

Grande Acúmulo de Colágeno e Aumento da Ativação de Mastócitos nos Corações de Ratos com Hiperlipidemia

Large Accumulation of Collagen and Increased Activation of Mast Cells in Hearts of Mice with Hyperlipidemia

Yunpeng Cheng,¹ Yanqiu Zhu,² Jiashu Zhang,³ Xingping Duan,³ Ying Zhang¹

Department of Cardiology - the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University;¹ Department of Ultrasonics - Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University;² College of Pharmacy - Dalian Medical University³ - China

Resumo

Fundamentos: A hiperlipidemia, que se caracteriza por uma elevação dos lipídeos na corrente sanguínea, é um importante fator de risco para a doença cardíaca.

Objetivos: O presente estudo investigou o papel da fibrose na progressão da hiperlipidemia no coração do rato e se a ativação dos mastócitos estava associada ao processo de fibrose.

Método: A hiperlipidemia foi produzida em ratos C57BL/6 alimentando-os com uma dieta rica em gordura durante 8 semanas. Para avaliar a fibrose tecidual, foi realizada coloração vermelha picro-Sirius. A coloração com hematoxilina e eosina (H & E) foi feita para identificar as alterações histopatológicas nos corações. A imuno-histoquímica também foi levada a cabo para determinar a localização do fator de crescimento transformante (TGF) - β e α -actina do músculo liso (α -SMA). O Western Blot foi realizado para analisar as expressões de quimase, triptase, TGF- β , α -SMA e a atividade da via Wnt / β -catenina. Finalmente, se mediram os níveis séricos de colesterol total (TC) e triglicérides (TG). Todos os valores foram expressos como média \pm DP, o nível de significância estatística adotado foi de 5%.

Resultados: Os ratos hiperlipidêmicos mostraram aumento significativo da deposição de colágeno nos corações em comparação com ratos normais. Além disso, a coloração de H & E mostrou degeneração celular significativa. O músculo cardíaco estava em desordem com ruptura de fibras em ratos do grupo modelo. A análise imuno-histoquímica e o Western Blot revelaram que os níveis de expressão de triptase, quimase, β -catenina, TGF- β e α -SMA estavam significativamente aumentados nos ratos hiperlipidêmicos em comparação com o grupo controle.

Conclusões: Os resultados indicaram que a ativação de mastócitos pode induzir fibrose cardíaca por triptase e quimase em hiperlipidemia, a qual teve uma relação estreita com a atividade aumentada da via TGF- β / Wnt / β -catenina. (Arq Bras Cardiol. 2017; 109(5):404-409)

Palavras-chave: Ratos, Hiperlipidemias / fisiopatologia; Coração; Fibrose; Leucemia de Mastócitos.

Abstract

Background: Hyperlipidemia, which is characterized by an elevation of lipids in the bloodstream, is a major risk factor for cardiac disease.

Objectives: The present study investigated the role of fibrosis in the progression of hyperlipidemia in the mice heart, and whether mast cell activation was associated with the fibrosis process.

Methods: Hyperlipidemia was produced in C57BL / 6 mice by feeding them on a high-fat diet for 8 weeks. To assess tissue fibrosis, picrosirius red staining was performed. Hematoxylin & eosin (H&E) staining was performed to identify the histopathological changes in the hearts. Immunohistochemistry was also accomplished to determine the localization of transforming growth factor (TGF)- β and α -smooth muscle actin (α -SMA). Western blotting was performed to analyze the expression of chymase, tryptase, TGF- β , α -SMA and activity of Wnt/ β -catenin pathway. At the end, serum total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) levels were measured. All the values were expressed as means \pm SD, the statistical significance level adopted was 5%.

Results: Hyperlipidemia mice showed significantly increased collagen deposition in the hearts compared with normal mice. In addition, H&E staining showed significant cellular degeneration. Cardiac muscle was arranged in disorder with fracture in mice of the model group. Immunohistochemistry and western blot analysis revealed that expression levels of tryptase, chymase, β -catenin, TGF- β and α -SMA were significantly increased in the hyperlipidemia mice compared with the control group.

