

*CARACTERIZAÇÃO DE COMPONENTES DA RESPOSTA
TH17 EM LESÕES ATÉROSCLERÓTICAS HUMANAS*

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, Área de concentração Ciências Biomédicas, do aluno **Rômulo Tadeu Dias de Oliveira**.
Campinas, 30 de julho de 2010.



Profa. Dra. Maria Heloisa de Souza Lima Blotta - Orientadora

Rômulo Tadeu Dias de Oliveira

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPONENTES DA
RESPOSTA TH17 EM LESÕES
ATEROSCLERÓTICAS HUMANAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA HELOISA SOUZA LIMA BLOTTA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. FÁBIO HÜSSEMANN MENEZES

CAMPINAS

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Ol 4c Oliveira, Rômulo Tadeu Dias de
Caracterização de componentes da resposta TH17 em lesões
ateroscleróticas humanas / Rômulo Tadeu Dias de Oliveira. Campinas,
SP : [s.n.], 2010.

Orientadores: Maria Helena Souza Lima Blotta, Fábio Hüssemann
Menezes

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Imunologia. 2. Inflamação. 3. Citocina. 4. Aterosclerose.
I. Blotta, Maria Helena Souza Lima. II. Menezes, Fábio
Hüssemann. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês : Identification of TH17 related cytokines in human
atherosclerotic plaques**

Keywords: • Immunology
• Inflammation
• Cytokine
• Atherosclerosis

Titulação: Doutor em Ciências Médicas
Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Maria Helena Souza Lima Blotta
Profa. Dra. Eva Burger
Prof. Dr. Carlos Vicente Serrano Júnior
Prof. Dr. Juliano de Lara Fernandes
Profa. Dra. Silvia de Barros Mazon

Data da defesa: 30-07-2010

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq).

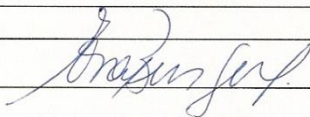
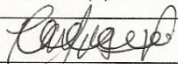
Banca examinadora de Tese de Doutorado

Romulo Tadeu Dias de Oliveira

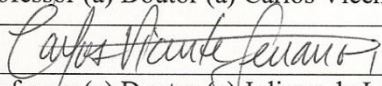
Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria Heloisa De Souza Lima Blotta

Membros:

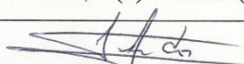
Professor (a) Doutor (a) Eva Burger



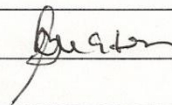
Professor (a) Doutor (a) Carlos Vicente Serrano Júnior



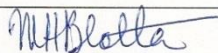
Professor (a) Doutor (a) Juliano de Lara Fernandes



Professor (a) Doutor (a) Silvia De Barros Mazon



Professor (a) Doutor (a) Maria Heloisa De Souza Lima Blotta



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/07/2010

DEDICATÓRIA

*À minha esposa, Raquel Albiero por todo amor,
dedicação e carinho. Esta tese é para você.*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta, por me receber em seu laboratório, confiar no meu trabalho e ter me ajudado em todos os “passos” da minha pós-graduação. Muito obrigado.

A meus pais, Maria Regina Dias de Oliveira e Carlos Roberto de Oliveira, por todo amor e dedicação destinados a mim.

A meus irmãos, Ramão e Lucila, pela paciência, apoio e amor dispensados durante todos esses anos de UNICAMP.

À Sara de Jesus Oliveira, grande amiga, que me ensinou os “primeiros passos” da imunologia, depositou sua confiança em mim e permitiu que eu explorasse e expandisse meus horizontes.

Ao meu co-orientador Dr. Fábio Hussemman Menezes, exemplo de honestidade e educação, por toda atenção e ajuda dispensada nestes quatro anos.

Aos amigos Fernando Dias Bexiga, Marcelo Dias de Ávila, Antonio Daniel de Jesus Martins, Paulo César Guerra Junior e Gustavo Henrique Christofani Bernardis pela amizade e momentos de diversão que tivemos durante todos esses longos anos.

Ao Dr. Ronei Luciano Mamoni, pela amizade, apoio, ensinamentos e pelos momentos de descontração e desabafo, que muito me ajudaram na elaboração e desenvolvimento desta tese. Muito obrigado.

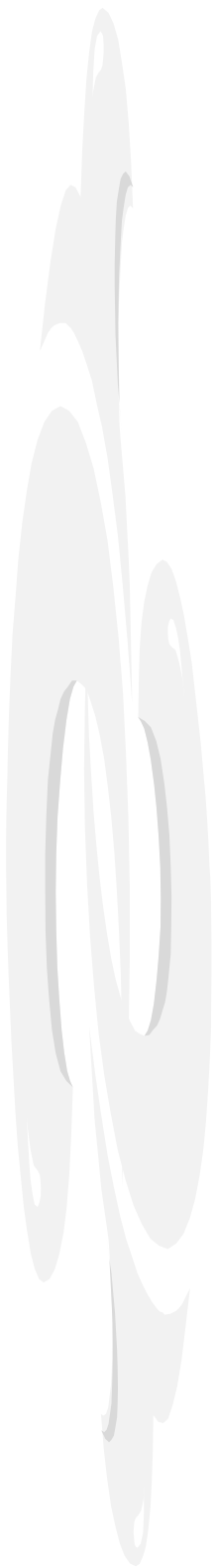
Aos amigos do laboratório, Márcia, Lisandra, Maria Carolina, Larissa, Eliane, Rosiane, Fernanda, Ana Lúcia, Fábio e Munir, pela ajuda, momentos de diversão e paciência em meus dias de “mau humor”.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, e ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos os pacientes da Unidade de Cirurgia Vascular do Hospital da UNICAMP, pela colaboração em participar deste trabalho de pesquisa, sem os quais, nada disso estaria realizado.

A Deus por ter me permitido chegar até aqui.

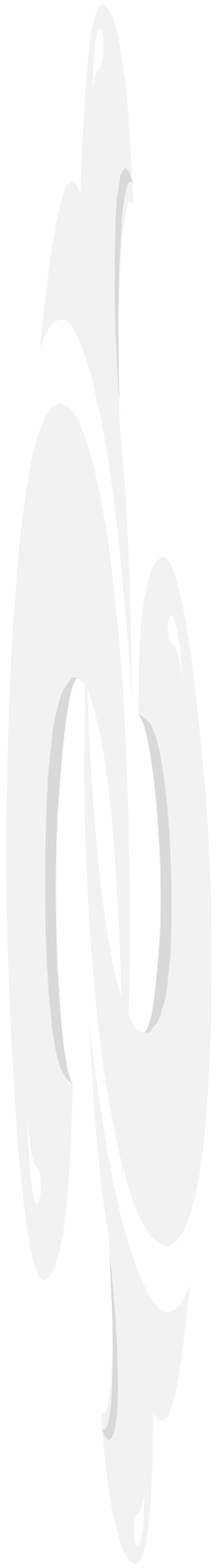
Enfim, a todos que me ajudaram, de uma forma ou de outra, na elaboração desta tese de doutorado, meu MUITO OBRIGADO.



Resumo

A presença de células T ativadas em lesões ateroscleróticas confirma a sua participação na progressão da doença. Recentemente, um novo subtipo de linfócitos TCD4⁺ produtores de IL-17 (T_H17) foi descrito e a sua associação a doenças de caráter inflamatório, bem como a sua capacidade de induzir a produção de mediadores frequentemente encontrados em lesões ateroscleróticas (IL-1 β , TNF- α , TGF- β , CCL2 e MMP) sugerem que possam ter uma participação na aterosclerose. O objetivo do presente estudo foi investigar componentes da resposta T_H17 em lesões ateroscleróticas humanas e relacioná-los a outros integrantes da resposta imunológica. Como controle foram utilizados fragmentos da artéria aorta de 3 doadores de órgãos. Para tal, avaliamos fragmentos de placas ateroscleróticas obtidas de 41 pacientes com estenose crítica de carótida, submetidos à endarterectomia. A expressão gênica e protéica de diversos mediadores foi avaliada pelo método de RT-PCR em tempo real e imunoistoquímica, respectivamente. Em alguns experimentos fragmentos de placa aterosclerótica foram submetidos à estimulação *in vitro* com IL-23, IL-2, LPS, PHA ou α CD3+ α CD28, para posterior análise da expressão gênica (RT-PCR) e protéica (ELISA e citometria de fluxo) de mediadores relacionados à resposta T_H17. A detecção do RNAm de IL-17 se restringiu a um pequeno número de amostras e em baixa concentração, enquanto a marcação imunoistoquímica foi negativa em todas as placas analisadas. Entretanto, observamos maior expressão relativa do RNAm de mediadores relacionados à resposta T_H17 (IL-23, RorC, CCR4, IL-1 β , TNF- α , MMP-9), à resposta T_H1 e T_H2 (IFN- γ e GATA-3), à resposta anti-inflamatória (FoxP3, IL-10, EBI3 e IL-27R) e a mediadores com potencial citotóxico (granzima A, perforina e granzulina) em placas de pacientes do que em amostras controle. Células positivas para IL-23, IL-1 β , IL-18, ICAM-1, IL-10 e TGF- β foram encontradas com maior frequência em placas classificadas como instáveis, ricas em macrófagos, células espumosas, cristais de colesterol e focos de necrose. Finalmente, a análise da suspensão celular obtida de fragmento de lesão revelou a presença de 1% de células IL-17⁺, enquanto a estimulação *in vitro* resultou em pequena produção de IL-17 apenas após estímulo com anti-CD3+ anti-CD28. Em conjunto, os resultados mostraram a expressão de componentes

da resposta T_H17 , em associação com mediadores da resposta T_H1 , T_H2 e Treg em lesões ateroscleróticas humanas.



Abstract

The detection of activated T cells in human atherosclerotic plaques confirms their participation in the disease progression. In this scenario, IFN- γ -producing T cells (T_H1) are well recognized as having a pro-atherogenic role. Recently, a new subtype of IL-17-producing T helper (T_H17) lineage of cells has been described and their association with inflammatory diseases, as well as their capacity to induce mediators frequently found in atherosclerotic lesions (IL-1 β , TNF- α , TGF- β , CCL2 e MMP) suggest that they may have a role in atherosclerosis. The aim of this study was to investigate whether components of the immune response mediated by T_H17 cells are present in human atherosclerotic lesions and their association with other immune mediators. For this purpose, 41 patients with critical stenosis of carotid submitted to endarterectomy were evaluated. Aortic fragments from organ donors were used as control. Carotid specimens were analyzed for mRNA and protein expression by real time RT-PCR and immunohistochemistry, respectively. In some experiments fragments of atherosclerotic plaques were incubated *in vitro* with IL-23, IL-2, LPS, PHA or α CD3+ α CD28 to further evaluate mRNA and protein expression. A low number of samples showed a small expression of IL-17 mRNA, while no staining for IL-17 was detected in any of the analyzed plaques. Up-regulation of IL-17 related genes (IL-23, RorC, CCR4, IL-1 β , TNF- α , MMP-9), as well as T_H1 e T_H2 (IFN- γ e GATA-3), anti-inflammatory mediators (FoxP3, IL-10, EBI1 e IL-27R) and cytotoxic molecules (granzyme A, perforin e granulysin) mRNA expression were detected in patients plaques compared to control arteries. In addition, unstable plaques showed a high number of IL-23, IL-1 β , IL-18, ICAM-1, IL-10 e TGF- β , granzyme B and perforin positive cells. Finally, the analysis of plaque derived cell suspensions revealed only 1% of IL-17+ cells, while *in vitro* stimulation resulted in IL-17 production only in the presence of anti-CD3+anti-CD28. Altogether our results showed components of TH17 response in association with mediators of T_H1, T_H2 and Treg response in human atherosclerotic lesions. Further studies are ongoing to elucidate the interaction, balance and collaborative potential among these effectors lineages in atherosclerosis control.

	Pág
Figura 1 - Gel com amostras de RNA total	57
Figura 2 - Curvas de <i>melting</i> representativas da amplificação do RNAm para YWHAZ, IL-17 e IFN- γ .	58
Figura 3 - Testes de eficiência das reações de RT-PCR em tempo real para quantificação do RNAm de YWHAZ, IL-17 e IFN- γ	60
Figura 4 - Eliminação de DNA genômico nas amostras de cDNA	62
Figura 5 - Expressão gênica de marcadores (IL-17, IL-17R, RorC e IL-23p19) relacionados à resposta T _H 17 em fragmentos de ateroma	77
Figura 6 - Expressão gênica de marcadores (IL-22, CCL20, CCR4 e CCR6) relacionados à resposta T _H 17 em fragmentos de ateroma	78
Figura 7 - Comparação da expressão relativa do RNAm de genes relacionados à resposta T _H 17 em fragmentos de ateroma e artérias controle	79
Figura 8 - Expressão gênica de marcadores (IFN- γ , IL-2, T-bet e IL-12p35) relacionados à resposta T _H 1 em fragmentos de ateroma	81
Figura 9 - Expressão gênica de marcador (GATA-3) relacionado à resposta T _H 2 em fragmentos de ateroma	82
Figura 10 - Comparação da expressão relativa do RNAm de genes relacionados à resposta T _H 1 e T _H 2 em fragmentos de ateroma e artérias controle	82
Figura 11 - Expressão gênica de marcadores (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) relacionados à resposta pró-inflamatória clássica em fragmentos de ateroma	84

Figura 12 -	Comparação da expressão relativa do RNAm de genes relacionados à resposta pró-inflamatória clássica em fragmentos de ateroma e artérias controle	85
Figura 13 -	Expressão gênica de marcadores (IL-10, TGF- β , IL-27r, EBI3 e FOXP3) relacionados ao controle da resposta inflamatória em fragmentos de ateroma	87
Figura 14 -	Comparação da expressão relativa do RNAm de genes relacionados ao controle da resposta inflamatória em fragmentos de ateroma e artérias controle	88
Figura 15 -	Expressão gênica de marcadores (MMP9 e TIMP-1) relacionados com os mecanismos de degradação de matriz extracelular em fragmentos de ateroma	89
Figura 16 -	Comparação da expressão relativa do RNAm de genes relacionados com mecanismos de degradação de matriz extracelular em fragmentos de ateroma e artérias controle	90
Figura 17 -	Expressão gênica de marcadores relacionados à resposta citotóxica (granulisina, granzima A, granzima B e perforina) em fragmentos de ateroma	91
Figura 18 -	Comparação da expressão relativa do RNAm de genes relacionados com a atividade citotóxica em fragmentos de ateroma e artérias controle	92
Figura 19 -	Placa aterosclerótica instável – cristais de colesterol	95
Figura 20 -	Placa aterosclerótica instável – células CD68+	96
Figura 21 -	Placa aterosclerótica estável VS. instável	98
Figura 22 -	Placa aterosclerótica com marcação negativa para IL-17	99
Figura 23 -	Placa aterosclerótica corada com anti-IL-23	100
Figura 24 -	Placa aterosclerótica corada com anti-IL-1 β	101
Figura 25 -	Placa aterosclerótica corada com anti-IL-18	102
Figura 26 -	Placa aterosclerótica corada com anti-ICAM-1	103
Figura 27 -	Placa aterosclerótica corada com anti-TGF- β e anti-IL-10	104

Figura 28 -	Placa aterosclerótica corada com anti-granzima B e anti-perforina	106
Figura 29 -	Placa aterosclerótica corada com anti-granulisina	107
Figura 30 -	Dot Plot representativo da reação de citometria de fluxo de lesão aterosclerótica humana	108
Figura 31 -	Citometria de fluxo de placa de ateroma utilizando <i>back gates</i> .	109
Figura 32 -	Frequência de células CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD69 ⁺ , CD56 ⁺ , MHCII ⁺ , CD19 ⁺ , CD68 ⁺ e CD62E ⁺ em suspensão celular de placa de ateroma	110
Figura 33 -	Expressão relativa do RNAm de IL-17, IL-1 β , IL-6, IL-23p19, CCL20 e IL-10 em amostras de ateroma submetidas à estimulação em cultura	112
Figura 34 -	Expressão relativa do RNAm para MMP9 em amostras de ateroma submetidas à estimulação em cultura	113
Figura 35 -	Concentrações de IL-17, IL-1 β , IL-6, MMP9 e IL-10 em amostras de ateroma submetidas à estimulação em cultura	114

	Pág.
Tabela I - Seqüência dos <i>primers</i> utilizados para amplificação do RNAm de genes de expressão constitutiva e citocinas relacionadas à resposta T _H 17	54
Tabela II - Seqüência dos <i>primers</i> utilizados para amplificação do RNAm de genes relacionados a resposta T _H 1 e T _H 2 e de genes de citocinas pró-inflamatórias clássicas	55
Tabela III - Seqüência dos <i>primers</i> utilizados para amplificação do RNAm de genes relacionados ao controle da resposta inflamatória, genes relacionados à degradação da matriz extracelular, e genes relacionados à resposta citotóxica	56
Tabela IV - Anticorpos utilizados na reação de imunoistoquímica	64
Tabela V - Parâmetros clínicos dos pacientes submetidos à endarterectomia	72
Tabela VI - Parâmetros clínicos dos pacientes cujas amostras foram utilizadas para análise de expressão gênica	75
Tabela VII - Fenótipo das lesões utilizadas nas análises de imunoistoquímica	94
Tabela VIII - Análise semi-quantitativa das reações imunoistoquímicas	97
Tabela IX - Análise semi-quantitativa da resposta citotóxica	105

AE	Angina Estável
AI	Angina Instável
ApoB100	Fração 100 da apolipoproteína 100
ApoE	Apolipoproteína E
AVC	Acidente vascular cerebral
BSA	Soroalbumina bovina
CAA	Célula apresentadora de antígeno
CCL	Quimiocina ligante da família CC
CCR	Receptor de quimiocina da família CC
cDNA	DNA complementar
CML	Células musculares lisas
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CXCL	Quimiocina ligante da família CXC
CX₃CL	Quimiocina ligante da família CX ₃ C
DAB	Diaminobenzidina
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxinucleotídeos
DTT	Ditiotreitol
EBI3	Gene 3 induzido pelo vírus Epstein-Barr
FOXP3	“Forkhead box P3”
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GATA-3	Proteína 3 ligante de GATA
HSP	Proteína de choque térmico
ICAM-1	Molécula 1 de adesão intercelular
IFN	Interferon
IHQ	Imunoistoquímica
IL	Interleucina
iTreg	Células T regulatórias induzidas
LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LDLr	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
LOX-1	Receptor lectina- <i>like</i> para a LDLox

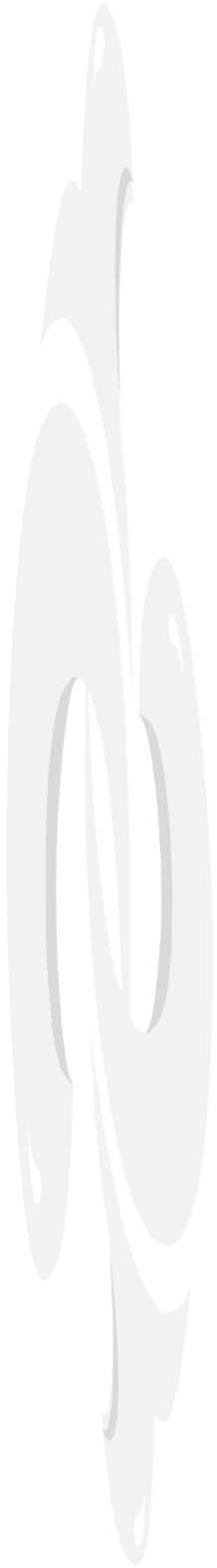
LPS	Lipopolissacarídeo
M-CSF	Fator de crescimento de colônias de macrófagos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MMP	Metaloproteinase
NK	Célula “Natural Killer”
NLR	Receptores do tipo NOD
PCR	Proteína C reativa
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PBS	Salina tamponada com fosfato
PHA	Fitohemaglutinina
PMA	“Phorbol 12-myristate 13-acetate”
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
RNA_m	RNA mensageiro
ROR_{γt}	Receptor nuclear órfão ROR _{γt}
RPM	Rotação por minuto
RT-PCR	Reação de cadeia da polimerase associada à transcrição reversa
SCID	Imunodeficiência severa combinada
SOCS	Fatores supressores da produção de citocinas
SR	Receptores do tipo <i>scavenger</i>
T-bet	T-box expresso em células T
TGF	Fator de transformação e crescimento
T_H1	Linfócito T auxiliar tipo 1
T_H2	Linfócito T auxiliar tipo 2
T_H3	Linfócito T auxiliar tipo 3
T_H17	Linfócito T auxiliar tipo 17
THP-1	<i>Human acute monocytic leukemia cell line</i>
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinases
TLR	Receptores do tipo <i>Toll</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-R	Receptor do fator de necrose tumoral
Tr1	Células T regulatórias do tipo 1
Treg	Células T regulatórias naturais

UBC	Ubiquitina
YWHAZ	Proteína de ativação tirosina 3-monooxygenase/triptofano 5-monooxygenase, polipeptídeo zeta
VCAM-1	Molécula 1 de adesão vascular

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	31
OBJETIVOS	43
CASUÍSTICA E MÉTODOS	47
1. Casuística	49
2. Delineamento experimental	49
3. Obtenção, separação e cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)	50
4. RT-PCR em tempo real	51
4.1. Extração de RNA	51
4.2. Síntese de cDNA	52
4.3. Protocolo de RT-PCR em tempo real	52
4.4. Avaliação da integridade do RNA total obtido após extração	57
4.5. Avaliação da especificidade dos primers	57
4.6. Avaliação da eficiência da reação de amplificação	58
4.7. Validação dos resultados de RT-PCR em tempo real: normalização com genes de referência	61
4.8. Eliminação da contaminação das amostras de RNA por DNA genômico	62
5. Imunoistoquímica	63
5.1. Amostras	63
5.2. Reação de Imunoistoquímica	63
6. Estimulação <i>in vitro</i> de fragmentos de tecido contendo a lesão aterosclerótica	64
7. Determinação da concentração de IL-17 e IL-23 em plasma e sobrenadantes de cultura	65
8. Ensaio imunoenzimático para detecção de IFN- γ , IL-17, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-23 e MMP9	65
9. Isolamento de monócitos/macrófagos e linfócitos da lesão aterosclerótica	66
10. Imunofluorescência e citometria de fluxo	66
11. Análise estatística	67
RESULTADOS	69
1. Parâmetros clínicos dos pacientes submetidos à endarterectomia	71

2. Determinação da concentração plasmática de IL-17 e IL-23	73
3. Análise da expressão gênica em amostras de lesão aterosclerótica	74
3.1. Expressão de genes relacionados à resposta T _H 17	76
3.2. Expressão de genes relacionados às respostas T _H 1 e T _H 2	80
3.3. Expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias clássicas	83
3.4. Expressão de genes relacionados ao controle da resposta inflamatória	85
3.5. Expressão de genes relacionados à degradação da matriz extracelular	89
3.6. Expressão de genes relacionados à resposta citotóxica	90
4. Análise histológica e imunoistoquímica	93
5. Citometria de fluxo de lesão aterosclerótica humana	108
5.1. Estratégia de análise dos resultados obtidos pela citometria de fluxo	108
6. Estimulação de placas ateroscleróticas em cultura e quantificação de citocinas	111
DISCUSSÃO	115
CONCLUSÕES	129
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
ANEXOS	149



Introdução

A aterosclerose é uma alteração da parede arterial que promove eventos vasculares adversos como doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral, aneurisma de aorta abdominal e doença arterial periférica, responsáveis por altos índices de mortalidade e morbidade no mundo ocidental. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2004 mostram que as doenças isquêmicas do coração e as doenças cerebrovasculares foram as principais causas de morte no mundo neste período, correspondendo a 12,2% e 9,7% das mortes, respectivamente. Projeções para 2030 indicam que as doenças cardiovasculares continuarão a liderar o ranking de mortalidade sendo que a *diabetes mellitus*, condição que constitui importante fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose, irá ocupar o sétimo lugar nas causas de morte com 3,3% (1). No Brasil as doenças cardiovasculares são responsáveis por 27% dos casos de óbitos (2) e seu tratamento implica em grande impacto econômico (3).

