascular cuando sus niveles plasmáticos se reducen^{19,20,21,22}. Se han reportado algunos factores involucrados en el aumento de la expresión de LE, lo que se asocia a una disminución de los niveles plasmáticos de c-HDL; entre estos factores se encuentran las interleuquinas inflamatorias^{6,15}, el síndrome metabólico¹³, la hiperinsu-

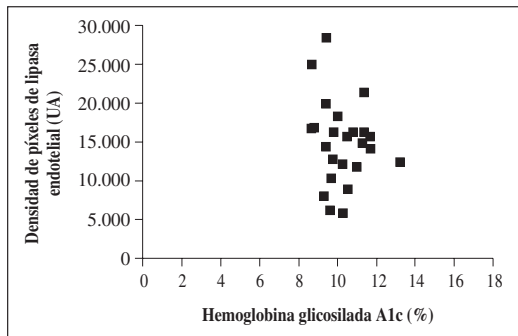


Fig. 4.—No existe asociación entre los niveles de lipasa endotelial en plasma y el control metabólico de la enfermedad, según la HbA1c, en pacientes con diabetes tipo 2. Diagrama de dispersión que muestra los valores de HbA1c (%) y LE (UA) en plasma en 24 sujetos diabéticos tipo 2. $p > 0,05$.

linemia y la obesidad²³. Un estudio reciente reportó que los pacientes con DM2 tienen niveles plasmáticos de LE más elevados que las personas no diabéticas¹⁸, pero en nuestro conocimiento, no existen hasta el momento estudios sobre las posibles causas de este fenómeno, lo que abre un nuevo espectro en el estudio de los factores que pueden influir en el aumento del riesgo cardiovascular de este grupo de pacientes.

En este estudio, nuestro grupo encontró que en cultivos celulares existe un aumento en los niveles de LE a medida que aumenta la concentración de glucosa extracelular, lo que permite suponer que la glucosa tiene un efecto directo sobre los niveles de la enzima. Basado en la literatura, es posible plantear como mecanismo para explicar este aumento de expresión de LE, en condiciones de alta glucosa extracelular, la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B)²⁴. Es conocido que la hiperglicemia, a través de la glucólisis, activación de la vía del sorbitol y la oxidación de la glucosa, produce activación de la Proteína Kinasa C (PKC), potente activador de NF- κ B. Estudios recientes han demostrado que en la región promotora del gen de LE existe un sitio de unión para NF- κ B y que la activación de este factor aumenta la transcripción del gen de la enzima²⁵.

Por otra parte, los resultados obtenidos en este estudio muestran que los pacientes diabéticos tipo 2, con mal control metabólico, tienen niveles plasmáticos significativamente mayores de LE en comparación con sujetos controles sin la enfermedad, lo que concuerda con datos publicados previamente en la literatura. Basado en los hallazgos en células de cultivo se podría plantear que la condición de hiperglicemia crónica en los pacientes diabéticos tipo 2 se asocia a la activación del factor nuclear κ B^{16,26,27,28}, lo que a su vez estimularía la transcripción del gen de la enzima, como ya se mencionó previamente.

Sin embargo, a diferencia del estudio en células de cultivo, no se encontró ninguna relación entre los niveles de glicemia ni HbA1c, y LE, hallazgo similar a lo encontrado por Shiu y cols¹⁸. Esto podría explicarse por

la presencia en los pacientes diabéticos de una serie de factores que pueden participar en la activación de NF- κ B y de esta manera estimular la expresión de la enzima. Dentro de estas condiciones se encuentran la obesidad, a través de factores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral α (FNT- α), interleuquina 6 (IL-6), angiotensinógeno y factor de crecimiento transformante β (TGF- β)^{29,30} y la hipertensión arterial, a través del aumento de la angiotensina II³¹.

Conclusión

En conclusión, las células HUVEC expresan LE en condiciones basales y esta expresión aumenta, en forma significativa y proporcional, en presencia de concentraciones crecientes de glucosa extracelular. El grupo de pacientes con DM2 estudiado tiene concentraciones plasmáticas de LE mayores que los sujetos sin la enfermedad pero esto no puede ser explicado sólo por los niveles de glucosa plasmática, lo que sugiere la participación de factores adicionales en la modulación de los niveles séricos de LE en las personas portadoras de esta enfermedad.