Conclusions: The results indicated that mast cell activation might induce cardiac fibrosis by tryptase and chymase in hyperlipidemia, which had a close relationship with the increased activity of TGF- β /Wnt/ β -catenin pathway. (Arq Bras Cardiol. 2017; 109(5):404-409)

Keywords: Rats; Hyperlipidemias / physiopathology; Heart; Fibrosis; Leukemia, Mast-Cell.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Ying Zhang •

116044, Dalian, Liaoning – China

E-mail: zhangying_xn@163.com

Artigo recebido em 14/02/2017, revisado em 25/05/2017, aceito em 03/07/2017

DOI: 10.5935/abc.20170143

Introdução

A hiperlipidemia se refere à hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hiperlipidemia mista e é um distúrbio bioquímico muito comum¹ com risco significativo de doença cardiovascular.^{2,3} É relatado que a hiperglicemia, outra desordem metabólica, tem uma forte associação com a fibrose cardíaca que pode reduzir a distensibilidade miocárdica e contribuir para a patogênese da insuficiência cardíaca.^{4,5} No entanto, o papel da hiperlipidemia no desenvolvimento de fibrose cardíaca é pouco compreendido.

A fibrose cardíaca, que é uma característica patológica comum da doença cardíaca em estágio final, sempre resulta em disfunção cardíaca grave.^{6,7} Portanto, as causas potenciais da fibrose cardíaca devem ser investigadas. Embora a fibrose cardíaca seja um estágio importante na progressão da doença cardíaca, os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento e progressão dela ainda não são claros. O processo de fibrose é mecanicamente caracterizado por acumulação de miofibroblasto, deposição de colágeno, remodelação da matriz extracelular e aumento da rigidez do tecido, de modo que prejudica a função do órgão, reduzindo a elasticidade e distensibilidade do tecido. Conforme relatado, a via de sinalização Wnt / β -catenina / TGF- β é um mediador chave da ativação de fibroblastos^{8,9} e desempenha um papel importante na condução da síntese aberrante da matriz extracelular em doenças fibróticas cardíacas.^{10,11}

Os mastócitos foram reconhecidos como importantes células efetoras na fibrose tecidual.^{12,13} Potencialmente a ativação e desgranação de mastócitos podem resultar na liberação de mediadores inflamatórios e profibróticos que promovam a fibrose tecidual.¹⁴ Os mastócitos expressam proteases de serina, triptase e quimase que estão associadas à fibrose em várias doenças.^{15,16} Conforme relatado, a hiperlipidemia pode distorcer a regulação transcricional dos fatores pró-inflamatórios da célula mieloide, incluindo os mastócitos, para promover o extravasamento e a aterosclerose das células mieloides.^{17,18} No entanto, pouco se sabe sobre o envolvimento deles na fibrose cardíaca em ratos com hiperlipidemia.

Neste estudo, buscamos pesquisar se a hiperlipidemia está associada à fibrose cardíaca. Além disso, avaliamos a atividade da via TGF- β / Wnt / β -catenina, os níveis de expressão de triptase, quimase e α -SMA em ratos hiperlipidêmicos.

Métodos

Declaração de ética em animais

Os ratos C57BL/6 de oito semanas de idade foram comprados no Centro Experimental Animal da Universidade Médica de Dalian (Dalian, China). Os ratos podiam acessar a água e os alimentos ad libitum, mas jejuavam durante a noite com água disponível antes da cirurgia. Todas as experiências em animais foram aprovadas pelo comitê de ética da Dalian Medical University e realizadas de acordo com as diretrizes institucionais e de acordo com a Declaração de Helsinque.

Indução de hiperlipidemia experimental

Por meio da tabela de números aleatórios, os animais foram divididos em dois grupos experimentais ($n = 8$, por conveniência): o grupo controle recebeu uma dieta normal e o grupo de hiperlipidemia (lípidos H) recebeu dieta rica em gordura (HFD, D12451, Dieta de pesquisa, EUA) durante 8 semanas. A hiperlipidemia foi documentada estimando o nível de colesterol total (TC) e triglicérides (TG) no soro usando kits comercialmente disponíveis (*Jiancheng Biotech*, Nanjing, China).

Alterações morfológicas

Após 8 semanas de dieta rica em gordura, os ratos foram sacrificados. Os corações dos ratos foram removidos e fixados em formalina neutra 10% (v/v) e processados por técnicas histológicas padrão. Os corações foram corados com hematoxilina e eosina (H & E) e picro-Sirius. Em seguida, foram examinadas as alterações morfológicas. Os corações de ratos também foram usados para determinar a expressão proteica de quimase, triptase, TGF- β , β -catenina e α -SMA por análise Western Blot e coloração imuno-histoquímica.