A aterosclerose é uma doença progressiva caracterizada pelo acúmulo de lipídeos e células relacionadas à resposta imunológica na íntima das artérias (4). A lesão inicial, denominada estria gordurosa, é formada pelo acúmulo subendotelial de macrófagos ricos em lipídeos, sendo comum em recém-nascidos e crianças (5), atingindo a aorta na primeira década de vida e as artérias coronárias e cerebrais, após a segunda década de vida (6). A lesão inicial não ocasiona sintomas clínicos, mas pode evoluir com a presença de grande quantidade de lipídeos, necrose, infiltração de macrófagos, linfócitos e células musculares lisas causando, eventualmente, a oclusão de artérias com conseqüentes manifestações clínicas (7).

Estudos clínicos e experimentais fundamentam a hipótese de que a inflamação tem um papel crucial no desenvolvimento e progressão da aterosclerose (8). O início do processo se dá pela ativação local do endotélio em artérias de médio e grande calibre, induzida por estimulação física ou bioquímica, incluindo hipertensão e hipercolesterolemia. Várias teorias foram propostas para explicar o início do processo inflamatório na aterosclerose, dentre elas a mais aceita é a hipótese de resposta à lesão (9) associada a processos oxidativos (10), na qual o endotélio lesado pelo acúmulo de lipoproteínas de baixa densidade

oxidada (LDLox) torna-se ativado, expressando moléculas de adesão e promovendo a liberação de mediadores da resposta imunológica (11).

Além da oxidação da LDL, outras possíveis causas podem levar à disfunção do endotélio, incluindo radicais livres oriundos do tabaco, hipertensão, *diabetes mellitus*, alterações genéticas, infecções por microrganismos tais como herpesvírus e *Chlamydia pneumoniae* ou a combinação desses fatores (12).

A atual compreensão dos processos imunológicos que ocorrem na aterosclerose foi possível após o desenvolvimento de trabalhos experimentais com camundongos deficientes em componentes que participam do metabolismo dos lipídeos, como a apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) e receptor para LDL (LDLr^{-/-}), combinados ou não com a deficiência de mediadores da resposta imunológica (13). Mais recentemente, pesquisadores têm utilizado camundongos quiméricos, que consistem em animais com deficiência em ApoE ou LDLr, que recebem células *knockout* para determinado componente do sistema imunológico por transferência adotiva (14).

Ao analisar as bases moleculares das doenças coronarianas, observa-se que determinados locais da vasculatura, tais como ramificações ou curvaturas, apresentam distúrbios no fluxo sanguíneo que promovem maior permeabilidade do endotélio para macromoléculas como a LDL, tornando-se locais preferenciais de formação das lesões (15). O excesso de LDL infiltra na íntima arterial em concentrações que excedem a capacidade de eliminação, levando a retenção (16) por proteoglicanos, que se associam com a porção apoB100 da molécula de LDL (17). A LDL nativa retida pode sofrer diferentes modificações como oxidação, lipólise, proteólise e agregação (6). A modificação da partícula de LDL, especialmente a oxidativa, promove a liberação de fosfolipídeos ativos, que leva a ativação das células endoteliais (18). Estas, por sua vez, podem reconhecer a LDL oxidada (LDLox) via o receptor *lectina-like* para a LDLox, o LOX-1 (19), promovendo a internalização da molécula.

A endocitose da LDLox por células endoteliais, via LOX-1, induz a expressão de moléculas de adesão (20), que contribuem para o afluxo de células

para a lesão aterosclerótica (21). As moléculas de adesão induzidas podem ser incluídas em duas famílias principais, as selectinas e as integrinas. Estudos em camundongos propensos ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (ApoE^{-/-} ou LDLr^{-/-}), nos quais os genes da selectina P, E e das integrinas ICAM-1 e VCAM-1 foram inativados, mostraram diminuição no tamanho das lesões (22-24), comprovando a importância das moléculas de adesão no mecanismo de migração dos monócitos circulantes e, posteriormente de outras células para o sub-endotélio vascular.

O recrutamento de células da resposta imunológica é um processo fundamental para a aterogênese, governado pelas moléculas de adesão e pela liberação local de quimiocinas. Dentre elas, a proteína-1 quimiotática de monócitos (MCP1/CCL2), o ligante-1 da quimiocina transmembrana CX3C (CX₃CL1 ou fractalquina) e o RANTES (CCL5) são importantes para a quimiotaxia de monócitos para as lesões (25-27), enquanto que a migração de linfócitos TCD4⁺ é regulada pela proteína-10 induzida pelo interferon (IP10/CCL10), monocina induzida pelo interferon- γ (Mig/CCL9) e do quimioatraente- α induzido pelo IFN- γ (ITAC/CCL11) (28).

Após a migração para áreas suscetíveis dos vasos, os monócitos entram em contato com o fator de crescimento de colônia de macrófagos (M-CSF), diferenciando-se em macrófagos (29), nos quais ocorre um aumento da expressão de receptores da imunidade inata responsáveis pela fagocitose, como os receptores *scavenger* (SR – SRA, SRB ou CD36) e de receptores envolvidos com a ativação de macrófagos e a resposta inflamatória, como os TLRs (*Toll-like receptors*) e os NLRs (*NOD like receptors*) (30).

Os receptores *scavengers* como o CD36 (31) atuam na eliminação de lipoproteínas, fragmentos apoptóticos e patógenos, além de auxiliarem no processo de apresentação de antígenos (32) e na formação da célula característica do ateroma, a célula espumosa.

Os TLRs e os NLRs induzem a ativação de importantes vias pró-inflamatórias, responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção do processo

inflamatório presente na lesão aterosclerótica. Trabalhos recentes mostraram elevada expressão de TLR2 e TLR4 em macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas presentes na lesão (33,34). Por outro lado, estudos experimentais com camundongos ApoE^{-/-} também evidenciaram alta expressão de TLR4 na lesões e de TLR2 em locais de *stress* hemodinâmico (35,36). Diversos ligantes endógenos podem promover a ativação dos TLRs, como a proteína de choque térmico 60 (HSP60), liberada por células necróticas e que promovem ativação de TLR2 e TLR4 (37). Entretanto, no contexto da aterogênese, o ligante endógeno mais importante é, provavelmente, a LDL modificada (10). Em trabalho recente de nosso grupo de pesquisa foi demonstrado que a LDLox promove ativação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP), causando a liberação de mediadores inflamatórios como IFN- γ , CCL2 e CXCL8 (38).

Os NLRs foram recentemente descritos como capazes de reconhecer cristais de colesterol e partículas de LDLox e induzir a produção de IL-1 β e IL-18, citocinas pró-inflamatórias que promovem ativação endotelial e regulam a ativação de linfócitos TCD4⁺, respectivamente (39). Após a internalização da LDLox, as células espumosas passam a liberar uma grande quantidade de mediadores como a IL-1 β , IL-6 e TNF- α , que aumentam a atividade inflamatória atraindo mais monócitos para a lesão e perpetuando a resposta (40). Além disso, macrófagos da placa passam a exercer duas funções essenciais para o desenvolvimento e rompimento da placa: a apresentação de antígenos para linfócitos T e a liberação de enzimas que destroem a capa fibrosa, como a metaloproteinase 9 (MMP9) (41).

Outro grupo celular muito importante para o desenvolvimento e agravamento das lesões ateroscleróticas são os linfócitos (7), presentes em todos os estágios de desenvolvimento do ateroma. Trabalhos experimentais com camundongos ApoE^{-/-} deficientes em linfócitos (SCID, *severe combined immunodeficiency*) mostraram que esses animais apresentam uma regressão significativa no crescimento da lesão aterosclerótica, quando comparados a controles imunocompetentes (42,43). Adicionalmente, demonstrou-se que a

transferência adotiva de linfócitos TCD4⁺ para animais ApoE^{-/-} SCID resulta no aumento das lesões ateroscleróticas (44).

A ativação dos linfócitos T, em especial dos linfócitos TCD4⁺, envolve o processamento do antígeno por vias endossomais, a apresentação via moléculas de MHC de classe II e a ligação simultânea a moléculas coestimulatórias (45).

A especificidade dos peptídeos reconhecidos pelos linfócitos TCD4⁺ na aterosclerose ainda não está bem definida, entretanto, evidências mostram que os linfócitos humanos e de camundongos reconhecem antígenos provenientes da LDLox (46-48). Zhou et al (49) verificaram que a transferência adotiva de células TCD4⁺ específicas para a LDLox para camundongos ApoE^{-/-} SCID promove aumento do desenvolvimento das lesões. Outro antígeno detectado em lesões é a proteína de choque térmico 60/65 (HSP60/65) (50). As HSP podem ser geradas de maneira endógena, funcionando como auto-antígenos, ou serem produzidas por patógenos como a *Chlamydia pneumoniae* (51). Linfócitos T específicos para a HSP65 de *C. pneumoniae* foram detectados em lesões humanas (52).

Para que os linfócitos T *naive* possam ser ativados são necessários dois sinais: o primeiro fornecido pelo reconhecimento do antígeno no contexto da molécula de MHC de classe II, e o segundo mediado pelas moléculas coestimulatórias (45). Na aterosclerose foram bem estudadas as moléculas da família B7, que se ligam ao CD28 e as proteínas da família do TNF (CD40L e OX40), cujo bloqueio, neutralização ou deleção genética resulta em importante regressão das lesões (53-57).

Outro fator importante na ativação dos linfócitos é o tipo de citocina presente no microambiente onde as células são ativadas, que pode promover a diferenciação dos linfócitos TCD4⁺ com diferentes funções efetoras. Inicialmente, foram identificados dois subtipos de linfócitos T CD4⁺ com funções efetoras distintas denominados T_H1 e T_H2 (58). As células T_H1 produzem preferencialmente as citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF- α e apresentam como principal fator de transcrição o T-bet (59). A polarização para o subtipo T_H1 é dependente de IL-12 (60). Em adição, a presença de IL-18 no momento da ativação tem ação

sinérgica resultando em maior produção de IFN- γ (61). Por sua vez as células T_H2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13; possuem como fator principal de transcrição o GATA-3 (62,63) e sua diferenciação requer a presença de IL-4 (64).

Foi demonstrado que na aterosclerose a presença de IL-12 (65) e IL-18 (66) promove a polarização das células TCD4⁺ para o fenótipo T_H1 produtor de IFN- γ , citocina com papel central tanto no desenvolvimento como na estabilidade da placa. O papel preponderante do IFN- γ na promoção da aterogênese foi comprovado em trabalhos experimentais, visto que camundongos ApoE^{-/-} ou LDLr^{-/-} deficientes em IFN- γ ou no receptor para IFN- γ apresentam redução no tamanho das lesões (67,68), com o inverso ocorrendo com a administração intraperitoneal de IFN- γ (69). Além disso, camundongos LDLr^{-/-} T-bet^{-/-} também apresentam lesões menores (70).

O IFN- γ é produzido por linfócitos T_H1 (71), TCD8⁺ ativados (72), macrófagos ativados (73), células NK (74) e células musculares lisas (CML) (66). Um grande número de evidências mostra seu potencial pró-aterogênico, uma vez que promove o recrutamento de células T e macrófagos indiretamente para as lesões; o aumento da expressão de moléculas de MHC classe II e a fagocitose de lipídeos por macrófagos; a ativação das células apresentadoras de antígenos (CAA) e a liberação de citocinas por células T_H1 (75,76). Além disso, o IFN- γ pode induzir a desestabilização das lesões, por meio da inibição da infiltração e da proliferação de CML, da redução da síntese de colágeno e da indução da síntese de proteínas que degradam matriz extracelular, como as metaloproteinases (77-79). Em trabalho anterior, verificamos elevada expressão de IFN- γ e IL-12 em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com angina instável, corroborando a participação da resposta T_H1 na patogênese da aterosclerose (80).

Os linfócitos T_H2 também estão presentes em lesões ateroscleróticas humanas e de camundongos, mas seu papel ainda não está bem esclarecido. Por sua capacidade de inibir a resposta T_H1, inicialmente pensou-se que as células T_H2 pudessem promover a estabilidade das lesões. Entretanto, estudos que utilizaram camundongos ApoE^{-/-}IL-4^{-/-} ou LDLr^{-/-} que receberam células de medula

óssea IL-4^{-/-} mostraram menor desenvolvimento de lesões (81,82). O provável papel pró-aterogênico da IL-4 está relacionado à ativação de mastócitos, que resulta na apoptose de CML e na diminuição da produção de colágeno com aumento da síntese de proteases, condições que podem levar a desestabilização das lesões (83). Além disso, estudos *in vitro* mostraram que a IL-4 induz a produção de CCL2 por células epiteliais e aumento da expressão de VCAM-1 em células endoteliais (84) e CML (85), favorecendo o influxo de células inflamatórias para o local da lesão.

Além da via inflamatória mediada por células T_H1 e pelo eixo IL-12/IFN- γ , células T *naive* (CD4⁺CD45RA⁺) podem se diferenciar em uma população capaz de secretar IL-17, denominada T_H17 (86,87). A diferenciação para este subtipo celular é dependente de TGF- β e IL-6 (88-90) e do fator de transcrição ROR γ t (91). A manutenção das células T_H17 é regulada pela IL-23 (92), citocina da família da IL-12, com a qual compartilha a subunidade do receptor (IL-12R β 1) e a proteína ligante (p40), embora cada uma possua uma subunidade específica do receptor/ligante para promover suas atividades *in vivo* (93). Além de IL-17, estas células produzem IL-21, citocina da família da IL-2, que exerce a função de amplificar a resposta T_H17 (94-96). Recentemente, demonstrou-se que a polarização para T_H17 pode ser inibida pela IL-27 (97,98), citocina da família da IL-12, que apresenta duas subunidades a EBI3 e a p28 e que se liga a um receptor específico, o IL-27R (93). As células T_H17 ainda podem ser caracterizadas quanto à expressão de receptores de quimiocinas como CCR4 e CCR6 (99) ou CCR2 na ausência de CCR5 (100).

A IL-17 pertence a uma família de citocinas relacionadas composta de 6 membros (IL-17A-F) e é produzida não apenas por células T_H17, mas também por células T CD8⁺ ativadas, células T TCR $\gamma\delta$ ⁺ e neutrófilos (101). Sua intensa atividade pró-inflamatória baseia-se na capacidade de induzir a produção de mediadores como IL-1, IL-6, TNF- α , CCL2, CCL7, CCL20, CXCL1, CXCL8, e metaloproteinases (MMP) por células endoteliais e macrófagos (87,102). Estudos recentes demonstraram o importante papel das células T_H17 em modelos

experimentais de Doença Inflamatória Intestinal (103), Encefalomielite Autoimune (104) e Artrite Induzida por Colágeno (105).

A participação das células T_H17 na aterosclerose começou a ser investigada recentemente por pesquisadores que utilizaram camundongos $LDLr^{-/-}$ $IL-17r^{-/-}$ ou $ApoE^{-/-}$ com bloqueio da IL-17 via transfecção do IL-17RA e verificaram regressão das lesões com diminuição da migração de mastócitos e neutrófilos (106,107). Além disso, tanto a citocina IL-17 (108) como linfócitos T_H17 (109) foram detectados em lesões ateroscleróticas humanas.

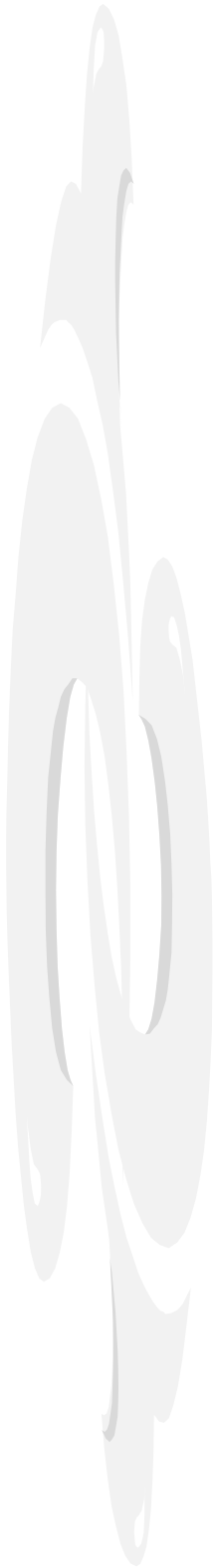
Em contrapartida às células T_H1 e T_H17 com potente ação pró-inflamatória, células $TCD4^+$ com atividade regulatória (Treg) também foram descritas na aterosclerose. Células Treg naturais são caracterizadas pela expressão de CD4, CD25, e pela presença do fator de transcrição FOXP3, desenvolvem-se no timo e são capazes de reconhecer antígenos próprios (110). Subgrupos de linfócitos Treg também podem ser gerados durante a ativação da resposta imunológica sendo denominados de células regulatórias induzidas (iTreg). Células T *naive* ($CD4^+CD25^+$) da periferia podem ser diferenciadas em células $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ na presença de TGF- β , IL-10 ou de baixas doses de peptídeos antigênicos (111). As iTreg podem ser induzidas pela IL-10 ou IL-27 (células Tr1) ou pelo TGF- β (células T_H3). Essas células exercem sua ação supressora por meio da produção das citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o TGF- β (111). Foi observado que lesões ateroscleróticas humanas expressam o fator de transcrição FOXP3 (112) e apresentam pequena quantidade de linfócitos $TCD4^+FOXP3^+$ em todos os estágios de seu desenvolvimento (113). Adicionalmente, em modelos experimentais a deficiência de células Treg foi associada ao aumento da aterogênese e da inflamação nas lesões (114,115).

As citocinas anti-inflamatórias produzidas pelas células regulatórias foram extensivamente estudadas na aterosclerose. Estudos prévios usando anticorpos neutralizantes para TGF- β (116) ou receptores solúveis (117), ou a deficiência genética (118) mostraram o papel anti-aterogênico desta citocina, capaz de induzir a diminuição do tamanho das lesões e de promover a estabilidade do ateroma em

camundongos ApoE^{-/-}. Em pacientes com doenças cardiovasculares a baixa concentração sérica de TGF- β foi associada a um pior prognóstico (119,120).

Experimentos utilizando camundongos C57BL/6 IL-10^{-/-} submetidos à dieta rica em gordura mostraram o envolvimento da IL-10 no controle da reação inflamatória local. Esses animais apresentaram maior desenvolvimento das lesões, com aumento de células T ativadas e da produção de citocinas inflamatórias (121). Resultados similares foram obtidos em animais ApoE^{-/-}IL-10^{-/-} (122). Em adição, trabalho recente mostrou que camundongos quiméricos LDLr^{-/-} que receberam células IL-10^{-/-} apresentam aumento de lesões com grande acúmulo de macrófagos e células T_H1 (123). Em humanos, concentrações séricas menores de IL-10 foram detectadas em pacientes com angina instável, em relação a pacientes com angina estável (124). Além disso, foi observado que após evento isquêmico, pacientes com maiores concentrações de IL-10 sérica apresentaram melhor prognóstico (125).