Referencias

- Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, Marchadier D, Maugeais C, Doan K, South V, Amin D, Perrone M, Rader D. A novel endothelial derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nature Genetics* 1999; 21: 424-428.
- Hirata K, Dichek H, Cioffi J, Choi S, Leeper N, Quintana L, Kronmal G, Cooper A, Quertermous T. Cloning a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family. *J Biol Chem* 1999; 274: 1470-1475.
- Murthy V, Julien P, Gagné C. Molecular pathobiology of the human lipoprotein lipase gene. *Pharmacol Ther* 1996; 70: 101-135.
- Griffon N, Budreck E, Long C, Broedl U, Marchadier D, Glick J, Rader D. Substrate specificity of lipoprotein lipase and endothelial lipase: studies of lid chimeras. *J Lipid Res* 2006; 47: 1803-1811.
- McCoy M, Sun G, Marchadier D, Maugeais C, Glick J, Rader D. Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase. *J Lipid Res* 2002; 43: 921-929.
- Hirata K, Ishida T, Matsushita H, Tsao P, Quertermous T. Regulated expression of endothelial cell derived lipase. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 272: 90-93.
- Jin W, Sun G, Marchadier D, Octaviani E, Glick J, Rader D. Endothelial cells secrete triglyceride lipase and phospholipase activities in response to cytokines as a result of endothelial lipase. *Cir Res* 2003; 92: 644-650.
- Halverstedt A, Phares D, Ferrel R, Wilund K, Goldberg A, Hagberg J. High density lipoprotein cholesterol, its subfraction and responses to exercise training are dependent on endothelial lipase genotype. *Metabolism* 2003; 52: 1505-1511.
- Maugeais C, Tietge U, Broedl U, Marchadier D, Cain W, McCoy M, Lund-Katz S, Glick J, Rader D. Dose dependent acceleration of high density lipoprotein catabolism by endothelial lipase. *Circulation* 2003; 108: 2121-2126.
- Ishida T, Choi S, Kundu RK, Hirata K, Rubin E, Cooper A, Quertermous T. Endothelial lipase is a major determinant of HDL level. *J Clin Invest* 2003; 111: 347-355.
- Jin W, Millar J, Broedl U, Glick J, Rader D. Inhibition of endothelial lipase causes increased HDL cholesterol levels in vivo. *J Clin Invest* 2003; 111: 357-362.

12. DeLmos A, Wolfe M, Long C, Sivapackianathan R, Rader D. Identification of genetic variants in Endothelial lipase in persons with elevated high density lipoprotein cholesterol. *Circulation* 2002; 106: 1321-1326.
13. Badellino K, Wolfe M, Reilly M, Rader D. Endothelial lipase concentrations are increased in metabolic syndrome and associated with coronary atherosclerosis. *PLoS Medicine* 2006; 3: 245-252.
14. Paradis M, Badellino K, Rader D, Deshaies Y, Couture P, Archer W, Bergeron N, Lamarche B. Endothelial lipase is associated with inflammation in humans. *J Lipid Res* 2006; 47: 2808-2813.
15. Badellino K, Wolfe M, Reilly M, Rader D. Endothelial lipase is increased in vivo by inflammation in humans. *Circulation* 2008; 117: 678-685.
16. Guha M, Bai W, Nadler J, Natarajan R. Molecular mechanism of Tumor Necrosis Factor a gene expression in monocytic cells via hiperglicemia induced oxidant stress dependent and independent pathways. *J Biol Chem* 2000; 275: 17728-17739.
17. Dasu M, Devaraj S, Jialal I. High glucose induces IL-1 beta expression in human monocytes: mechanistic insight. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E337-E346.
18. Shiu S, Tan K, Huang Y, Wong Y. Type 2 diabetes mellitus and endothelial lipase. *Atherosclerosis* 2008; 198: 441-7.
19. Wilson P, Abbot R, Castelli W. High density lipoprotein cholesterol and mortality: the Framingham Heart Study. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 737-741.
20. Goldbourt U, Yaari S, Medalie J. Isolated low HDL cholesterol as a risk factor for coronary heart disease mortality. 21 years follow up of 8000 men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 107-113.
21. Schaefer E. Familial lipoprotein disorders and premature coronary artery disease. *Med Clin North Am* 1994; 78: 21-39.
22. Gordon D, Knoke J, Probstfield J, Superko B, Tyroler H. High density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease in hypercholesterolemic men: the Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial. *Circulation* 1986; 74: 1217-1225.
23. Paradis M, Badellino K, Rader D, Tchamof A, Richard C, Luu-The V, Deshaies Y, Begeron J, Archer W, Couture P, Bergeron N, Lamarche B. Visceral adiposity and endothelial lipase. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 3538-3543.
24. González F, Rote N, Minium J, Kirwn J. Increased activation of nuclear factor B triggers inflammation and insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1508-1512.
25. Kempe S, Kestler H, Lasar A, Wirth T. NF-kB controls the global pro-inflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 5308-19.
26. Barnes P, Karin M. Nuclear factor B: A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-1071.
27. Tak P, Firestein G. NF-kB: a key role in inflammatory disease. *J Clin Invest* 2001; 107: 7-11.
28. Baldwin A. Series Introduction: The transcription factor NF- B and human disease. *J Clin Invest* 2001; 107: 3-5.
29. Ghanim H, Ajada A, Daoud N, Deopurkar R, Chandhuri A, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in proinflammatory state. *Circulation* 2004; 110: 1564-1571.
30. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 911-919.
31. Das U. Is angiotensin-II an endogenous proinflammatory molecule? *Med Sci Monit* 2005; 11:155-162.