Análise Western Blot

De acordo com as instruções do fabricante, as proteínas foram extraídas dos corações de ratos com kit de extração de proteína (*KeyGen Biotech*, Nanjing, China). A proteína foi medida de acordo com o procedimento de ácido bicinonínico (BCA) (*Solarbio*, Pequim, China), com albumina de soro bovino como padrão. As proteínas (20 μ g) foram ressuspensas em tampão de amostra de eletroforese contendo β -mercaptoetanol e separadas por eletroforese num gel SDS-poliacrilamida 10% pré-moldado (*Bio-Rad*, Hercules, CA), seguido de transferência eletrônica a uma membrana PVDF (*Millipore*, Bedford, MA). As membranas foram bloqueadas usando 5% de leite sem gordura em solução salina tamponada com Tris com 0,1% de Tween-20 (TBST) durante 2h a 37°C. A β -Actina serviu como controle de carga. As membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com uma diluição 1: 1000 de anticorpo policlonal para triptase, quimase, TGF- β , β -catenina e α -SMA, respectivamente (*Pequim Boysisynthesis biotechnology*, China) e com uma diluição de 1: 1500 de anticorpo monoclonal para β -actina (*Beyotime*, China). Após a lavagem subsequente com TBST, foram então incubadas com anticorpos secundários. Após uma extensa lavagem com TBST, as membranas foram expostas aos reagentes mais avançados de quimioluminescência (ECL) do *Beyotime Institute of Biotechnology* (Haimen, China) de acordo com o protocolo do fabricante. A luz emitida foi documentada com um sistema de imagem multiespectral *BioSpectrum-410* com uma câmera *Chemi HR 410* (*Bio-Rad*, Hercules, CA, EUA). As bandas de proteínas foram visualizadas e fotografadas sob luz ultravioleta transmitida. A imagem foi utilizada para medições semiquantitativas com base na densitometria de banda.

Coloração imuno-histoquímica

Seções histológicas de corações de ratos (4 μ m de espessura) foram montadas em lâminas revestidas de poli-L-lisina.

As lâminas foram desparafinadas em xileno e reidratadas em álcoois graduados. As seções foram pré-tratadas com solução reguladora de citrato (0,01 mol/L de ácido cítrico, pH 6,0) durante 20 min a 95°C. Em seguida, à temperatura ambiente foram imersos em PBS contendo 3% de H₂O₂ durante 10 min. Depois de expô-las a 10% de soro de cabra normal em PBS durante 30 min à temperatura ambiente, as seções de tecido foram incubadas a 4°C durante a noite com anti- α -SMA e TGF- β policlonais de coelho (diluição 1: 100). Em seguida, seções foram enxaguadas com PBS, incubadas com anticorpo de coelho-anti IgG de cabra biotinizada durante 20 minutos à temperatura ambiente e tratadas com cromogênio de 3,30-diaminobenzidina durante 5 min à temperatura ambiente. Finalmente, as seções foram contrastadas com hematoxilina durante 6 min.

Quantificação de colágeno

Foi realizada coloração vermelha de picro-Sirius em tecidos seccionados em série. Os tecidos embebidos em parafina foram desparafinados em xileno, reidratados em álcoois graduados e depois incubados em vermelho Sirius 0,1% durante 1 h à temperatura ambiente. Finalmente, as seções foram contrastadas com hematoxilina durante 2 min. As seções foram estudadas sob um microscópio de luz em diferentes ampliações.

Análise de dados

A análise estatística foi calculada usando o software SPSS 13.0. Os dados do grupo foram expressos como média \pm S.D. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados estudados e, então, foram utilizados testes paramétricos ou não paramétricos para análise de distribuição de dados normal ou não normal, respectivamente. Os dados com distribuição normal foram submetidos à teste *t* de Student da amostra. Em todas as análises estatísticas, $p < 0,05$ de dois lados foi considerado para indicar um resultado estatisticamente significativo.

Resultados

A bioquímica sérica mudou após o tratamento com dieta rica em gordura

Após a alimentação contínua com dieta rica em gordura durante 8 semanas, os níveis séricos de TC e TG no grupo H-lípido foram significativamente maiores que os do grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1 – Níveis séricos de TC e TG após dieta rica em gordura durante 8 semanas. (mmol/l)

Grupo	TG	TC
Controle	0,73 \pm 0,12	1,87 \pm 0,25
H-lípido	1,21 \pm 0,13	3,34 \pm 0,33
Valor de p	< 0,05	< 0,05

TC: colesterol total; TG: triglicerídeos.