Pelo acima exposto, pode-se concluir que na aterosclerose ocorre um balanço entre a resposta inflamatória e anti-inflamatória. A perda desse equilíbrio promove o aparecimento das lesões e suas complicações. Até o momento as principais evidências apontam para o relevante papel da resposta T_H1 do lado pró-inflamatório. Células Treg e seus produtos (IL-10, TGF- β), assim como inibidores de metaloproteinases atuam do lado oposto, na contenção do processo. Neste sistema, o impacto da resposta T_H17 ainda não está bem definido. Entretanto, tendo em vista a comprovada participação da IL-17 nas doenças inflamatórias crônicas e o seu papel na indução dos mediadores freqüentemente detectados na placa aterosclerótica, foi nosso objetivo investigar se os principais componentes da resposta T_H17 estão presentes ou podem ser induzidos na lesão aterosclerótica.



OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi detectar componentes da resposta T_H17 em lesões ateroscleróticas humanas obtidas de pacientes submetidos à endarterectomia carotídea e relacioná-los a outros componentes da resposta imunológica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

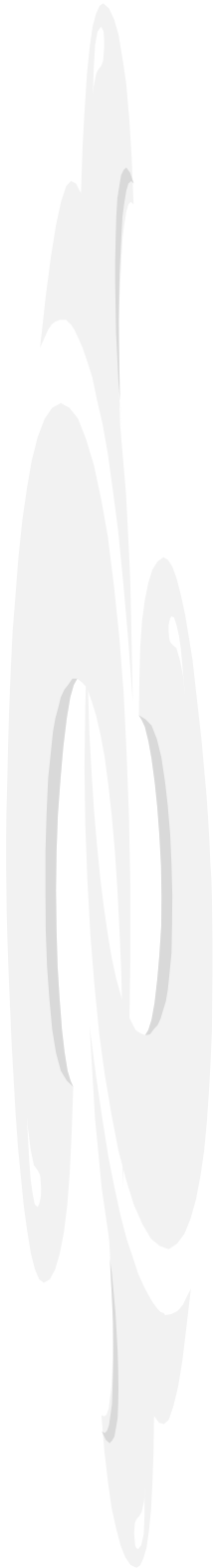
- Avaliar a expressão de genes relacionados: à resposta T_H17 (IL-17, IL17R, RorC, IL-23p19, IL-22, CCL20, CCR4 e CCR6); às respostas T_H1 e T_H2 (IFN- γ , IL-2, T-bet, IL-12p35, GATA-3); à citocinas pró-inflamatórias clássicas (IL-1 β , IL-6, TNF- γ); ao controle da resposta inflamatória (IL-10, TGF- β , IL-27R, I β 13, FoxP3); à degradação da matriz extracelular (MMP9 e TIMP-1) e à resposta citotóxica (granzima A, granzima B, perforina e granulicina) em lesões de ateroma humano, pela técnica de RT-PCR em tempo real

- Detectar a presença de CD3, CD8, CD68, ICAM-1, IL-17, IL-23, IL-1 β , IL-18, ICAM-1, TGF- β , IL-10, granzima A, granzima B, perforina e granulicina em lesões ateroscleróticas humanas pela técnica de imunoistoquímica

- Verificar a composição celular de fragmentos de placa aterosclerótica pela técnica de citometria de fluxo

- Verificar a expressão gênica e produção de IL-17 e outras citocinas (IL-1 β , IL-23p19, CCL20, IL-10, MMP9) em lesões de ateroma humano submetidas à estimulação *in vitro*

- Determinar a concentração plasmática de IL-17 e IL-23 em amostras de sangue de pacientes submetidos à endarterectomia



Casuística e Métodos

1. CASUÍSTICA

No período de novembro/2006 a junho/2010, quarenta e um pacientes com diagnóstico de estenose crítica de carótida ($> 70\%$ de estenose) atendidos no ambulatório de Cirurgia Vascular do HC UNICAMP, e com indicação de endarterectomia, foram selecionados para participar deste estudo. Os pacientes apresentaram idade média de 66,9 anos (49 – 89 anos), sendo trinta e três (80%) do sexo masculino e oito (20%) do sexo feminino.

Os pacientes foram classificados como sintomáticos e assintomáticos, de acordo com a presença ou não de sintomas cerebrovasculares como: ocorrência de AVC, episódio isquêmico transitório ou amaurose fugaz ipsilateral, dentro do período de 6 meses antes da cirurgia.

Entre as amostras de lesão aterosclerótica coletadas, dezoito foram utilizadas para a avaliação da expressão de genes relacionados à resposta inflamatória/imunológica (RT-PCR em tempo real), quatorze foram incluídas em parafina para pesquisa de proteínas pelo método de imunoistoquímica, três foram submetidas à digestão enzimática para obtenção de suspensão celulares e análise por citometria de fluxo e seis foram utilizadas para experimentos de estimulação *in vitro*. Como controle foram analisados fragmentos da artéria carótida proveniente de 3 doadores de órgãos.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (nº 262/2006, anexo) e todos os pacientes incluídos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os pacientes incluídos nesse estudo foram submetidos à avaliação pré-operatória das placas com ultrassom duplex e coleta de sangue periférico. No Centro Cirúrgico, foram submetidos à anestesia e cirurgia conforme técnica padronizada e descrita (126-128) que envolve os seguintes procedimentos: cervicotomia longitudinal, dissecação e reparo das artérias, heparinização sistêmica, descolamento da placa aterosclerótica (endarterectomia carotídea), rafia da artéria e síntese dos planos cirúrgicos.

As amostras de plasma coletadas dos pacientes submetidos à endarterectomia foram submetidas a determinação das concentrações de IL-17 e IL-23.

As placas ateroscleróticas tiveram sua morfologia macroscópica descrita no ato cirúrgico, sendo imediatamente processadas para o isolamento e identificação do RNAm de marcadores relacionados: à resposta T_H17 (IL-17, IL-17r, RorC, IL-23p19, CCR4, CCR6, IL-22 e CCL20); à resposta T_H1 e T_H2 (IFN- γ , IL-2, T-bet, IL-12p35 e GATA-3); a presença de citocinas pró-inflamatórias clássicas (IL-1 β , IL-6, TNF- α); ao controle da resposta inflamatória (IL-10, TGF- β , IL-27r, EBI3, FOXP3); a degradação da matriz extracelular (MMP9 e TIMP-1); e marcadores relacionados à resposta citotóxica (granulisina, granzima A, granzima B e perforina), pela metodologia de RT-PCR em tempo real. Posteriormente, as lesões foram analisadas quanto a composição celular e expressão de mediadores inflamatórios/imunológicos pelos métodos de imunoistoquímica (IHQ) e citometria de fluxo.

Também foi avaliada a produção de citocinas (IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-17) e MMP9 *in vitro* pela análise do sobrenadante de culturas de fragmentos de lesão aterosclerótica estimulados com IL-2, IL-23, PHA, LPS ou anti-CD3+anti-CD28.

3. OBTENÇÃO, SEPARAÇÃO E CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSP)

Para utilização como controle positivo na detecção do RNAm das placas ateroscleróticas e também em experimentos para detecção de citocinas, amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis foram coletadas (30 mL) em tubos contendo heparina sódica. As amostras foram transferidas para tubos cônicos de 15 mL contendo 4 mL de Ficoll-Hypaque e centrifugadas (2300 rpm, 30 minutos, temperatura ambiente). O anel de células mononucleares foi coletado, transferido para outro tubo e lavado duas vezes com meio RPMI (Invitrogen, NY, EUA) gelado estéril (1250 r.p.m., 10 minutos, 4° C). As células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado (soro AB 10% + L-glutamina [2mM] + gentamicina [5 μ g/mL]) e

2×10^6 cél/mL foram colocadas em placas de culturas de 24 poços. As CMSP foram estimuladas com 10 µg/mL de LPS (*Escherichia coli*/0127:B8 - Sigma, St Louis, EUA), 10 µg/mL de fitohemaglutinina (PHA - Sigma, St Louis, EUA) ou 20 µg/mL de LDLox (gentilmente cedido pelo Dr. Magnus Gidlund, ICB-USP) por 24 horas a 37°C em estufa de CO₂ (5%). Após o tempo de incubação as células e o sobrenadante das culturas foram coletados e armazenados a -80°C.

4. RT-PCR EM TEMPO REAL

4.1 Extração de RNA

Processamento e obtenção do RNA da placa de ateroma e de CMSP

Após a cirurgia, as amostras de lesão aterosclerótica foram acondicionadas em tubo FALCON de 50 mL e transportadas no gelo até o laboratório.

Para a obtenção do RNAm da placa aterosclerótica, 1mL de Trizol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi adicionado a 50-100 mg de tecido em homogeneizador (Power Gen 125 equipment - Fisher Scientific, Suwanee, GA, EUA), enquanto que para as CMSPs 0,5mL de Trizol[®] foi adicionado a 2×10^6 células até a completa dissolução. Em seguida foi adicionado 3,0 µL de glicogênio [60 µg] e 200 µL de clorofórmio seguido de agitação em vórtex por 20 segundos e incubação por 10 minutos no gelo. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (12.000 *g*, 15 minutos, 4°C) e a parte aquosa transferida para outro tubo, no qual foi adicionado igual volume de álcool isopropílico gelado, seguido de incubação a -20°C por 50 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas, o sobrenadante removido e o *pellet* contendo o RNA lavado com 1 mL de etanol 75%, seguido de centrifugação (12.000 *g*, 15 minutos, temperatura ambiente). Terminada a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o RNA ressuspendido em água tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC). A concentração do RNA das amostras foi determinada em espectrofotômetro Nanodrop (ThermoScientific, Suwanee, GA, EUA) com leituras das absorbâncias a 260 nm e 280 nm. Para determinar a pureza das amostras, foi utilizada a razão das absorbâncias (A260/A280) que deve estar próxima de 2,0 e a análise da presença das duas

frações do RNA em gel de agarose. Após a extração, as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

4.2. Síntese de cDNA

O RNA extraído anteriormente foi ressuspendido, em água DEPC, na concentração de $1\text{ }\mu\text{g}$ de RNA total por tubo (volume final de $31\text{ }\mu\text{L}$). Para excluir a possibilidade de amplificação de DNA genômico durante a reação de PCR em tempo real, as amostras de RNA foram tratadas com 1 unidade de DNase (Ambion - Applied Biosystems, Foster City, CA), conforme instruções do fabricante. Em seguida, foi adicionado $2,0\text{ }\mu\text{L}$ do oligonucleotídeo iniciador contendo oligo dT₁₂₋₁₈ [$0,75\text{ }\mu\text{g}$] + $3\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de hexâmeros randômicos (Applied Scientific), e as amostras foram incubadas por 10 minutos a 70°C e transferidas rapidamente para um banho de gelo. Em cada tubo foi adicionado $18\text{ }\mu\text{L}$ de uma solução com os seguintes reagentes: $10\text{ }\mu\text{L}$ do tampão de síntese 5x concentrado, $2,5\text{ }\mu\text{L}$ de dNTP (10mM), $5\text{ }\mu\text{L}$ de DTT $0,1\text{M}$ (ditioteitol) e $0,5\text{ }\mu\text{L}$ de Superscript R/T II ($200\text{ U}/\mu\text{L}$) (Invitrogen). As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente, sendo então transferidas para 40°C por 50 minutos com posterior incubação a 90°C por 5 minutos. Após o término, as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

4.3. Protocolo de RT-PCR em tempo real

A reação de RT-PCR em tempo real foi realizada em placa de 48 poços (Applied Biosystems). Em cada poço da placa foi adicionado $3\text{ }\mu\text{L}$ do cDNA, $1\text{ }\mu\text{L}$ do *primer sense* e $1\text{ }\mu\text{L}$ do *primer antisense* diluídos na concentração de uso ($80\text{ pM}/\text{reação}$) e $5\text{ }\mu\text{L}$ de SYBR® Green master mix (Applied Biosystems). Nas tabelas I, II e III estão descritas as seqüências dos *primers* utilizados. Para os marcadores que não encontramos seqüências disponíveis na literatura, utilizamos o número de acesso do RNAm obtido no PUBMED e procedemos ao desenho do *primer* com o programa Primer Express (Applied Biosystems). Para cada experimento correu-se um controle negativo substituindo a amostra de cDNA por água DEPC e um

controle positivo no qual utilizamos amostras de cDNA de CMSP estimuladas com PMA ou LPS. A reação foi realizada em equipamento de PCR em tempo real (StepOne - Applied Biosystems) e submetidas a 40 ciclos de amplificação (programação padrão do equipamento). Os experimentos de cálculo da eficiência da reação foram realizados em triplicata, enquanto que a amplificação de RNAm das amostras foi realizada em duplicata. A especificidade dos produtos obtidos foi confirmada pela análise da curva de *melting*. Os resultados obtidos foram normalizados utilizando-se pelo menos 2 dos seguintes genes de referência: GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), UBC (ubiquitina) e YWHAZ (proteína de ativação tirosina 3-monooxygenase/triptofano 5-monooxygenase, polipeptídeo zeta).

Tabela I – Seqüência dos *primers* utilizados para amplificação do RNAm de genes de expressão constitutiva e citocinas relacionadas à resposta T_H17

Primer	Seqüência
GAPDH	sense – 5' CCACATCGCTCAGACACC AT – 3' antisense – 5'GGCAACAATATCCACTTTACCAGAGT – 3'
UBC	sense – 5' ATTTGGGTCGCGGTTCTTG – 3' antisense – 5' TGCCTTGACATTCTCGATGGT – 3'
YWHAZ	sense – 5' ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA - 3' antisense – 5' CCGCCAGGACAAACCAGTAT – 3'
RorC	sense – 5' AGAGGGACTCCTTGCCTCTC – 3' antisense – 5' CAGCATCTGCTCACTTCCAA – 3'
IL-17	sense – 5'AATCTCCACCGCAATGAGGA – 3' antisense – 5'ACGTTCCCATCAGCGTTGA – 3'
IL-17r	sense – 5' CTACTATGTGGCGGGCATT – 3' antisense – 5' TCGGCACTAGCGGTAAAGTT – 3'
IL-23p19	sense – 5' CTCAGTGCCAGCAGCTTTCAC – 3' antisense – 5' TCTCTTAGATCCATGTGTCCCACTAG -3'
CCR4	sense – 5' CCATCTCGGATCTGCTCTTT – 3' antisense – 5' AGCCCACCAAGTACATCCAG – 3'
CCR6	sense – 5' TGGTGAGCTGGAGTCATCAG -3 antisense – 5' CACTCCCTTCAGCCTCACTC – 3'
CCL20	sense – 5' CTGGCTGCTTTGATGTCAGT – 3' antisense – 5' CGTGTGAAGCCCACAATAAA – 3'
IL-22	sense – 5' GCAGGCTTGACAAGTCCAACT – 3' antisense – 5' GCCTCCTTAGCCAGCATGAA -3'

Tabela II – Seqüência dos *primers* utilizados para amplificação do RNAm de genes relacionados a resposta T_H1 e T_H2 e de genes de citocinas pró-inflamatórias clássicas

Primer	Seqüência
IFN- γ	sense – 5' CTAATTATTCCGGTAACTGACTTGA – 3' antisense – 5' ACAGTTCAGCCATCACTTGGA – 3'
T-bet	sense – 5' GCGCCAGGAAGTTTCATTT – 3' antisense – 5' CATTCTGGTAGGCAGTCACG – 3'
GATA-3	sense – 5' AAGACATCCAGACCAGAAAC – 3' antisense – 5' GTTAAACGAGCTGTTCTTGGG – 3'
IL-2	sense – 5' AGTCCCTGGGTCTTAAGTGAA AG – 3' antisense – 5' CAAGAAGGCCACAGAACTGAA – 3'
IL-12p35	sense – 5' CCTGGACCACCTCAGTTTGG – 3' antisense – 5' TGAAGGCATGGGAACATTCC – 3'
IL-1 β	sense – 5' CACGATGCACCTGTACGATCA – 3' antisense – 5' AGACATCACCAAGCTTTTTTGCT – 3'
IL-6	sense – 5' GGTACATCCTCGACGGCATCT – 3' antisense – 5' GTGCCTCTTTGCTGCTTTTAC – 3'
TNF- α	sense – 5' TGGCCCAGGCAGTCAGA – 3' antisense – 5' GGTTTGCTACAACATGGGCTACA – 3'

Tabela III – Seqüência dos *primers* utilizados para amplificação do RNAm de genes relacionados ao controle da resposta inflamatória, genes relacionados à degradação da matriz extracelular, e genes relacionados à resposta citotóxica

Primer	Seqüência
Granulisina	sense – 5' CTGAGCCCTCTCACCTTGTC – 3' antisense – 5' GGAGAGTGGATTCTGGATCG – 3'
Granzima A	sense – 5' AAGAGTTTCCCTATCCATGCTATGA – 3' antisense – 5' TTTGCTTTTTCCGTCAGCTGTA – 3'
Granzima B	sense – 5' TGCAACCAATCCTGCTTCTG – 3' antisense – 5' CGATGATCTCCCCTGCATCT – 3'
Perforina	sense – 5' AAGCCCTCCGCCATTCTC – 3' antisense – 5' AACAGCCTCTTGGCCTTCTG – 3'
MMP9	sense - 5'-ACGCACGACGTCTTCCAGTAC- 3' antisense - 5'-TCCGGGAACCTCACGCG- 3'
TIMP-1	sense - 5'-GGCTTCACCAAGACCTACA- 3' antisense - 5'-TTGCAGGGGATGGATAAA- 3'
FOXP3	sense – 5' GAAACAGCAGATTCCCAGAGTTC – 3' antisense – 5' ATGGCCCAGCGGATGAG – 3'
IL-10	sense – 5' GGCCAGGGCACCCAGTCT -3' antisense – 5' TCGAAGCATGTTAGGCAGGTT – 3'
TGF- β	sense – 5' TGAGGGCTTTTCGCCTTAG C – 3' antisense – 5' CGGTAGTGAACCCGTTGATGT – 3'
IL-27r	sense – 5' AAGTTCTGATCTGCCAGTTCCACTA 3' antisense – 5' GCTCCAAATCTTGGATCTCAACA – 3'
EBI3	sense – 5' CCGTGTCTTCATTGCCACGTACAG – 3' antisense – GGTGACATTGAGCACGTAGGGAGCCAT – 3'

4.4. Avaliação da integridade do RNA total obtido após extração

O RNA total foi extraído de lesão aterosclerótica ou células mononucleares do sangue periférico, conforme descrito acima e quantificado no espectrofotômetro NanoDrop. Algumas amostras de RNA foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1% e coradas com brometo de etídio para a avaliação das bandas 25S e 18S. A análise do gel permitiu constatar que a técnica resulta na recuperação de RNA de boa qualidade, uma vez que o padrão de bandas obtido foi o esperado (fig. 1).

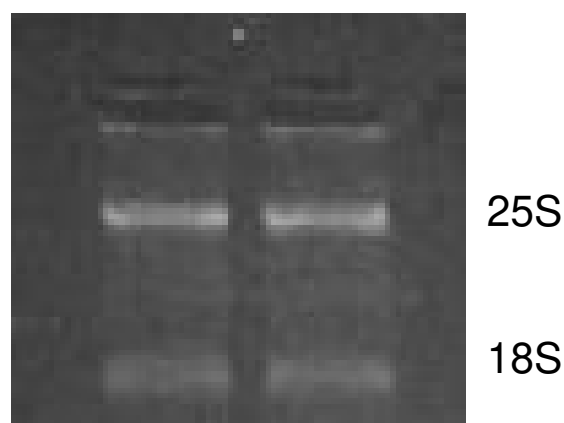


Figura 1: Gel de agarose onde podem ser observadas bandas características correspondentes ao RNA

4.5. Avaliação da especificidade dos *primers*

Para avaliar a especificidade dos *primers*, para cada gene foi elaborada uma curva de *melting* (aquecimento gradual da amostra amplificada de 60°C a 95°C, com incremento de 0,3°C) na qual é possível observar a temperatura em que ocorre a dissociação da dupla fita de DNA dos produtos amplificados. Como essa temperatura depende do tamanho e da composição de bases nitrogenadas de cada produto, para cada gene analisado deve haver a formação de apenas um pico, com uma temperatura característica para cada produto de amplificação (fig 2).