Exames histológicos

A coloração H & E de tecidos do coração mostraram que as fibras do miocárdio no grupo de controle estavam em ordem e a sua estrutura era normal. Não houve fibra rompida, o núcleo da célula do miocárdio estava normal. No entanto, a fibra muscular estava disposta em desordem, amplamente colapsada e degenerada no grupo hiperlipidemia (Figura 1).

Hiperlipidemia aumenta a produção da quimase e triptase de mastócitos

Desde que a protease dos mastócitos desempenha um papel essencial no processo de fibrose, seus níveis de produção no caso de hiperlipidemia seria a nossa preocupação. Para investiga-la, corações de ratos foram removidos imediatamente após o sacrifício para análise de Western blot. Os resultados do Western blot mostraram que a expressão de proteínas de quimase e triptase estava significativamente aumentada em comparação com o grupo de controle (Figura 2)

Hiperlipidemia promoveu atividade de TGF- β e via Wnt/ β -catenina

TGF- β é uma citocina pró-fibrótica que induz a proliferação de fibroblastos e macrófagos, por meio da indução de outros fatores de crescimento. A via de sinalização / β -catenina Wnt é essencial para a fibrose induzida por TGF- β . A análise de Western blot de TGF- β e β -catenina mostrou um aumento da expressão de ambas as proteínas que era evidente no grupo H-lípido comparado com o grupo de controle. (Figura 2).

Os resultados de imuno-histoquímica foram semelhantes aos mencionados acima. As expressões proteicas de TGF- β em corações do grupo H-lípido dos ratos estavam significativamente aumentadas em comparação com o grupo de controle (Figura 3).

A hiperlipidemia induziu grande deposição de colágeno no coração

A coloração picro-Sirius vermelha sugeriu significativo maior teor de colágeno no grupo H-lípido, quando comparado com os grupos de controle (figura 4). Além disso, os resultados da imuno-histoquímica (Figura 5) e do Western blot (Figura 2) mostraram que os níveis de expressão de α -SMA no tecido do coração do grupo H-lípido estavam significativamente aumentados em comparação com o grupo de controle.

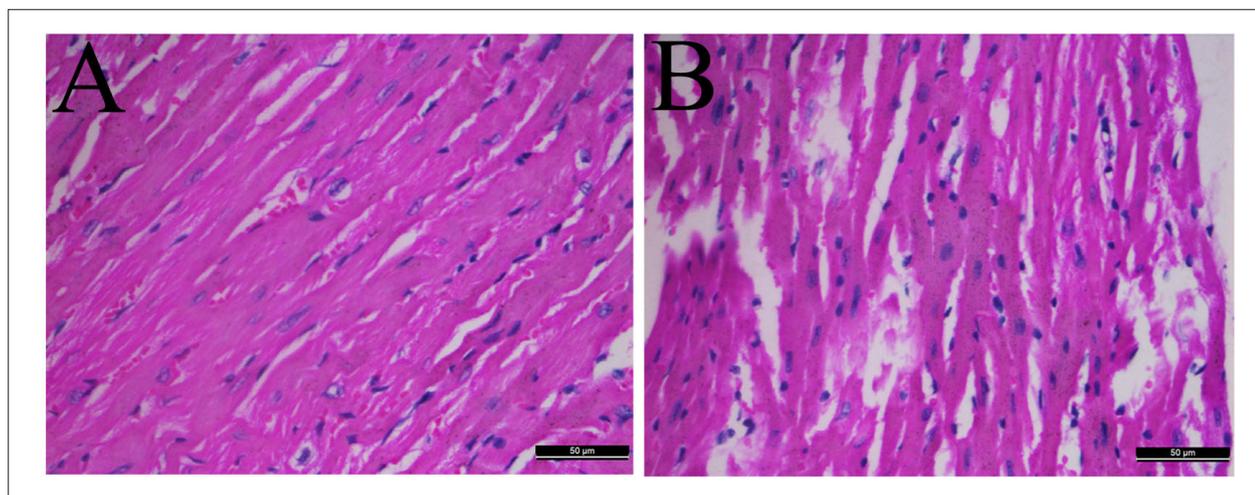


Figura 1 – Mudança em microfotografias cardíacas de ratos hiperlipidêmicos. Os corações foram corados com H & E (A-B). Seções representativas dos corações de um rato de controle (A), rato hiperlipidêmico (B). H & E, ampliação $\times 400$.

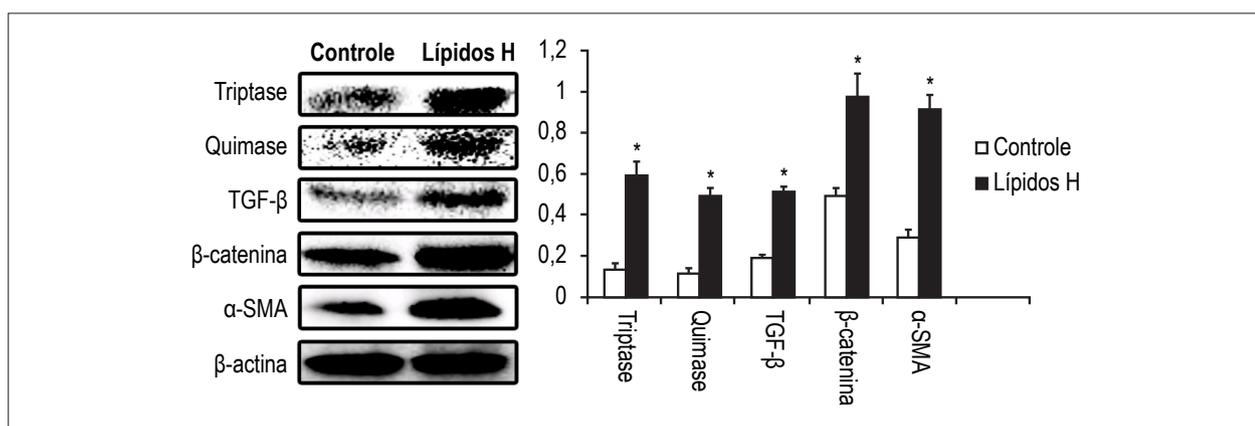


Figura 2 – Efeito da hiperlipidemia na expressão proteica da triptase, da quimase, do TGF-β, da β-catenina e da α-SMA nos corações dos ratos hiperlipidêmicos. O gráfico de barras mostra a relação de expressão relativa de cada proteína calculada após a normalização por β-actina. Os dados são expressos como média \pm SD. (* $p < 0,05$ versus grupo controle; $n = 8$).

Discussão

A hiperlipidemia é um distúrbio clínico e metabólico caracterizado pela elevação anormal dos principais lipídeos circulatórios e dos níveis de lipoproteínas que representa aproximadamente 56% dos casos de doenças cardiovasculares no mundo e causa ao redor de 4,4 milhões de mortes anuais.¹⁹ Como foi informado, o risco de morte por cardiopatia isquêmica é significativamente alto em pacientes com hiperlipidemia essencial.²⁰

Além disso, relatou-se que a dieta de alto conteúdo calórico poderia induzir hiperlipidemia e promover a lesão cardíaca e a insuficiência em ratos.²¹ Há porém, pouco conhecimento sobre os mecanismos subjacentes nestas mudanças biológicas. A fibrose cardíaca é uma característica patológica comum da doença cardíaca em estágio final. Portanto, como as causas potenciais da fibrose cardíaca devem ser investigadas, pesquisamos se a hiperlipidemia está associada à progressão da fibrose cardíaca, contribuindo para a patogênese da

insuficiência cardíaca. No presente estudo, o nível de TC e TG no soro foi significativamente maior no grupo H-lipídico, o que indica que o modelo de ratos com hiperlipidemia foi estabelecido com sucesso. Em seguida, pesquisamos as alterações na morfologia cardíaca dos ratos por coloração H & E. Os resultados mostraram uma camada muscular do coração disposta em desordem com ruptura em ratos do grupo modelo. A coloração vermelha de picro-Sirius sugeriu um teor de colágeno significativamente maior no grupo H-lipídico em comparação com os grupos controle, e o Western Blot mostrou que o nível de expressão de α-SMA, conhecido como marcador de miofibroblasto, no grupo lipídeos foi significativamente maior do que no grupo de controle. Os mastócitos foram reconhecidos como importantes células efetoras na fibrose tecidual. Conforme relatado, os mastócitos expressam proteases de serina; triptase e quimase as quais estão associadas à fibrose em várias doenças. No entanto, pouco se sabe sobre seu envolvimento em doenças cardíacas induzidas por hiperlipidemia. No nosso estudo, os resultados