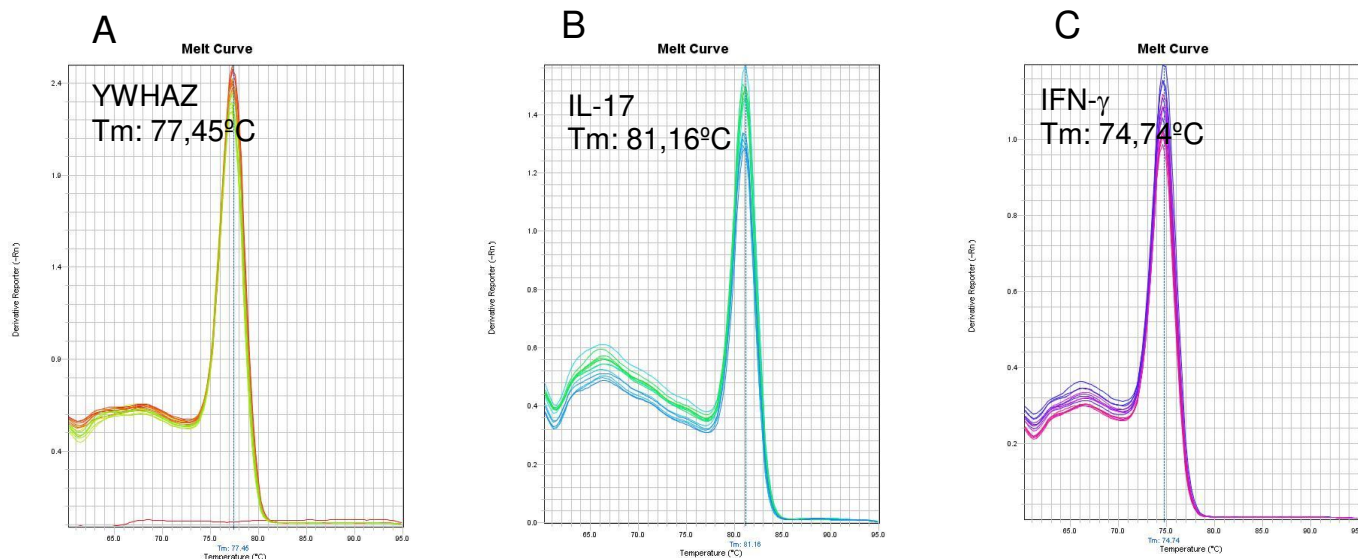
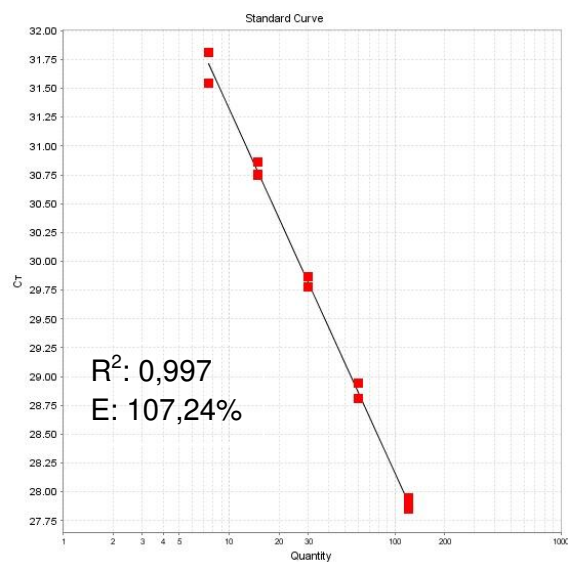
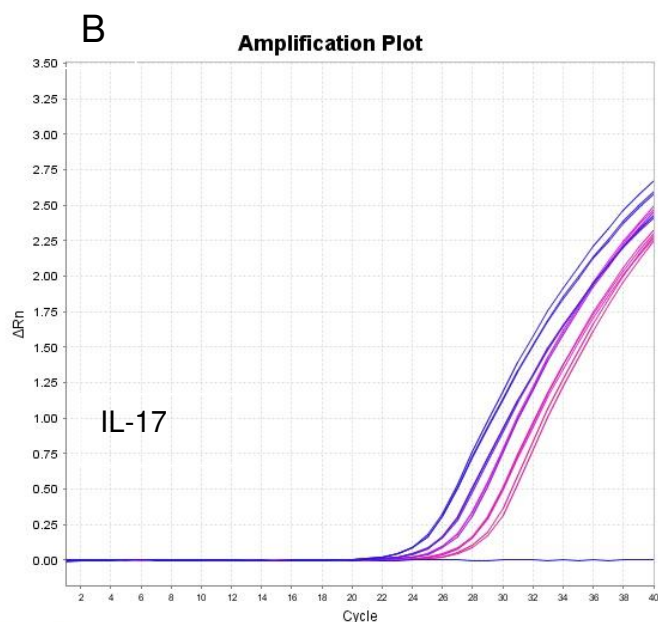
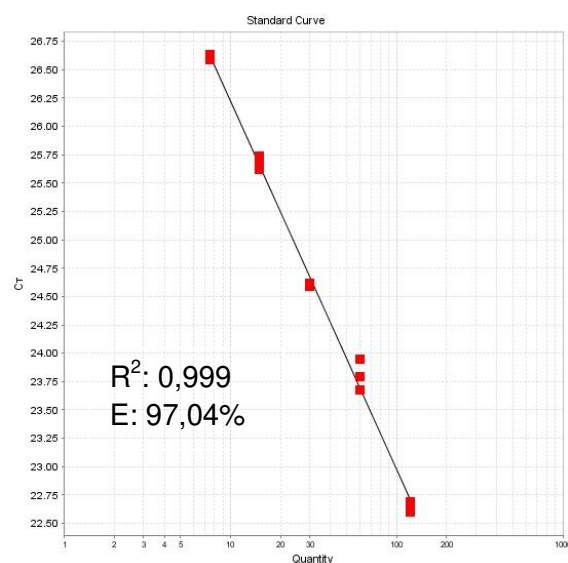
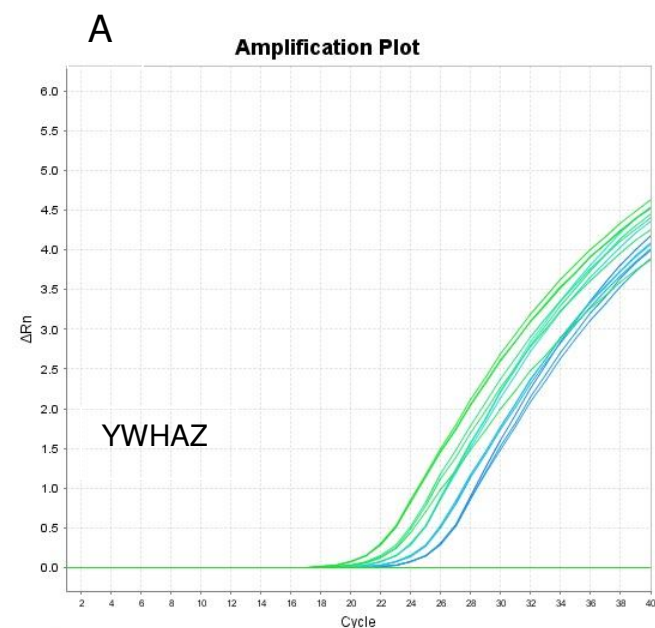


Figura 2: Curvas de *melting* representativas da amplificação do RNAm para (A) YWHAZ, (B) IL-17 e (C) IFN- γ . As reações utilizando os *primers* na concentração ideal podem ser consideradas específicas, uma vez que todas as amostras testadas apresentam temperatura de *melting* idênticas (em destaque em cada gráfico).

4.6. Avaliação da eficiência da reação de amplificação

A eficiência da reação de amplificação também foi determinada para cada gene analisado (fig. 3). Todos os testes foram realizados em triplicata utilizando amostras de cDNA na concentração de 30 μ g (primeiro ponto) seguido de diluições de forma seriada na proporção de 1:2 (total de 5 a 6 pontos). Após o término da reação foi elaborada uma curva padrão, por meio da qual foi calculada a eficiência (E) e a correlação entre os pontos da curva (R^2). A eficiência da reação (E) indica a capacidade de amplificação dos reagentes utilizados (*primers* e enzima) a cada ciclo. Uma eficiência de 100% indica que a cada ciclo a quantidade de produto em cada reação dobra. De acordo com a literatura, são consideradas satisfatórias reações com eficiência entre 90 a 110%. Os valores de R^2 indicam a reprodutibilidade da pipetagem dos reagentes, sendo satisfatórios valores de R^2 de ao menos 0,90.

Na figura abaixo (fig. 3) estão representadas as curvas de amplificação das amostras diluídas seriadamente (lado esquerdo) e a curva padrão obtida, com os respectivos valores de eficiência (E) e R^2 dos genes YWHAZ (A), da IL-17 (B) e do IFN- γ (C). Todas as reações resultaram em valores dentro das faixas consideradas satisfatórias. Os valores de eficiência de amplificação de cada gene foram utilizados para o cálculo da expressão relativa dos genes de interesse, conforme descrito no próximo item.



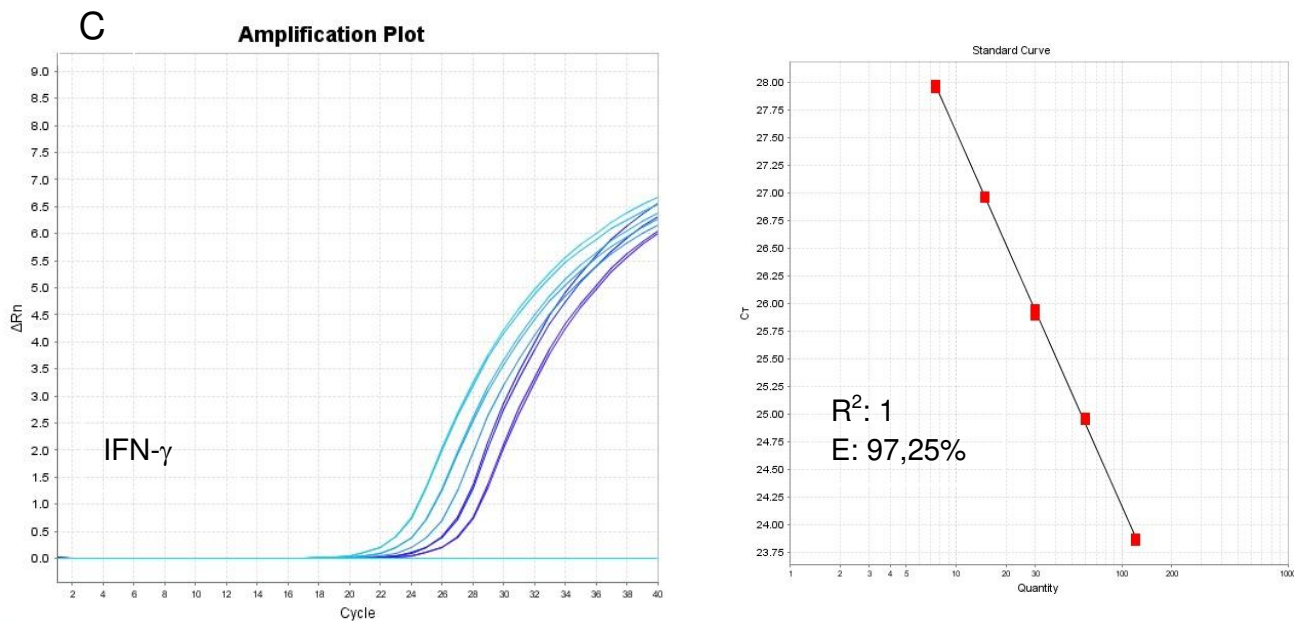


Figura 3: Gráficos representativos de amplificação (esquerda) e curva padrão (direita) obtidos nos testes de padronização da eficiência das reações de RT-PCR em tempo real para quantificação do RNAm de (A) YWHAZ, (B) IL-17 e (C) IFN- γ . Todos os testes foram realizados em triplicata utilizando amostras de cDNA na concentração de 30 μ g seguidas de diluição seriada na proporção de 1:2. Os gráficos mostram a amplificação do material de acordo com a diluição das amostras (lado esquerdo), a partir da qual foi gerada a curva padrão expressa como a média dos Cts em função da diluição da amostra (direita). Os valores de R^2 e da eficiência da reação estão destacados em cada gráfico.

4.7. Validação dos resultados de RT-PCR em tempo real: normalização com genes de referência

A análise dos resultados foi feita pelo método descrito por Vandensompele et al. (129), no qual são utilizados pelo menos dois genes de expressão constitutiva para a normalização da expressão do gene de interesse. A utilização de múltiplos genes para a normalização visa garantir a confiabilidade na estabilidade dos genes utilizados como referência. Esta medida é baseada no princípio de que a razão ideal de expressão dos genes controles é idêntica em todas as amostras, independente da condição experimental. Tal cálculo é feito pelo programa GeNorm – Visual Basic Application, disponível gratuitamente na *Internet*.

Para a utilização do programa primeiramente os dados obtidos na amplificação de cada gene em cada amostra (controles e de interesse) são transformados em quantidades relativas de acordo com a seguinte fórmula:

$$Q = E^{(Ct\text{ mínimo} - Ct\text{ da amostra})}$$

Q corresponde a quantidade relativa de cada gene e é igual a **E** (eficiência do primer, valor obtido no teste de eficiência) *elevado* ao **Ct mínimo** (menor Ct obtido dentre as amostras testadas para determinado gene) *menos* o **Ct da amostra** (Ct obtido de cada amostra analisada).

Os valores de Q obtidos dos genes controle (GAPDH, UBC e YWHAZ) em cada amostra são então inseridos na planilha do programa (GeNorm) que calcula os valores médios de estabilidade do gene, frente as diferentes condições experimentais (M). O valor de M é variável, e em geral espera-se que se obtenha um valor menor que 1,5. Para os genes que foram utilizados como controle obtivemos valores dentro da faixa indicada. Após o cálculo do valor M o programa fornece um fator de normalização (F) para cada amostra, que é então utilizado para o cálculo da expressão relativa dos genes de interesse (divide-se o valor de Q obtido para o gene de interesse em cada amostra pelo fator de normalização correspondente).

4.8. Eliminação da contaminação das amostras de RNA por DNA genômico

As reações de RT-PCR podem apresentar o inconveniente de amplificar DNA genômico (130). Dependendo do método de extração utilizado, pequenas quantidades de DNA genômico podem estar presentes na amostra comprometendo os resultados obtidos. Diversos métodos podem ser empregados para evitar esse tipo de interferência, entre eles o tratamento com DNase após a extração do RNA.

Para testar nosso protocolo de eliminação do DNA genômico, avaliamos a reação de PCR para β -actina em amostras de RNA proveniente de CMSPs estimulados com LPS, tratados ou não com 1 unidade de DNase por 30 minutos. O resultado obtido permitiu verificar que o tratamento não inibiu a amplificação dos produtos específicos de PCR representados pelas bandas referentes a β -actina (fig. 4, amostras 4 e 5). Entretanto, a amplificação da amostra de DNA genômico foi completamente inibida com a utilização da DNase (fig. 4, amostra 6).

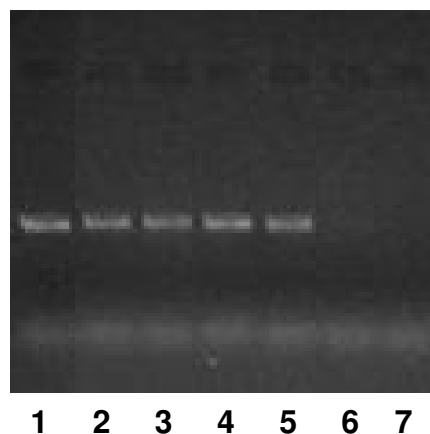


Figura 4: Eliminação de DNA genômico em amostras de cDNA. Amplificação de β -actina em amostras de RNA estimuladas com 10 μ g/mL de LPS por 24 horas ou DNA genômico extraído de monócitos ex-vivo. **(1)** RNA ex-vivo; **(2)** RNA de monócitos estimulados com LPS; **(3)** DNA genômico; **(4)** RNA ex-vivo tratado com DNase; **(5)** RNA de monócitos estimulados com LPS tratado com DNase; **(6)** DNA genômico tratado com DNase; **(7)** Controle negativo.

5. IMUNOISTOQUÍMICA

5.1. Amostras

As placas ateroscleróticas retiradas cirurgicamente foram colocadas em frascos cônicos tipo Falcon de 50 mL contendo formol a 4% e encaminhadas ao laboratório, onde foram seccionadas e incluídas em parafina.

5.2. Reação de Imunoistoquímica

Cortes seriados de 4 μ m foram desparafinizados e hidratados; a recuperação antigênica foi feita com tampão específico para cada anticorpo (citrato pH 6.0 ou Tris-EDTA pH 8.0) em *steamer* durante 45 minutos. As próximas etapas foram realizadas utilizando o kit NovoLink Polymer Detection System (Novocastra®, Newcastle, England) de acordo com os procedimentos estipulados pelo fabricante. Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 10 volumes, seguido de incubação com reagente de bloqueio para proteínas, com posterior lavagem e incubação com os anticorpos primários (tabela IV), *overnight*. Em seguida os cortes foram lavados e as reações reveladas com o sistema Novolink, conforme indicações do fabricante. Neste processo os cortes são incubados com o reagente pós-primário (promove a formação de poros na célula facilitando a entrada do polímero), lavados e incubados com o anticorpo secundário conjugado a um polímero. As marcações são reveladas com a utilização do substrato 3,3'- diaminobenzidina (DAB). Após o término da reação, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas com entelan (Sigma). Marcações positivas foram identificadas pela presença de coloração marrom.

Tabela IV – Anticorpos utilizados na reação de imunoistoquímica

Anticorpo	Fabricante
anti-CD3	DAKO
anti-CD8	DAKO
anti-CD68	DAKO
anti-ICAM-1	Santa Cruz
anti-IFN- γ	Santa Cruz
anti-IL-1 β	Santa Cruz
anti-IL-10	Santa Cruz
anti-IL-17	Santa Cruz
anti-IL-18	Santa Cruz
anti-IL-23p19	BioLegend
anti-TGF- β	Santa Cruz
anti-granzima B	Santa Cruz
anti-granzima A	Santa Cruz
anti-granulisina	Santa Cruz
anti-perforina	Santa Cruz

6. Estimulação *in vitro* de fragmentos de tecido contendo a lesão aterosclerótica

Amostras de placa ateroscleróticas obtidas após cirurgia foram cortadas em pequenos fragmentos distribuídos em volumes iguais em poços de placas de cultura (24 poços) com 1 mL de meio RPMI suplementado (soro AB 10% + L-glutamina [2mM] + gentamicina [5 μ g/mL]). Em seguida os fragmentos de tecido foram estimulados com 10 μ g/mL de LPS, 10 μ g/mL de PHA, 50 ng/mL de IL-23 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), 5 ng/mL de IL-2 (R&D Systems) ou 1 μ g/mL de α CD3+ α CD28 (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) por 24 horas em estufa a 5% CO₂. Após o período de incubação, o tecido foi coletado para extração de RNA e o sobrenadante utilizado para dosagem de IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17 e MMP9 pelo método de ELISA.

7. Determinação da concentração de IL-17 e IL-23 em plasma

Para a determinação da concentração plasmática de IL-17 e IL-23, foram coletadas amostras de sangue periférico dos pacientes submetidos à endarterectomia antes do procedimento cirúrgico, em tubos contendo heparina sódica.

8. Ensaio imunoenzimático para detecção de IFN- γ , IL-17, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-23 e MMP9

As amostras de sobrenadante de cultura ou plasma heparinizado foram testadas em duplicata, utilizando-se ensaio imunoenzimático do tipo sanduíche (kit Duo Set – R&D Systems - para a detecção de IFN- γ , IL-17, IL-1 β , IL-6, MMP9 e IL-10; eBioscience - San Diego, CA, EUA – para a detecção de IL-23), de acordo com as instruções dos fabricantes. Em resumo, placas de 96 cavidades foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, diluído em tampão PBS (pH 7,2 – 7,4) durante uma noite à temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3 vezes (PBS – Tween[®] 20 0,05%) seguidas da adição de tampão de bloqueio (PBS – BSA 1% - 0,05% NaN₃) e incubação por 1 hora à temperatura ambiente. O procedimento de lavagem foi repetido, seguido da adição das amostras referentes à curva padrão (sete pontos) e das amostras a serem testadas. Após incubação de 2 horas à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas seguindo-se a adição de anticorpos de detecção biotinilados (diluídos em tampão PBS – Tween[®] 20) e posterior incubação de 2 horas à temperatura ambiente. Completado o tempo repetiu-se o procedimento de lavagem e adicionou-se o complexo estreptoavidina-peroxidase, seguido de incubação por 20 minutos à temperatura ambiente. A lavagem foi repetida e em seguida foi adicionado o substrato/cromógeno (TMB [200 μ g/mL] + H₂O₂ [0,03%], diluído em tampão acetato de sódio/ácido acético – 0,1M – pH 5,5), com incubação por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com a adição de H₂SO₄ [2N]. As absorbâncias foram determinadas em leitora de ELISA (Labsystems Multiskan MS, Finlândia) a 450 nm. O limite de detecção dos ensaios

utilizados foi de 15,6 pg/mL para IL-17 e IFN- γ ; 3,9 pg/mL para IL-1 β ; 9,3 pg/mL para IL-6 e 31,2 pg/mL para MMP9, IL-10 e IL-23.

9. Isolamento de monócitos/macrófagos e linfócitos da lesão aterosclerótica

As lesões obtidas cirurgicamente foram acondicionadas em tubo FALCON de 50 mL contendo meio RPMI (Invitrogen) e transportadas ao laboratório em gelo. As amostras foram lavadas duas vezes com meio de cultura, cortadas e incubadas em placa de cultura (Corning, NY, EUA) por 1,5 hora em meio RPMI suplementado (soro AB 10% + L-glutamina [2mM] + gentamicina [10 μ g/mL]) contendo 2 mg/mL de liberase (Blendzymes, Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha) a 37°C em estufa de CO₂ (5%). Em seguida foi adicionado 2 mL de soro AB inativado estéril (para bloquear a ação enzimática) e o material foi lavado 3 vezes com meio suplementado, transferido para placa de cultura (Corning) e incubado *overnight* em meio suplementado contendo 1mg/mL de liberase a 37°C em estufa de CO₂ (5%).

Após este período o material foi lavado 3 vezes com meio suplementado, ressuspensionado em meio de cultura, dissociado usando equipamento Medimachine (BD Biosciences) e filtrado em dispositivo Filcons (BD Biosciences) com poros de 70 μ m. Após a filtração, foi realizada a separação de células mononucleares por gradiente de densidade utilizando Ficoll-Hipaque. As células obtidas foram ressuspensionadas em meio RPMI suplementado e estimuladas por 72 horas com 10 μ g/mL de PHA (Sigma) a 37°C em estufa de CO₂ (5%). Ao término do tempo de incubação, as células foram coletadas e submetidas à imunofluorescência para os marcadores de superfície CD3, CD4, CD8, CD68, CD69, MHC II, CD19, CD56, CD62E e marcação intracelular para as citocinas IL-17 e IFN- γ .

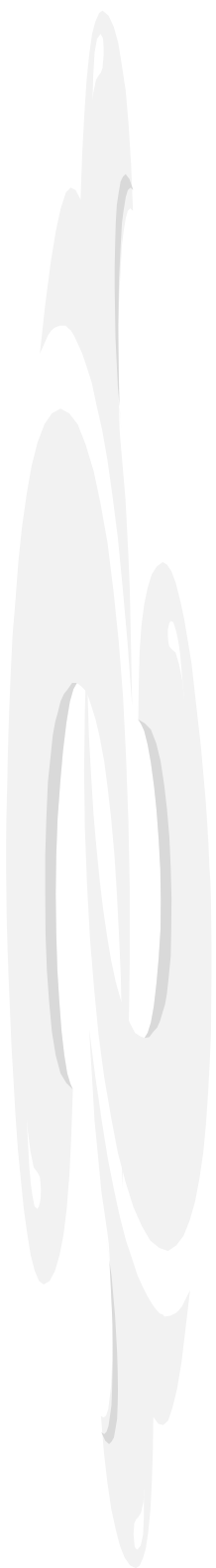
10. Imunofluorescência e citometria de fluxo

Após a obtenção das células mononucleares, 20 μ L da suspensão de células (aproximadamente 2×10^5 células) foram transferidas para placas de microtitulação (96 cavidades) contendo a mistura de anticorpos para a marcação

de superfície diluídos em 20 μ L de PBS-B (PBS-BSA (0,5%), seguido de incubação por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após a incubação, as placas foram centrifugadas (1250 r.p.m., 10 minutos, temperatura ambiente), o sobrenadante descartado e adicionado 200 μ L do tampão PBS-B seguido de centrifugação. Após nova centrifugação o sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas (vórtex) e adicionado 200 μ L de formaldeído a 2% em PBS a cada cavidade, incubando-se por 15 minutos à temperatura ambiente. Após nova centrifugação as células foram ressuspensas e adicionado 200 μ L de tampão de permeabilização (PBS – BSA [0,1%] – Saponina [0,5%]) com incubação da placa por 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram novamente centrifugadas, ressuspensas, quando então foram submetidas a marcação intracitoplasmática com uma mistura de anticorpos diluídos em 20 μ L de tampão de permeabilização. Após incubação em temperatura ambiente por 30 minutos foi adicionado a cada cavidade 150 μ L de tampão de permeabilização e a placa foi centrifugada (1250 r.p.m., 10 minutos, 4°C). O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas (vórtex) em 200 μ L de tampão PBS-B-A. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em 250 μ L de formaldeído a 2%, transferidas para tubos de microtitulação e analisadas em citômetro de fluxo (FACScalibur – Beckton & Dickinson), por meio de software específico (CellQuest – Beckton & Dickinson). As leituras foram realizadas em um intervalo máximo de 24 horas e os resultados expressos em porcentagem de células positivas.

11. Análise estatística

Os resultados foram analisados com o software GraphPad 5.0. As diferenças entre os grupos quanto aos parâmetros analisados foram avaliadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. As variações dentro do mesmo grupo, após diferentes estímulos, foram avaliadas pelo teste de Wilcoxon. Foram consideradas significantes diferenças com valor de $p \leq 0,05$.



Resultados

1. Parâmetros clínicos dos pacientes submetidos à endarterectomia carotídea

Na tabela V estão descritos os parâmetros clínicos e bioquímicos dos 41 pacientes submetidos à endarterectomia carotídea incluídos neste estudo. A média de idade dos pacientes foi de 66,9 anos sendo a maioria das amostras provenientes de indivíduos do sexo masculino (33 homens e 8 mulheres). Entre os fatores de risco para o desenvolvimento de doença aterosclerótica, pode-se observar grande incidência de hipertensão arterial (70,7%), seguido por dislipidemia (63,%), tabagismo (39,0%), diabetes (24,3%) e obesidade (4,8%). Os esquemas terapêuticos mais frequentemente em uso foram estatina (78,0%) e aspirina (75,6%), além de inibidores da enzima conversora de angiotensina, β -bloqueadores, insulina, antagonista de cálcio e diurético. As doenças prévias mais freqüentes no grupo estudado foram acidente vascular cerebral (56,0%), doença arterial periférica (41,4%) e outras, porém com menor incidência (angina estável e insuficiência cardíaca: 17,0%; angioplastia e revascularização prévia: 9,7%; infarto agudo do miocárdio: 7,3% e angina instável: 2,4%).

Tabela V – Parâmetros clínicos dos pacientes submetidos à endarterectomia carotídea

Característica	Pacientes (n=41)
Idade, anos	66,9 (49 – 89)
Sexo, homens/mulheres	33/8
Hipertensão arterial (%)	29 (70,7)
Dislipidemia (%)	26 (63,4)
Tabagismo (%)	16 (39,0)
Diabetes (%)	10 (24,3)
Obesidade (%)	2 (4,8)
Estatina (%)	32 (78,0)
Aspirina (%)	31 (75,6)
IECA (%)	21 (51,2)
β -bloqueador (%)	19 (46,3)
Diurético (%)	12 (29,2)
Antagonista de cálcio (%)	11 (26,8)
Insulina (%)	7 (17,0)
AVC (%)	23 (56,0)
Doença arterial periférica (%)	17 (41,0)
ICC (%)	7 (17,0)
AE (%)	7 (17,0)
Angioplastia (%)	4 (9,7)
Revascularização prévia (%)	4 (9,7)
IAM (%)	3 (7,3)
AI (%)	1 (2,4)

IECA: inibidores da enzima conversora de angiotensina ; AVC: acidente vascular cerebral, ICC: insuficiência cardíaca congestiva; AE: angina estável; IAM: infarto agudo do miocárdio; AI: angina estável

2. Determinação da concentração plasmática de IL-17 e IL-23

A reação inflamatória presente na aterosclerose é considerada de baixa intensidade (*low grade inflammation*), devido ao comprometimento de pequenas áreas da vasculatura. Entretanto, alguns marcadores inflamatórios, como a IL-6 e a PCR, podem ser detectados no plasma de pacientes com doença coronariana em concentrações mais elevadas, do que em controles saudáveis (133). Inicialmente procedemos à determinação da concentração plasmática de IL-17 e IL-23 em pacientes com estenose crítica de carótida e submetidos à endarterectomia. Em todos os pacientes a concentração de IL-17 e IL-23 estavam abaixo do limite de detecção do kit utilizado para a dosagem das citocinas (15,6 pg/mL para IL-17 e 31,2 pg/mL para IL-23) (dados não mostrados).

Em uma última tentativa estimulamos monócitos em cultura com 20 pg/mL de LDLox, antígeno abundantemente presente nas placas ateroscleróticas. Novamente não foi detectada a presença de IL-23 e tampouco de IL-17 pelo método empregado (ELISA, dados não mostrados).

3. Análise da expressão gênica em amostras de lesão aterosclerótica

A análise da expressão gênica foi realizada em dezoito fragmentos de ateroma e em três amostras de artéria carótida controle obtidas de doadores de órgãos. As características clínicas dos pacientes que participaram do estudo estão descritas na tabela VI. A maioria das amostras foi obtida de pacientes do sexo masculino (homens: 83,3%; mulheres: 16,6%) com idade média de 65,6 anos (49 a 89 anos). Quanto aos fatores de risco para desenvolvimento de aterosclerose a maioria dos pacientes apresentou dislipidemia (72,2%), hipertensão arterial (61,1%) e estavam em uso de aspirina (83,3%) e estatina (77,7%). A maioria das amostras (83,3%) foi obtida de pacientes considerados assintomáticos, segundo os critérios descritos em Casuística e Métodos (item 1).

Os resultados da análise da expressão gênica foram reunidos em 6 grupos: genes relacionados à resposta T_H17 ; genes relacionados a resposta T_H1 e T_H2 ; genes de citocinas pró-inflamatórias clássicas; genes relacionados ao controle da resposta inflamatória; genes relacionados a degradação da matriz extracelular e genes relacionados a resposta citotóxica.

Tabela VI – Parâmetros clínicos dos pacientes cujas amostras foram utilizadas para análise de expressão gênica

Paciente	Idade	Sexo	HAS	Tabagismo	Dislipidemia	Obesidade	Diabetes	Classificação	Estatina	Aspirina	IECA
1	71	M	-	-	+	-	-	assintomático			
2	57	M	-	-	-	-	-	assintomático	-	+	+
3	78	M	+	-	+	-	-	assintomático	+	+	+
4	52	M	+	+	+	-	+	assintomático	+	+	+
5	64	F	+	+	+	+	-	assintomático	+	+	+
6	76	M	+	-	+	-	-	assintomático	+	+	+
7	89	M	-	+	-	-	-	assintomático	-	+	+
8	71	M	-	-	+	-	-	assintomático	+	+	+
9	49	F	-	+	+	-	-	assintomático	+	+	-
10	60	M	+	+	-	-	-	assintomático	+	+	+
11	60	M	+	-	+	+	-	assintomático	+	-	-
12	62	M	-	+	-	-	-	assintomático			
13	69	M	+	-	+	-	-	sintomático	+	+	-
14	60	M	+	-	+	-	+	assintomático	+	+	+
15	65	M	+	+	+	-	-	sintomático	+	+	-
16	70	M	+	-	+	-	-	assintomático	+	+	-
17	61	F	+	-	+	-	-	sintomático	+	+	-
18	67	M	-	+	-	-	-	assintomático	+	+	-

3.1. Expressão de genes relacionados à resposta T_H17

Para a caracterização da resposta T_H17 nas placas ateroscleróticas analisamos diferentes mediadores (citocinas, quimiocinas, receptores de quimiocinas e fatores de transcrição) relacionados. Embora todas as placas expressassem RNAm para o receptor de IL-17, a detecção do RNAm para IL-17 foi rara nos pacientes (11%) e ausente nos controles (fig. 5).

A expressão do fator de transcrição Ror γ t é necessária e suficiente para o controle da transcrição da IL-17 e para a diferenciação de células T_H17 a partir de células T *naïve* (91). Em nosso estudo detectamos o RNAm para RorC em 83% das placas de pacientes (fig. 5), e também em amostras controle, mas em quantidade significativamente menor (fig. 7).

A sobrevivência dos linfócitos T_H17 nos tecidos é promovida pela citocina IL-23 (92), composta de duas subunidades: a p40, compartilhada com a IL-12 e a p19 que a caracteriza (131). A análise do RNAm mostrou expressão de IL-23p19 em todas as amostras de pacientes analisadas (fig. 5). Além disso, a expressão do RNAm para IL-23p19 foi significativamente maior nos pacientes, comparada ao grupo controle (fig.7).

Os linfócitos T_H17 podem ser caracterizados pela produção de citocinas, como a IL-22 (132); pela produção da quimiocina CCL20, envolvida em mecanismos de recrutamento de células T_H17 para os tecidos (ação autócrina); e pela expressão dos receptores de quimiocinas CCR4 e CCR6, que garantem a sua mobilização para os tecidos inflamados (99). A análise da expressão gênica mostrou RNAm para CCR6, CCR4, CCL20 e IL-22 em 94%, 89%, 50% e 44% das amostras de pacientes analisadas, respectivamente (fig. 6). Entretanto, diferenças significativas entre pacientes e controles foram observadas apenas em relação ao CCR4 (fig. 7).

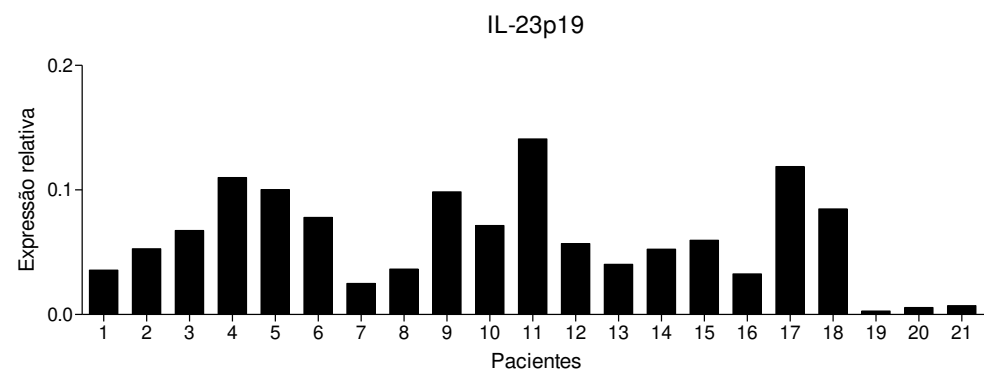
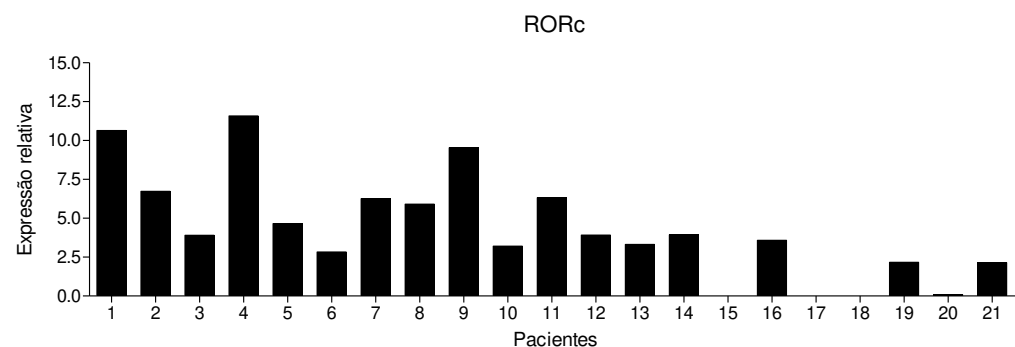
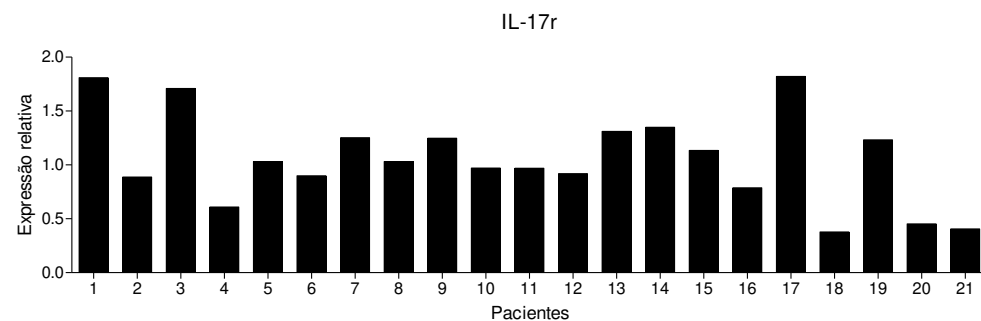
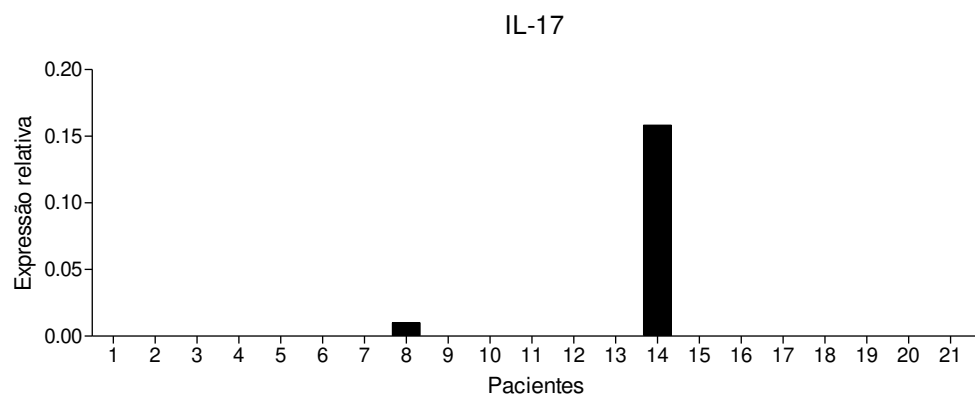


Figura 5 – Expressão gênica de marcadores (IL-17, IL-17R, RorC e IL-23p19) relacionados à resposta T_H17 em fragmentos de ateroma. As amostras de lesão correspondem às barras 1 a 18. As amostras 19, 20 e 21 referem-se às artérias controle.

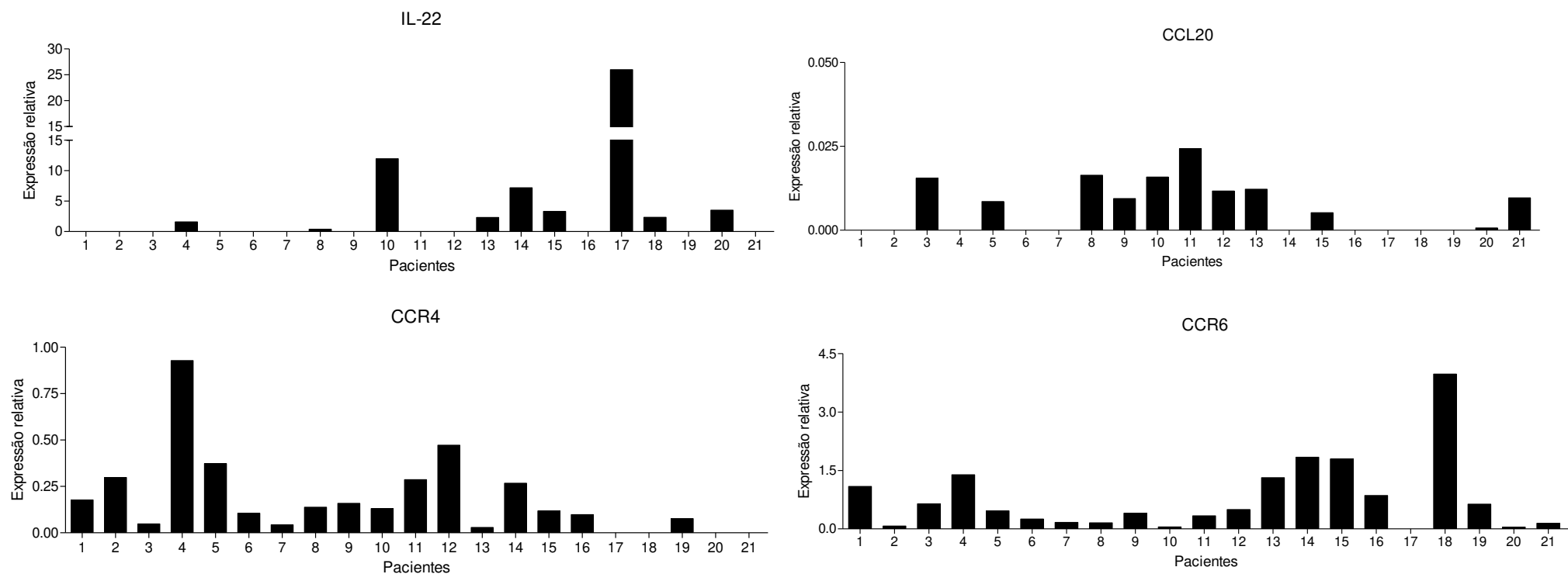


Figura 6 – Expressão gênica de marcadores (IL-22, CCL20, CCR4 e CCR6) relacionados à resposta T_H17 em fragmentos de ateroma. As amostras de lesão correspondem às barras 1 a 18. As amostras 19, 20 e 21 referem-se às artérias controle.