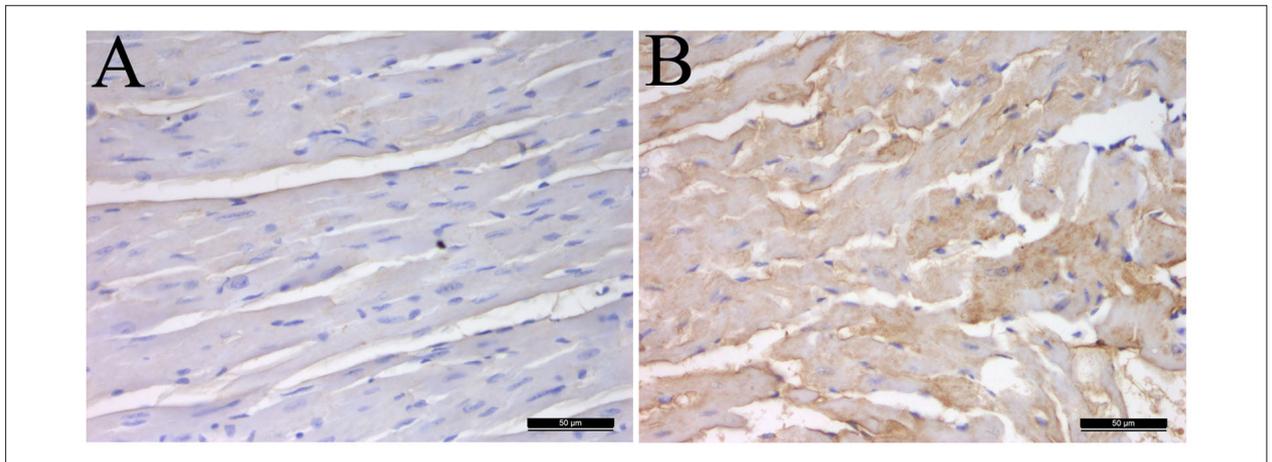


Figura 3 – Efeito da hiperlipidemia na expressão proteica de TGF- β nos corações dos ratos hiperlipidêmicos. Os corações foram imunohistoquimicamente corados (A-B). Seções representativas dos corações de um rato de controle (A), um rato hiperlipidêmico (B). Coloração imuno-histoquímica, ampliação $\times 400$.

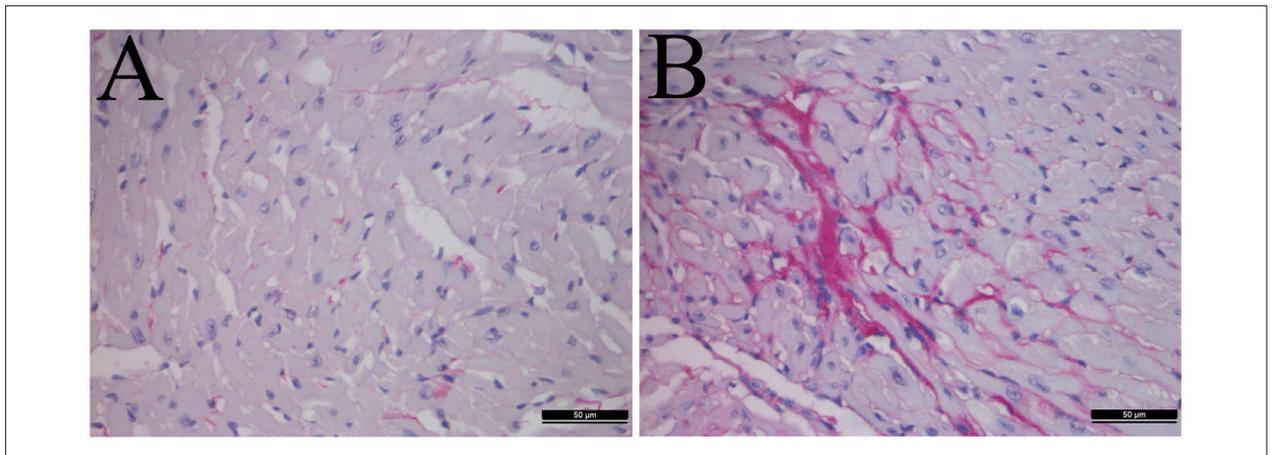


Figura 4 – Efeito da hiperlipidemia na acumulação de colágeno nos corações dos ratos hiperlipidêmicos. Os corações foram corados com picro-Sirius vermelho (A-B). Seções representativas dos corações de um rato de controle (A), rato hiperlipidêmico (B). Picro-Sirius coloração vermelha, ampliação $\times 400$.