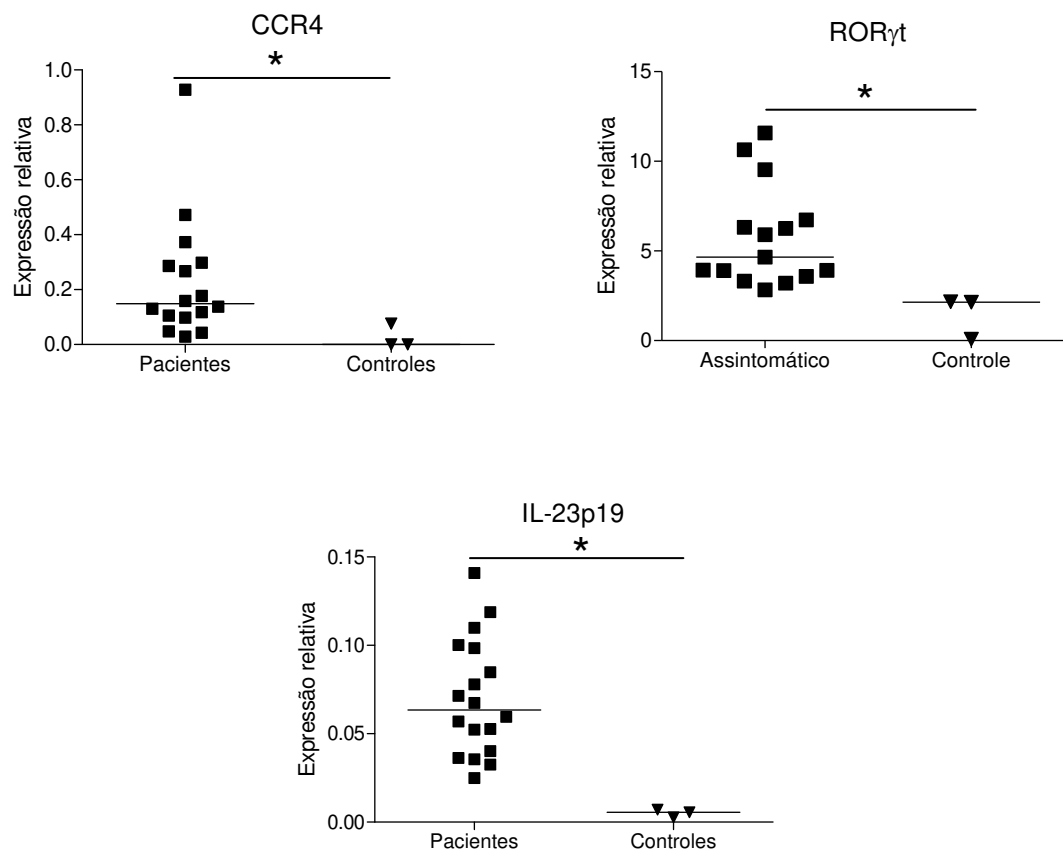


Figura 7 – Expressão relativa do RNAm de genes relacionados à resposta T_H17 em fragmentos de ateroma e artérias controle. * $p < 0,05$. Mann Whitney

3.2. Expressão de genes relacionados às respostas T_H1 e T_H2

A resposta inflamatória na aterosclerose tem sido, habitualmente, relacionada à presença de linfócitos T_H1 produtores de IFN- γ , que promovem mecanismos de ruptura da lesão (7). Células T_H2 também já foram descritas nas lesões ateroscleróticas, embora seu papel ainda não esteja totalmente elucidado, podendo ter tanto ação pró-inflamatória como anti-inflamatória (133). Trabalhos recentes mostraram que a presença de linfócitos TCD4⁺ T_H1 ou T_H2 podem inibir a polarização de células T_H17 (86).

A expressão de genes relacionados à resposta T_H1, como IFN- γ , IL-2, T-bet (fator de transcrição específico desta população celular) e a subunidade p35 da IL-12 (IL-12p35) foi detectada na maioria das placas de pacientes (77%, 66%, 94% e 83%, respectivamente), mas, praticamente ausente nos controles (fig. 8). Entretanto, em termos comparativos, apenas a expressão do RNAm para IFN- γ foi significativamente maior no grupo de pacientes, em relação aos controles (fig.10). Por outro lado, a expressão de GATA-3, principal fator de transcrição das células T_H2, foi observada em todas as amostras de pacientes analisadas (100%) e em concentrações significativamente maiores do que nas amostras controle (figs. 9 e 10).

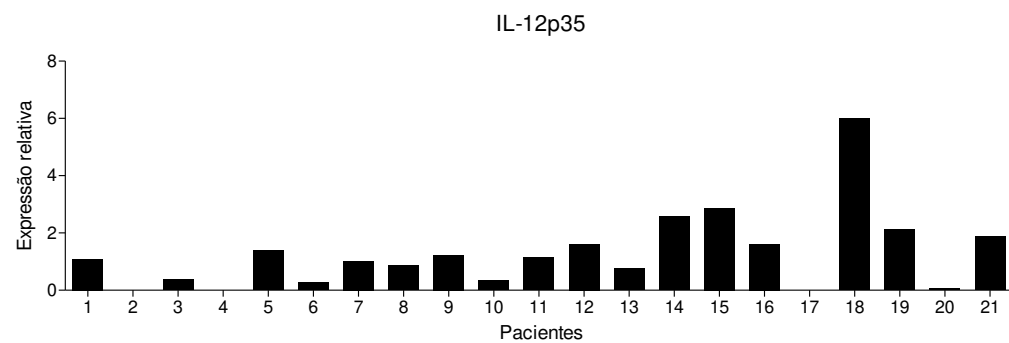
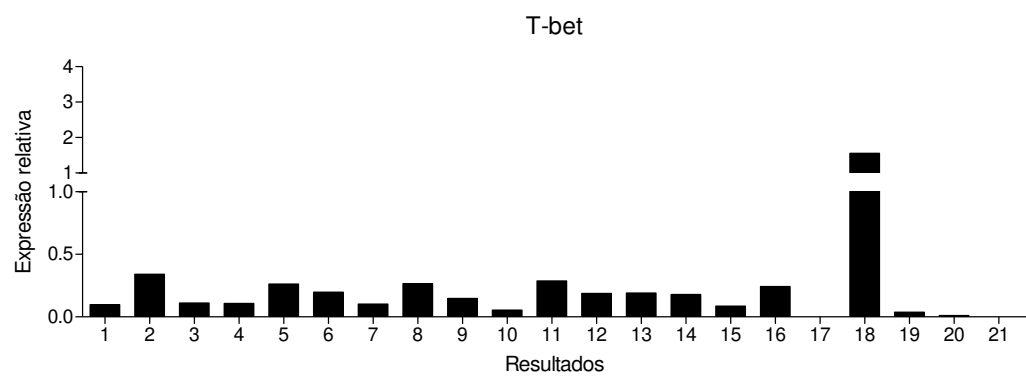
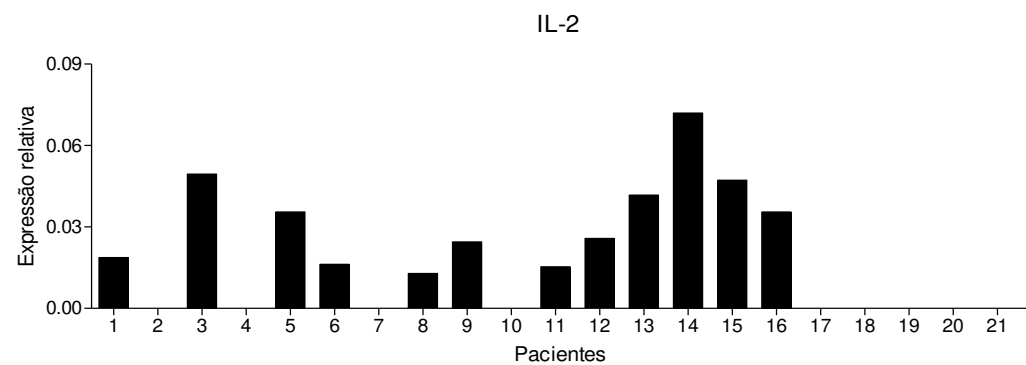
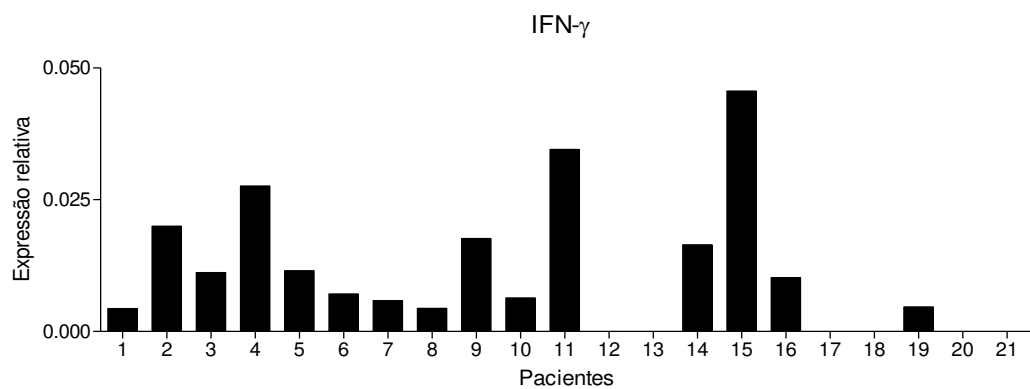


Figura 8 – Expressão gênica de marcadores (IFN- γ , IL-2, T-bet e IL-12p35) relacionados à resposta T_H1 em fragmentos de ateroma. As amostras de lesão correspondem às barras 1 a 18. As amostras 19, 20 e 21 referem-se às artérias controle.

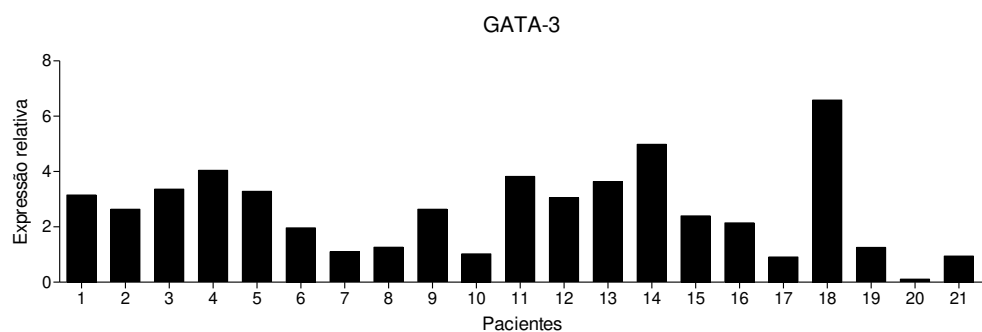


Figura 9 – Expressão gênica de marcador (GATA-3) relacionado à resposta T_H2 em fragmentos de ateroma. As amostras de lesão correspondem às barras 1 a 18. As amostras 19, 20 e 21 referem-se às artérias controle.

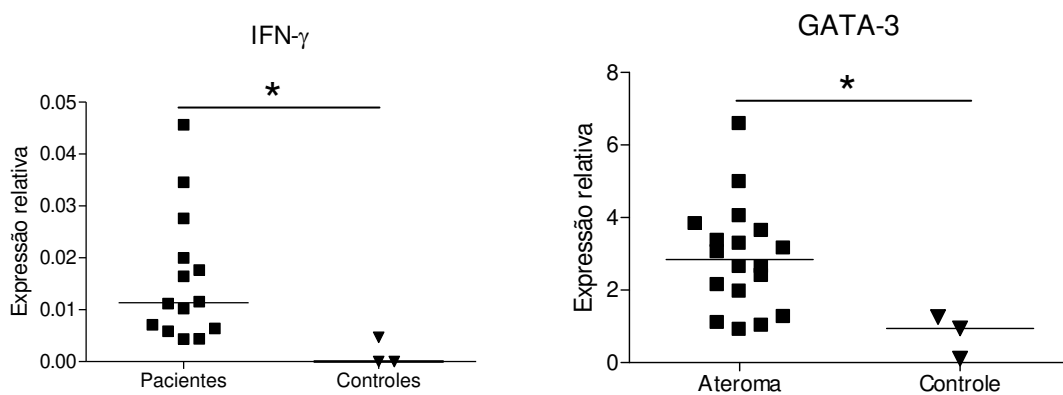


Figura 10 – Expressão relativa do RNAm de genes relacionados à resposta T_H1 e T_H2 em fragmentos de ateroma e artérias controle. * $p < 0,05$. Mann Whitney

3.3. Expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias clássicas

Os macrófagos e as células espumosas são os tipos celulares mais abundantes da lesão aterosclerótica. A ativação dessas células promove a liberação de diversos mediadores da resposta inflamatória, como as citocinas da imunidade inata (IL-1 β , IL-6, TNF- α). Além disso, o reconhecimento de antígenos presentes na placa por macrófagos, por intermédio dos receptores que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PRRs), com sua posterior ativação é uma etapa crucial para o direcionamento da resposta imunológica adaptativa (134).

O RNAm para IL-1 β e TNF- α foi detectado em todas as amostras de pacientes analisadas (100%) e em concentração relativa mais elevada do que nos controles (figs. 11 e 12). Por outro lado, não houve diferença entre pacientes e controles no que se refere a expressão do RNAm para IL-6, que foi muito baixa em todas as amostras (figs. 11 e 12).

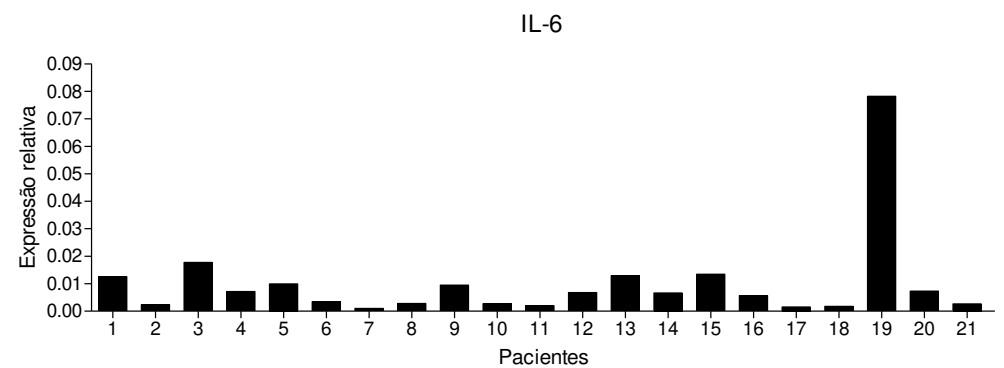
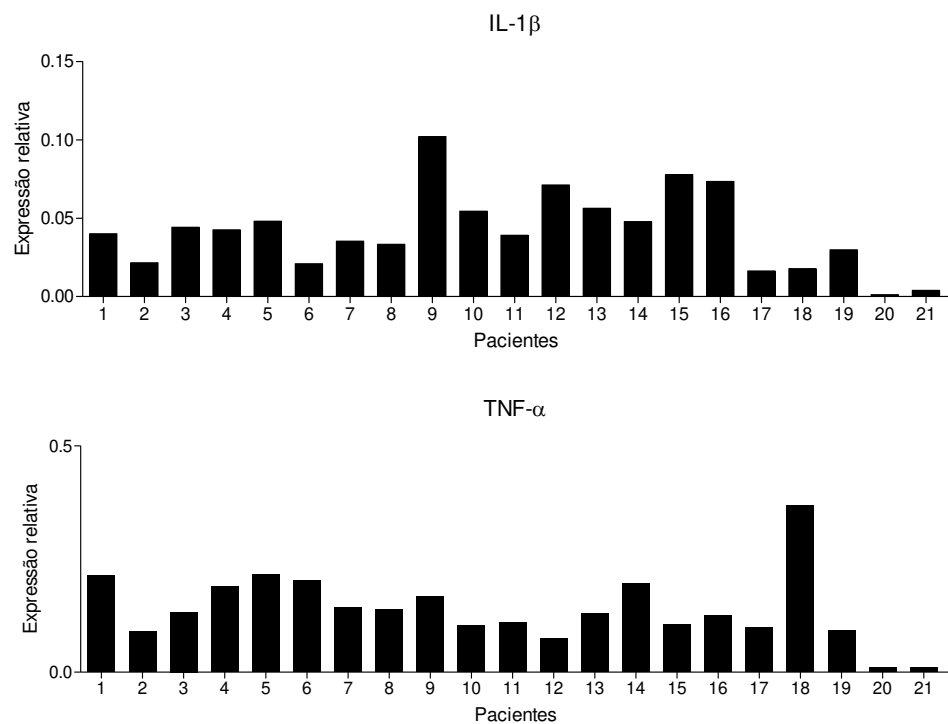


Figura 11 – Expressão gênica de marcadores (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) relacionados à resposta pró-inflamatória clássica em fragmentos de ateroma. As amostras de lesão correspondem às barras 1 a 18. As amostras 19, 20 e 21 referem-se às artérias controle.

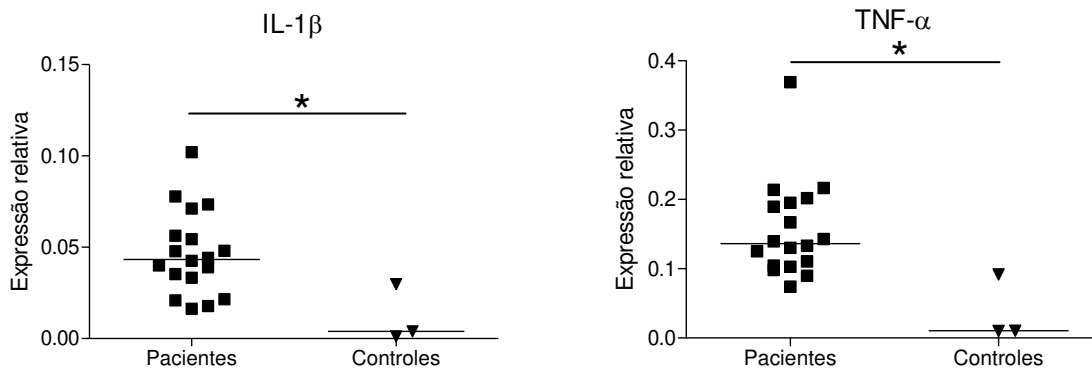


Figura 12 – Expressão relativa do RNAm de genes relacionados à resposta pró-inflamatória clássica em fragmentos de ateroma e artérias controle. * $p < 0,05$. Mann Whitney

3.4. Expressão de genes relacionados ao controle da resposta inflamatória

Trabalhos recentes têm demonstrado a presença concomitante de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios nas lesões ateroscleróticas (135), estes últimos com a importante função de controlar a resposta inflamatória/imunológica exacerbada, que resulta em destruição tecidual e agravamento do quadro.

A IL-10 inibe processos que levam a progressão, ruptura e trombose da placa, incluindo produção de citocinas e MMPs (como a MMP-9) (136). Em nosso estudo detectamos RNAm para IL-10 na grande maioria das placas de pacientes (89%) e em quantidades significativamente mais elevadas que nas artérias controle (figs. 13 e 14).

Por outro lado, em relação a expressão de TGF- β , outra citocina com atividade inibitória, não houve diferença significativa entre pacientes e controles (figs. 13 e 14).

Células T regulatórias naturais e induzidas (Treg) apresentam como fator de transcrição a molécula FOXP3 e exercem sua atividade supressora por intermédio da produção de citocinas inibitórias como a IL-10 e o TGF- β . Estudo recente relatou a presença de células Treg em lesões ateroscleróticas e seu papel no controle da inflamação local foi aventado (112). Em concordância, a maioria (89%) das placas analisadas em nosso estudo mostraram expressão do RNAm para FOXP3 e em quantidade mais elevada do que nos controles (Figs 13 e 14).

Outro grupo de células com caráter regulatório pode ser induzido na presença de IL-27. Essas células são denominadas T regulatórias 1 (Tr1) e inibem a resposta inflamatória pela produção de IL-10 (137). Foi demonstrado que a transferência adotiva de células Tr1 para animais propensos a desenvolver aterosclerose (Apo-E^{-/-}) resulta na redução das lesões (138).

A IL-27 e a IL-35, outra citocina relacionada à resposta inibitória das células Treg, compartilham a cadeia EBI3, que na IL-27 é associada à p28 e na IL-35 à p35 (139). Todas as amostras de placa aterosclerótica mostraram expressão do RNAm para IL-27r e EBI3 e em quantidade mais elevada do que nas artérias controle (figs. 13 e 14).

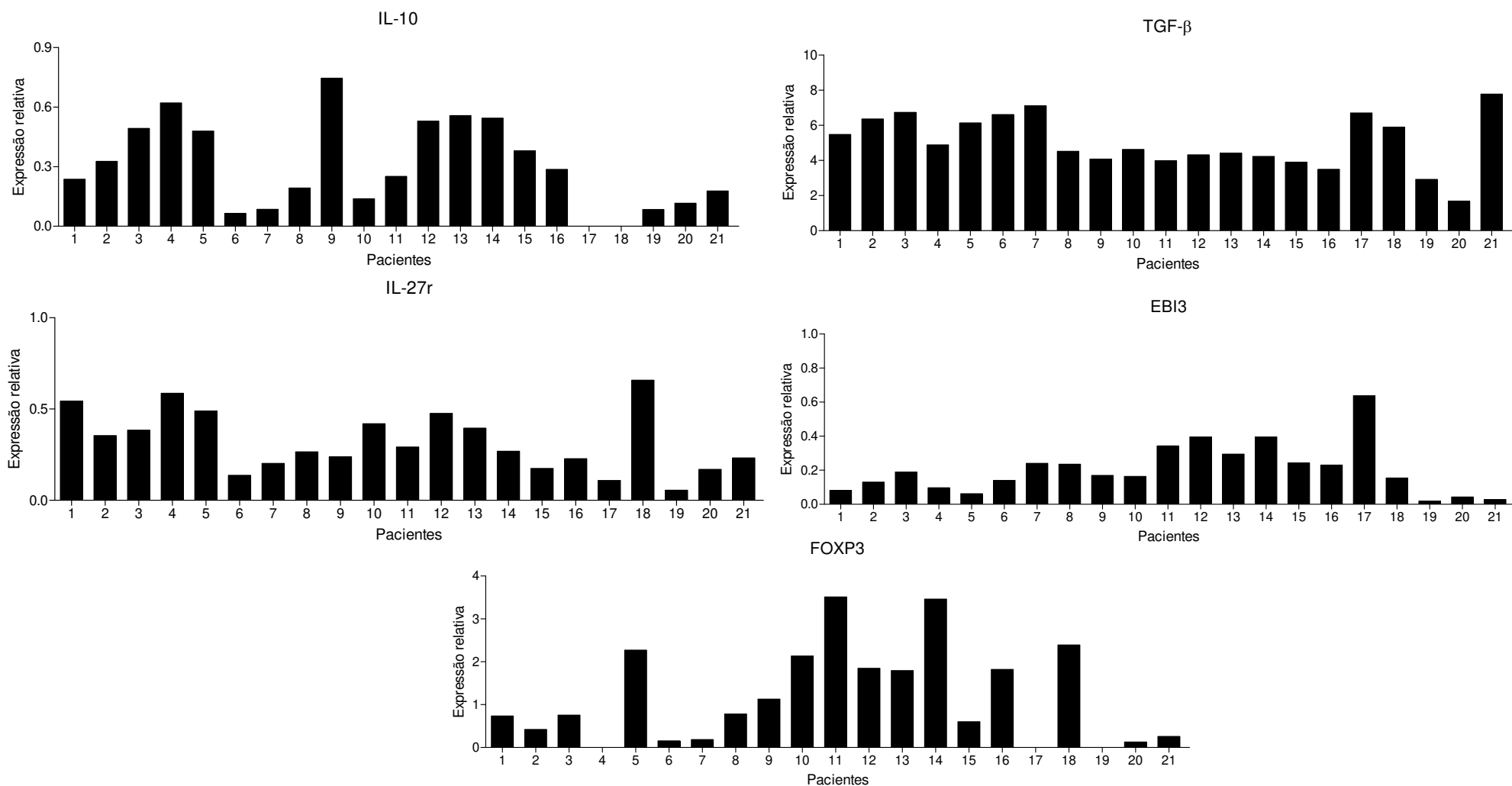


Figura 13 – Expressão gênica de marcadores (IL-10, TGF-β, IL-27r, EBI3 e FOXP3) relacionados ao controle da resposta inflamatória em fragmentos de ateroma. As amostras de lesão correspondem às barras 1 a 18. As amostras 19, 20 e 21 referem-se às artérias controle.