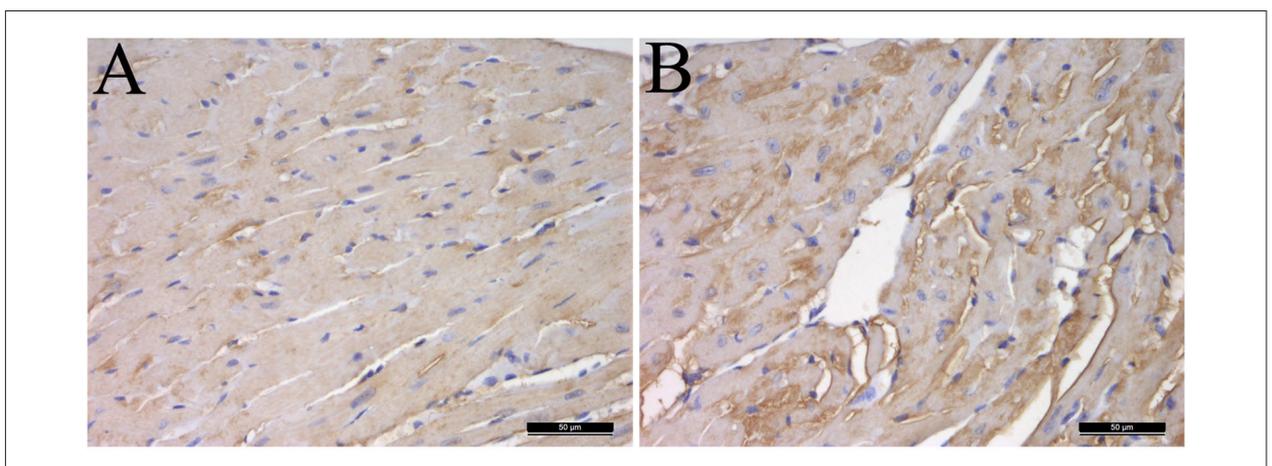


Figura 5 – Efeito da hiperlipidemia na expressão proteica de α -SMA em corações de ratos hiperlipidêmicos. Os corações foram imunohistoquimicamente corados (A-C). Seções representativas dos corações de um rato de controle (A), rato hiperlipidêmico (B). Coloração imuno-histoquímica, ampliação $\times 400$.

de Western blot mostraram que as expressões proteicas de triptase e de quimase no coração de ratos do grupo H-lipídico estavam aumentadas em comparação com o grupo controle. Para explorar ainda mais o mecanismo molecular da fibrose cardíaca em ratos de hiperlipidemia, utilizando análise Western Blot e coloração imuno-histoquímica, examinamos as expressões proteicas de TGF- β que estão intrinsecamente ligadas aos efeitos profibróticos dos mastócitos e a via Wnt / β -catenina que é essencial para a fibrose induzida por TGF- β . Os resultados da análise Western Blot e da coloração imuno-histoquímica demonstraram que as expressões proteicas de TGF- β no coração do grupo de ratos H-lípidos aumentaram significativamente em comparação com o grupo controle. Além disso, os resultados da análise Western Blot mostraram que o nível de expressão de proteína alterada de β -catenina era semelhante ao TGF- β .

Conclusões

Em resumo, como a patogênese indica, a progressão da fibrose cardíaca pode ser induzida por hiperlipidemia. De modo interessante, os tecidos cardíacos de ratos hiperlipidêmicos revelaram aumento da ativação de mastócitos e atividade aumentada da via TGF- β / Wnt / β -catenina. Os resultados

deste estudo demonstraram que os mastócitos e a via TGF- β / Wnt / β -catenina não eram apenas muito importantes para a fibrose do tecido cardíaco na hiperlipidemia, mas também um possível alvo para a terapia.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa e Redação do manuscrito: Cheng Y; Obtenção de dados, Análise e interpretação dos dados e Análise estatística: Cheng Y, Zhu Y, Zhang J, Duan X; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Cheng Y, Zhu Y.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