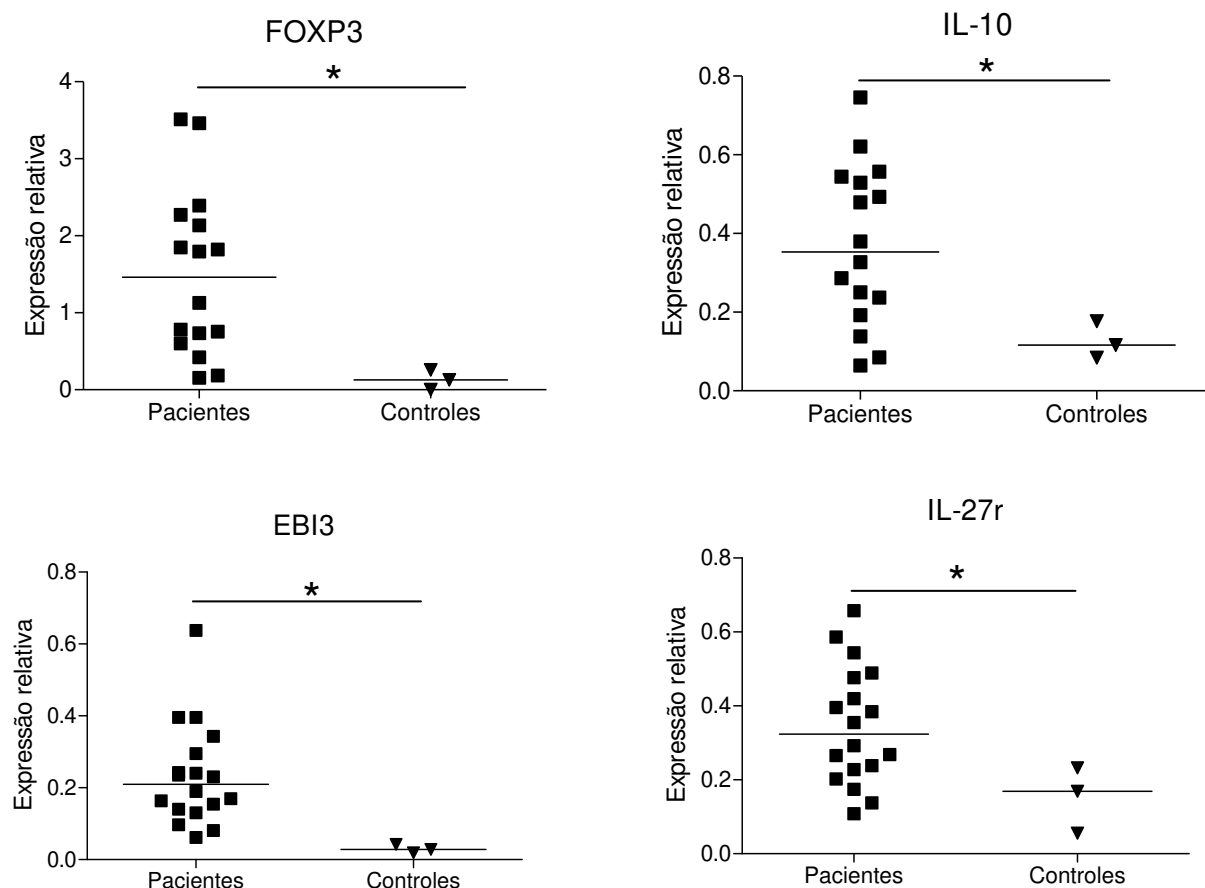


Figura 14 – Expressão relativa do RNAm de genes relacionados ao controle da resposta inflamatória em fragmentos de ateroma e artérias controle. * $p < 0,05$. Mann Whitney

3.5. Expressão de genes relacionados à degradação da matriz extracelular

Macrófagos e as células espumosas, após serem ativados por citocinas produzem mediadores envolvidos com mecanismos de ruptura das lesões como as metaloproteinases (MMP), principalmente a MMP9 (7). A análise da expressão gênica mostrou que 94% das amostras de lesão analisadas apresentaram expressão do RNAm para MMP9 (fig. 15), e em concentrações maiores que o grupo controle (fig. 16)

Finalmente, dada a importância das metaloproteinases como a MMP9 na ruptura das lesões ateroscleróticas, julgamos interessante avaliar a expressão de TIMP-1, seu inibidor endógeno. Assim como para a MMP9, o RNAm para TIMP-1 foi detectado em 94% das placas analisadas em concentração relativa maior que nos controles (Figs 15 e 16).

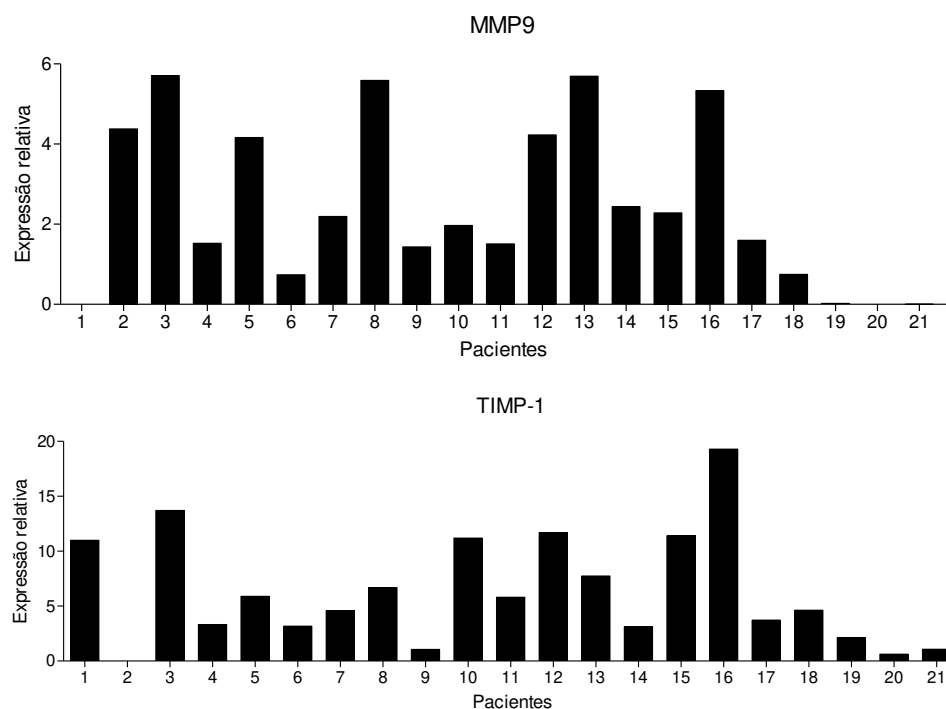


Figura 15 – Expressão gênica de marcadores (MMP9 e TIMP-1) relacionados com os mecanismos de degradação de matriz extracelular em fragmentos de ateroma. As amostras de lesão correspondem às barras 1 a 18. As amostras 19, 20 e 21 referem-se às artérias controle.

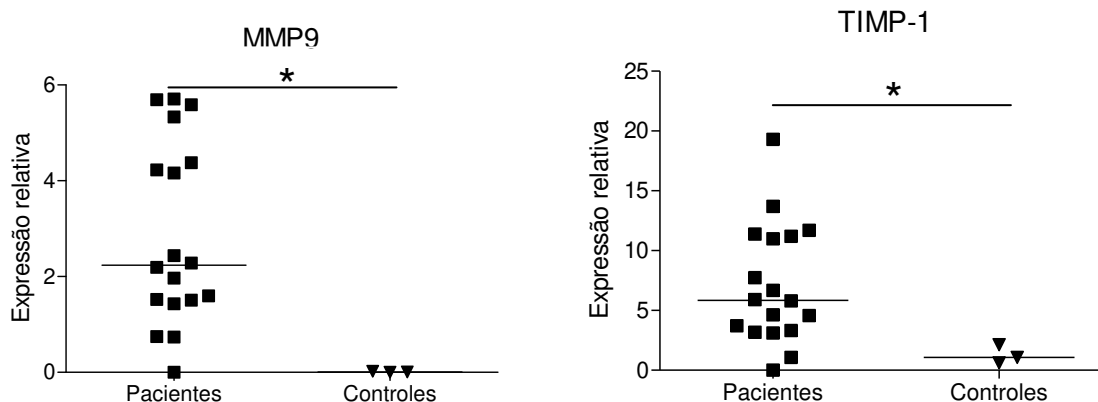


Figura 16 – Expressão relativa do RNAm de genes relacionados com mecanismos de degradação de matriz extracelular em fragmentos de ateroma e artérias controle. * $p < 0,05$. Mann Whitney

3.6. Expressão de genes relacionados à resposta citotóxica

Trabalhos recentes sugerem que a granzima B, grânulo citotóxico produzido primordialmente por células T citotóxicas e células NK, com estabelecida função na lise de células infectadas e neoplásicas, pode também estar envolvida no remodelamento da matriz extracelular em várias doenças inflamatórias (140). Entretanto, a participação desta e outras moléculas citotóxicas foram pouco exploradas na aterosclerose.

Analizamos a expressão gênica de 4 moléculas citotóxicas nas amostras de placa ateroscleróticas e artérias controle. Observamos elevada expressão do RNAm para granulicina (100%), granzima A (94%), granzima B (88%) e perforina (100%) nas amostras de lesão (fig. 17). Com exceção da granzima B, as placas ateroscleróticas de pacientes expressaram níveis significativamente maiores de granzima A, perforina e granulicina do que as artérias controle (fig. 18).

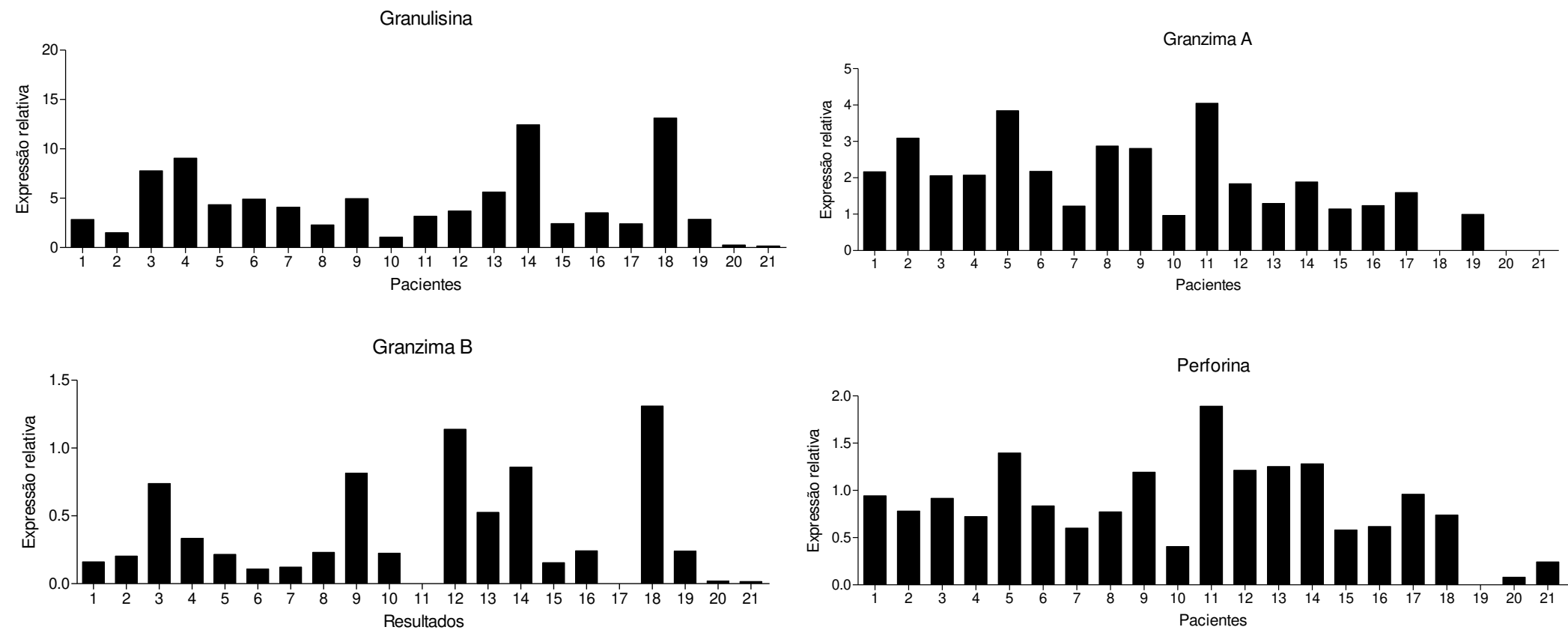


Figura 17 – Expressão gênica de marcadores relacionados à resposta citotóxica (granulins, granzima A, granzima B e perforina) em fragmentos de aterosclerose. As amostras de lesão correspondem às barras 1 a 18. As amostras 19, 20 e 21 referem-se às artérias controle.

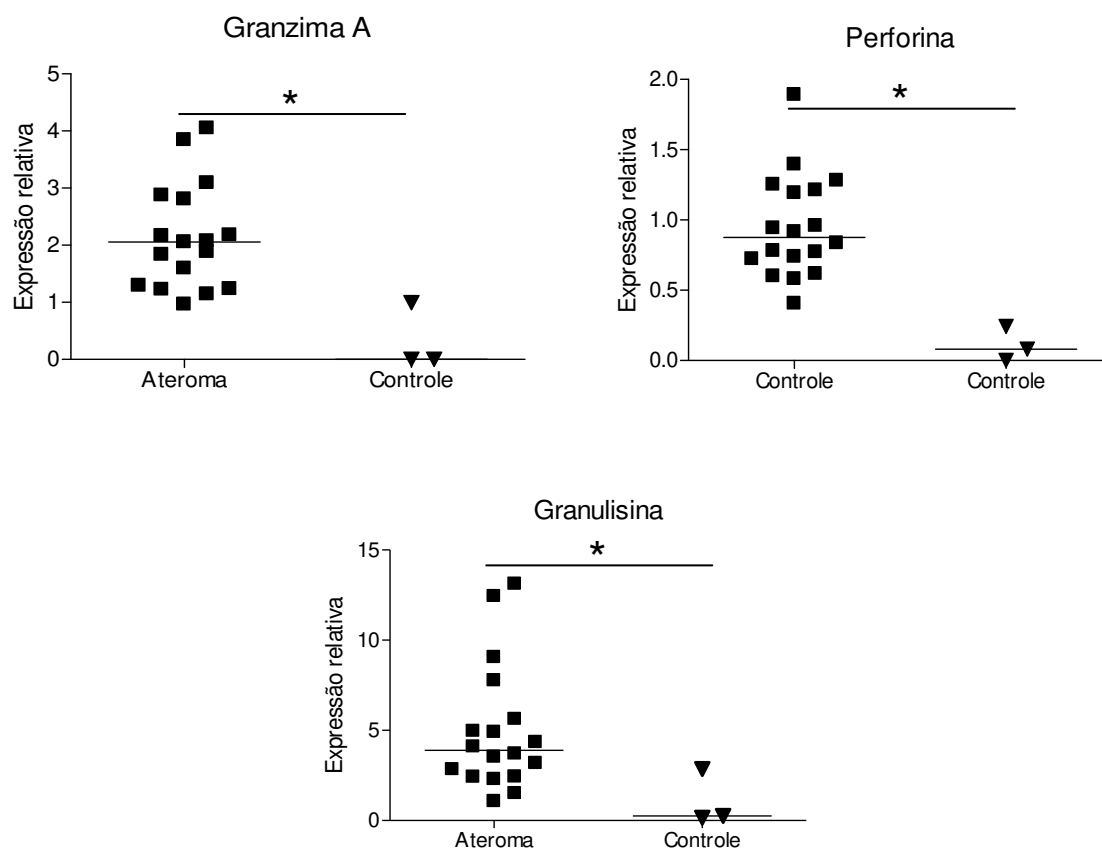


Figura 18 – Expressão relativa do RNAm de genes relacionados com a atividade citotóxica em fragmentos de ateroma e artérias controle. * $p < 0,05$. Mann Whitney

4. Análise histológica e imunoistoquímica

Para a análise histológica e imunoistoquímica foram utilizadas 14 amostras de lesão aterosclerótica, classificadas em estáveis ou instáveis, de acordo com a presença de cristais de colesterol (fig. 19A), calcificação (fig.19A), necrose (fig. 19B) e macrófagos (células CD68⁺) (fig. 20). Além desses, outros parâmetros foram avaliados por imunoistoquímica, com o objetivo de caracterizar a resposta inflamatória/imunológica presente na placa aterosclerótica.

As tabelas VII e VIII resumem os principais resultados encontrados, incluindo a semi-quantificação dos parâmetros avaliados, expressa em cruzes da seguinte forma: (+) marcadores positivos em um campo de maior aumento (x40), (++) em 2 ou 3 campos, (+++) em mais de 3 campos.

Aproximadamente 50% das amostras receberam a classificação estável por apresentar pequena quantidade de cristais de colesterol, necrose, calcificação e células CD68⁺ (fig. 19 e 21A), além da expressão de citocinas pro-inflamatórias. Em contrapartida, 42,8% das amostras analisadas apresentaram fenótipo instável, com grande quantidade de cristais de colesterol, necrose, calcificação e macrófagos. Em três casos que apresentavam resposta inflamatória intensa foram observadas células multinucleadas (fig. 21B).

Um aspecto importante a ser salientado é que devido a técnica cirúrgica, as amostras obtidas continham apenas a camada íntima. Em poucas amostras foram visualizados resquícios da camada média, reconhecida pela presença de células musculares lisas.