Vinculação acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

Referências

1. Thinn Hlaing T, Park A. Hyperlipidemia. *Medicine*. 2013;41(10):607-9.
2. Ansell, Benjamin J. Current world literature: hyperlipidaemia and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2013;24(4):357-62. doi: 10.1097/MOL.0b013e328363a73b.
3. Peter R, Bajwa H, Anthony S. Hyperlipidemia and cardiovascular disease - newer antihyperglycaemic agents and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2013;24(2):189-90. doi: 10.1097/MOL.0b013e32835ec5f5.
4. Adebisi OA, Adebisi OO, Owira PM. Naringin reduces hyperglycemia-induced cardiac fibrosis by relieving oxidative stress. *PLoS One*. 2016;11(3):e0149890. doi: 10.1371/journal.pone.0149890.
5. Russo I, Frangogiannis NG. Diabetes-associated cardiac fibrosis: cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;90:84-93. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.12.011.
6. Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5(1):15. doi: 10.1186/1755-1536-5-15.
7. Kania G, Blyszczuk P, Eriksson U. Mechanisms of cardiac fibrosis in inflammatory heart disease. *Trends Cardiovasc Med*. 2009;19(8):247-52. doi: 10.1016/j.tcm.2010.02.005.
8. Chen D, Jarrell A, Guo C, Lang R, Atit R. Dermal β -catenin activity in response to epidermal Wnt ligands is required for fibroblast proliferation and hair follicle initiation. *Development*. 2012;139(8):1522-33. doi: 10.1242/dev.076463.
9. Zerr P, Palumbo-Zerr K, Huang J, Tomcik M, Sumova B, Distler O, et al. Sirt1 regulates canonical TGF-[beta] signalling to control fibroblast activation and tissue fibrosis. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(1):226-33. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205740.
10. Wang S, Meng XM, Ng YY, Ma FY, Zhou S, Zhang Y, et al. TGF- β /Smad3 signalling regulates the transition of bone marrow-derived macrophages into myofibroblasts during tissue fibrosis. *Oncotarget*. 2016;7(8):8809-22. doi: 10.18632/oncotarget.6604.
11. Blyszczuk P, Müller-Edenborn B, Valenta T, Osto E, Stellato M, Behnke S, et al. Transforming growth factor- β -dependent Wnt secretion controls myofibroblast formation and myocardial fibrosis progression in experimental autoimmune myocarditis. *Eur Heart J*. 2017;38(18):1413-25. doi: 10.1093/eurheartj/ehw116.
12. Madjene LC, Pons M, Danelli L, Claver J, Ali L, Madera-Salcedo IK, et al. Mast cells in renal inflammation and fibrosis: lessons learnt from animal studies. *Mol Immunol*. 2015;63(1):86-93. doi: 10.1016/j.molimm.2014.03.002.
13. Silver RB. Role of mast cells in renal fibrosis. *Kidney Int*. 2013;84(1):214. doi: 10.1038/ki.2013.72.
14. Summers SA, Gan PY, Dewage L, Ma FT, Ooi JD, O'Sullivan KM, et al. Mast cell activation and degranulation promotes renal fibrosis in experimental unilateral ureteric obstruction. *Kidney Int*. 2012;82(6):676-85. doi: 10.1038/ki.2012.211.
15. Gaca MD, Arthur MJ, Benyon RC. Mast cell protease and stem cell factor expression in rat liver fibrosis. *J Hepatol*. 1998;28(Suppl):81. doi: 10.1016/S0168-8278(98)80523-0.
16. Yadav A, Desai RS, Bhuta BA, Singh JS, Mehta R, Nehete AP. Altered immunohistochemical expression of mast cell tryptase and chymase in the pathogenesis of oral submucous fibrosis and malignant transformation of the overlying epithelium. *Plos One*. 2014;9(5):e98719. doi: 10.1371/journal.pone.0098719.
17. Soehnlein O, Drechsler M, Hristov M, Weber C. Functional alterations of myeloid cell subsets in hyperlipidemia: relevance for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;13(11-12):4293-303. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00965.x.
18. Spinas E, Kritas SK, Saggini A, Mobili A, Caraffa A, Antinolfi P, Pantalone A, et al. Role of mast cells in atherosclerosis: a classical inflammatory disease. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2014;27(4):517-21. doi: 10.1177/039463201402700407.
19. Adeneye AA, Adeyemi OO, Agbaje EO. Anti-obesity and antihyperlipidaemic effect of *Hunteria umbellata* seed extract in experimental hyperlipidemia. *J Ethnopharmacol*. 2010;130(2):307-14. doi: 10.1016/j.jep.2010.05.009.
20. Slack J, Nevin NC. Hyperlipidaemic xanthomatosis. 1. Increased risk of death from ischaemic heart disease in first degree relatives of 53 patients with essential hyperlipidemia and xanthomatosis. *J Med Genet*. 1968;5(1):4-8. PMID: 5653869.
21. Liao PH, Kuo WW, Kuo CH, Yeh YL, Shen CY, Cheng YH, et al. Lactobacillus reuteri GMNL-263 reduces hyperlipidemia and the heart failure process in high-calorie diet-fed induced heart dysfunction in rats. *J Funct Foods*. 2016;20:226-35.