Tabela VII – Fenótipo das lesões utilizadas nas análises de imunoistoquímica

Amostra	Macrófago (CD68 ⁺)	Cristais de colesterol	Calcificação	Necrose	Fenótipo
1	+	-	+++	-	Estável
2	+	+++	+	++	Estável
3	+++ [*]	+++	+++	+++	Instável
4	+++ ^{**}	+++	+++	+++	Instável
5	++	-	-	+	Estável
6	+++	+	+++	+++	Instável
7	++	+++	++	+++	Instável
8	++	+++	+++	+++	Instável
9	+	+	++	+	Estável
10	++	++	+++	++	Intermediária
11	+	-	+	-	Estável
12	+	+	++	+	Estável
13	+	+	+	++	Estável
14	+++ [*]	+++	+++	+++	Instável

* presença de algumas células multinucleadas

** grande quantidade de células multinucleadas

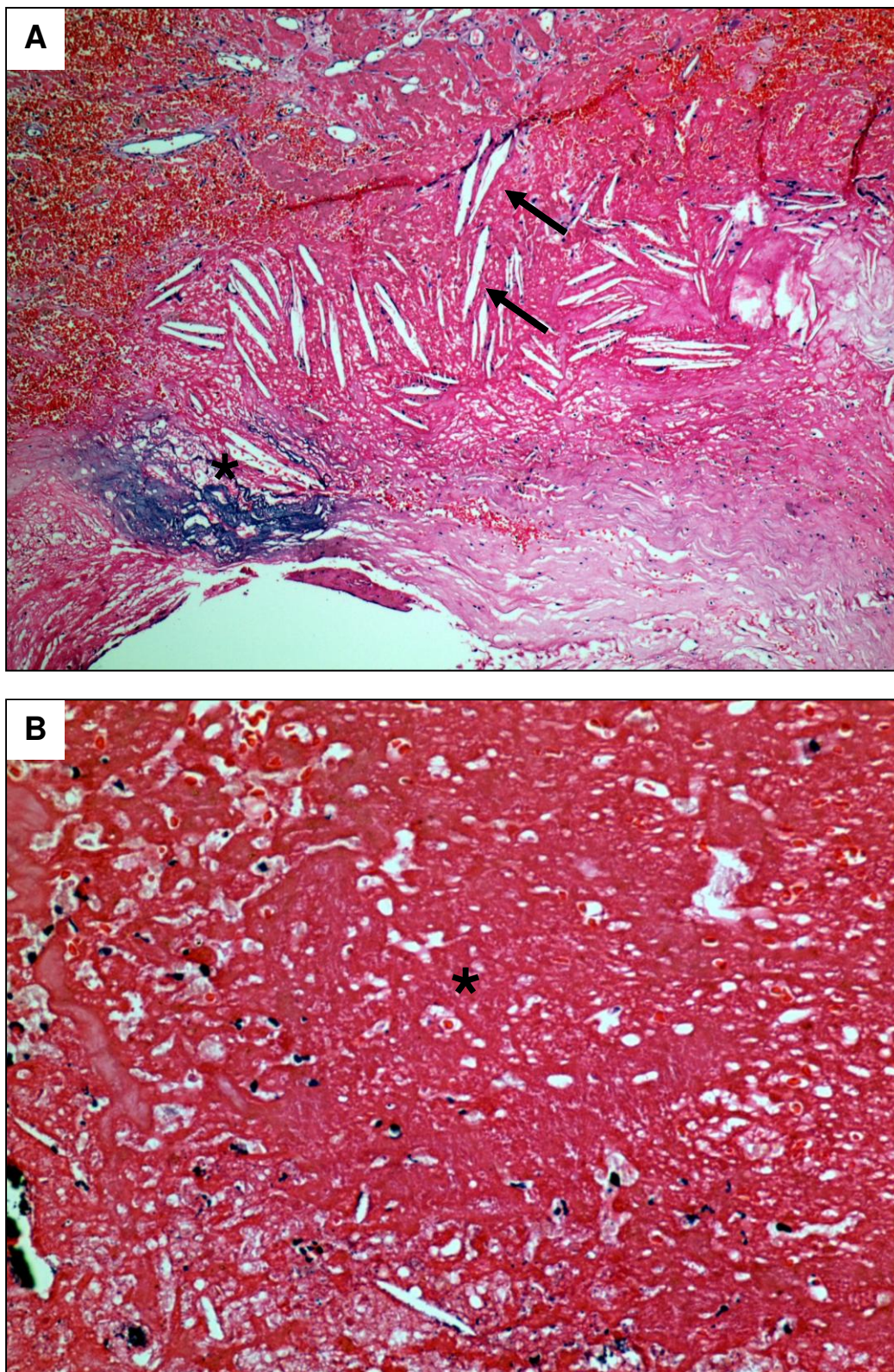


Figura 19 – A- Placa aterosclerótica instável. Observar os numerosos cristais de colesterol (seta) e foco de calcificação (asterisco) (HEX100), **B-** Nesta área a placa apresenta abundante material necrótico.

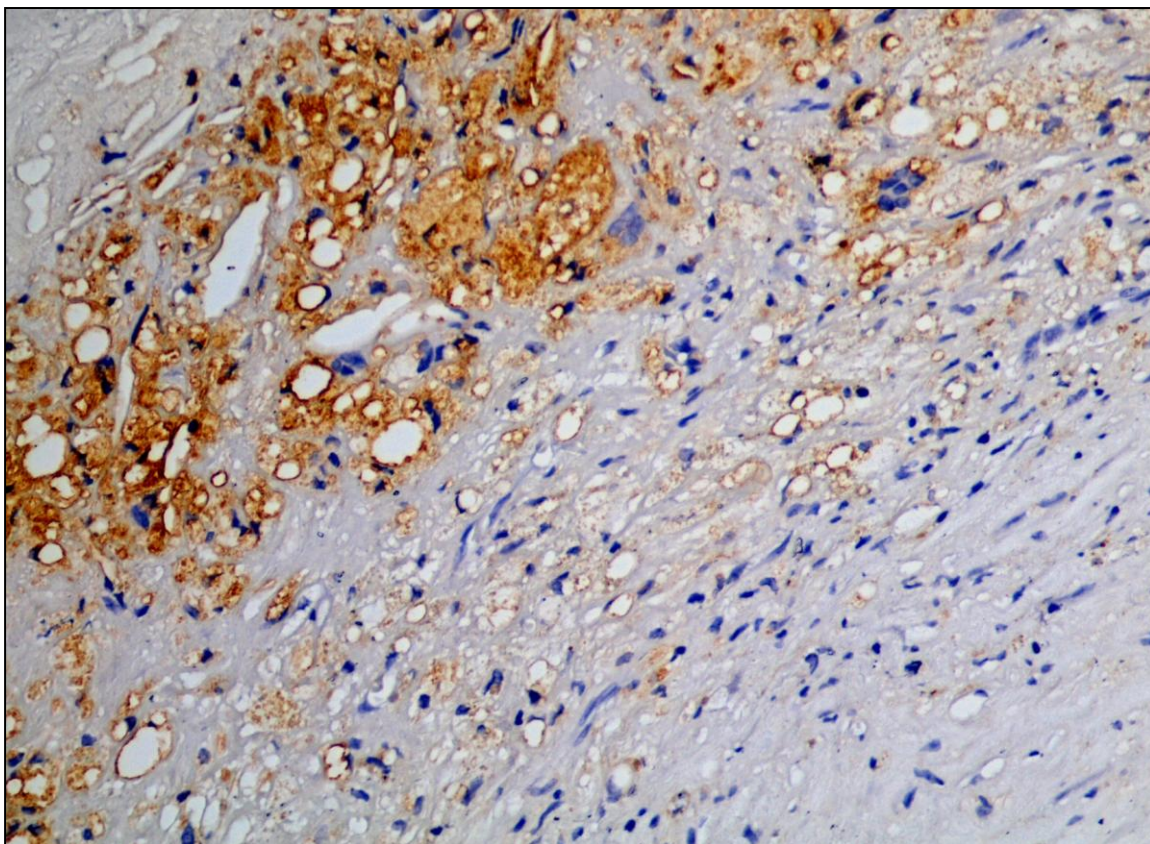


Figura 20 – Placa aterosclerótica instável. Notar infiltrado inflamatório contendo numerosos macrófagos CD68⁺ (cor marrom). Vários macrófagos mostram citoplasma amplo e espumoso (à esquerda) (imunoistoquímica, anticorpo anti-CD68 x 400).

Citocinas e outros mediadores detectados por imunoistoquímica também foram semi-quantificados conforme descrito acima e relacionados com o fenótipo das lesões. Como podemos observar na tabela XI, as lesões instáveis apresentaram maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-23 e IL-18. Além disso, essas mesmas lesões instáveis apresentaram grande quantidade de marcações positivas para as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β .

Tabela VIII – Análise semi-quantitativa das reações imunoistoquímicas

Placa	IL-17	IL-23	IL-1 β	IL-18	IFN- γ	ICAM-1	IL-10	TGF- β	Fenótipo
1	-	-	+	-	-	+	-	-	Estável
2	-	+	+	+	-	+	+	+	Estável
3	-	+	+++	++	-	+++	++	++	Instável
4	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	++	Instável
5	-	-	-	-	-	+	-	-	Estável
6	-	++	+	-	-	+++	+++	+++	Instável
7	-	++	++	++	-	+++	-	+++	Instável
8	-	+++	++	+	-	+++	+++	-	Instável
9	-	+	+	+	-	+	++	++	Estável
10	-	++	++	+	-	++	++	-	Intermediária
11	-	-	-	-	-	+	-	-	Estável
12	-	-	-	+	-	+	-	+	Estável
13	-	+	+	+	-	+	-	+	Estável
14	-	++	++	+	-	+++	-	+	Instável

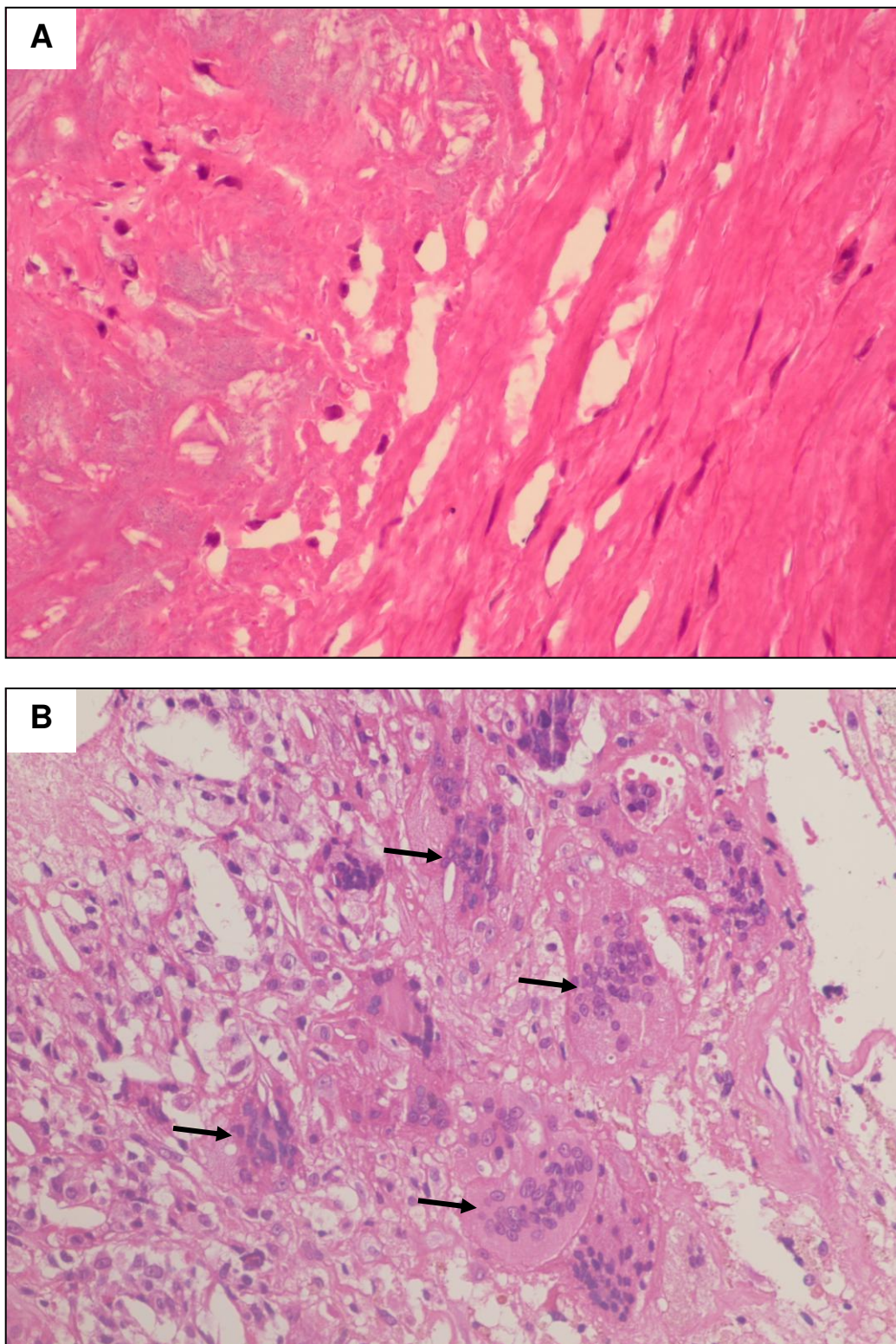


Figura 21 – A- Placa aterosclerótica estável: notar a pequena quantidade de cristais de colesterol e discreto infiltrado inflamatório. **B-** Placa instável: notar o intenso infiltrado celular, com várias células mononucleadas (seta) e freqüentes cristais de colesterol (HE x 400).

Na tentativa de confirmar os resultados obtidos na análise da expressão gênica realizamos a pesquisa das proteínas correspondentes por imunohistoquímica. Não foram analisados todos os marcadores devido a indisponibilidade de anticorpos específicos no mercado.

A marcação para IL-17 e IFN- γ (dado não mostrado) foi negativa em todas as amostras analisadas. Como pode ser visualizado na fig. 22, representativa de lesão aterosclerótica instável, o intenso infiltrado de macrófagos e linfócitos, não apresenta qualquer marcação para IL-17.

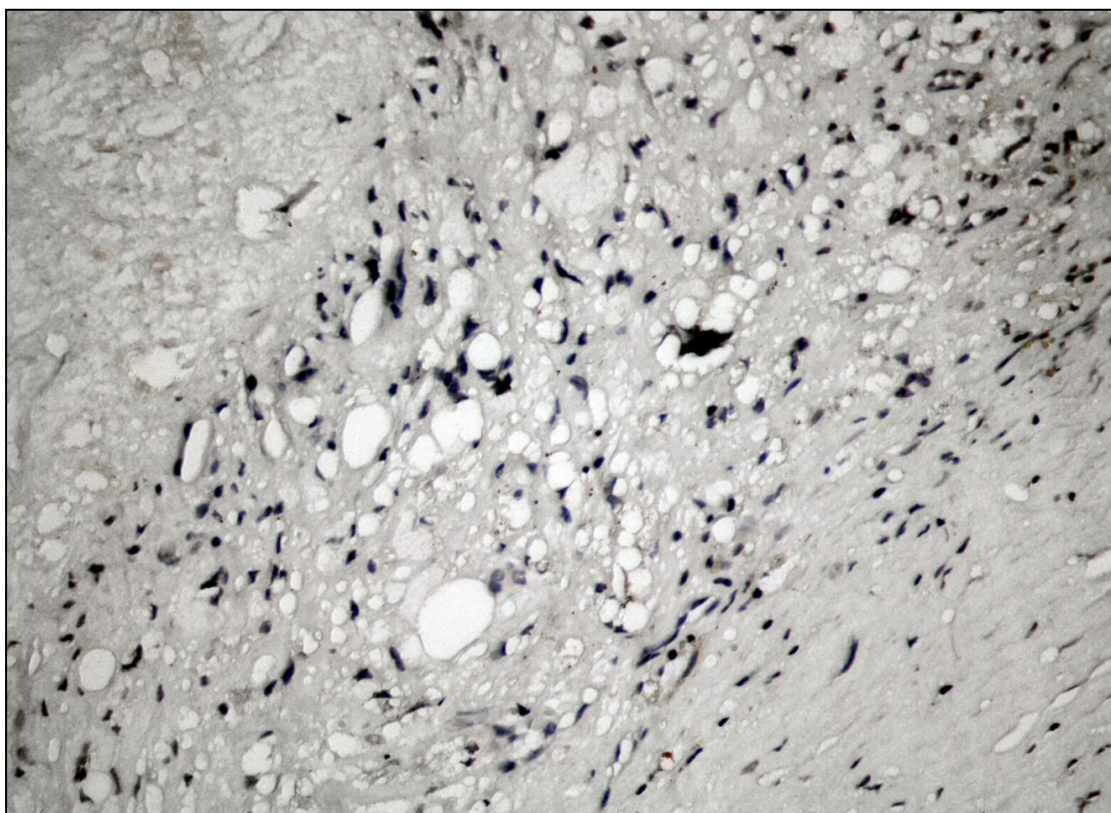


Figura 22 – Placa aterosclerótica com marcação negativa para IL-17. Notar intenso infiltrado inflamatório composto de células espumosas e linfócitos. (imunohistoquímica, anticorpo anti-IL-17 x 400).

Por outro lado, outros mediadores relacionados à resposta T_H17 foram detectados nas placas por imunohistoquímica como a IL-23 detectada principalmente em macrófagos e células gigantes (fig. 23).

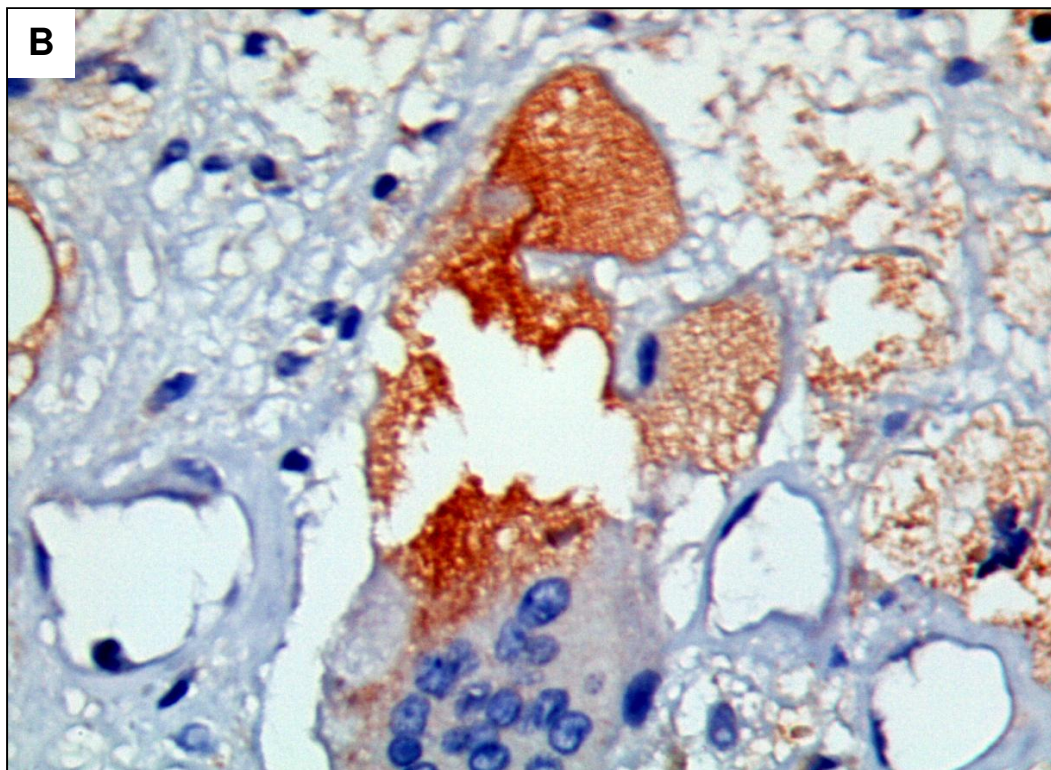
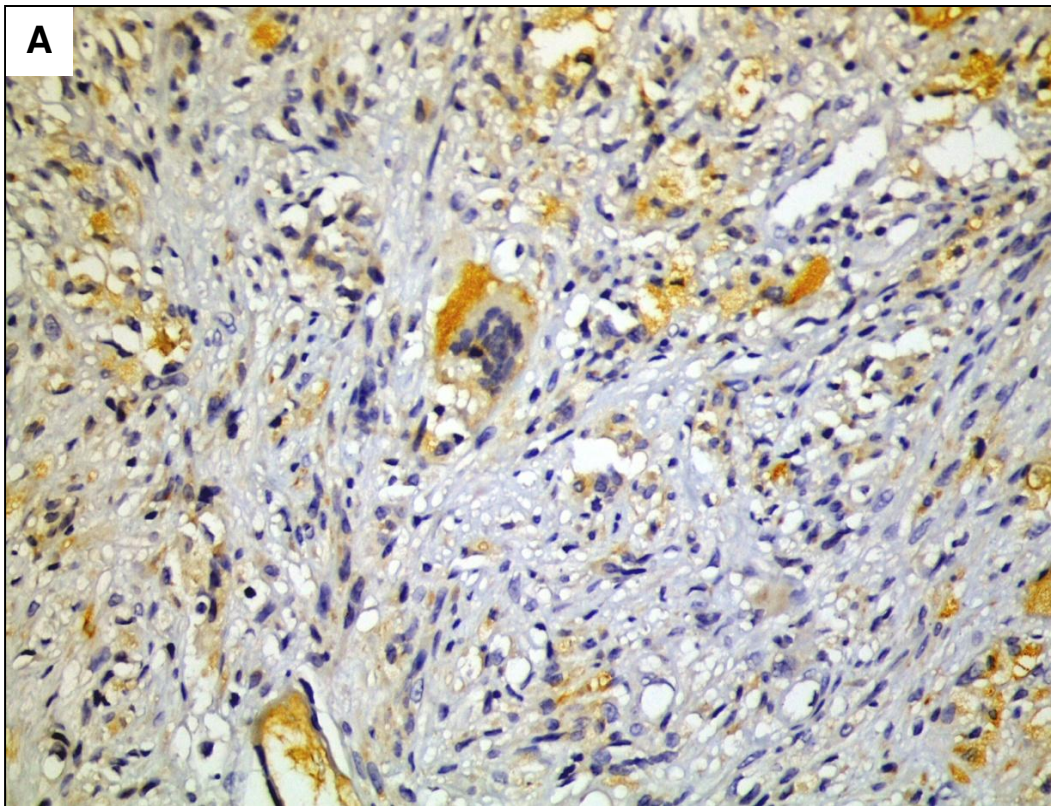


Figura 23 – Placa aterosclerótica corada com anti-IL-23. **A** - Notar os numerosos macrófagos e células gigantes positivas para IL-23 (cor marrom). (400X) **B** - detalhe de célula gigante positiva para IL-23 (1000X). (imunohistoquímica, anticorpo anti-IL-23).

Citocinas inflamatórias como a IL-1 β (fig. 24) e a IL-18 (fig. 25) também foram observadas nas placas por imunoistoquímica.

A detecção de IL-1 β (fig. 24) se deu principalmente em macrófagos e células espumosas, que apresentaram marcação citoplasmática intensa.

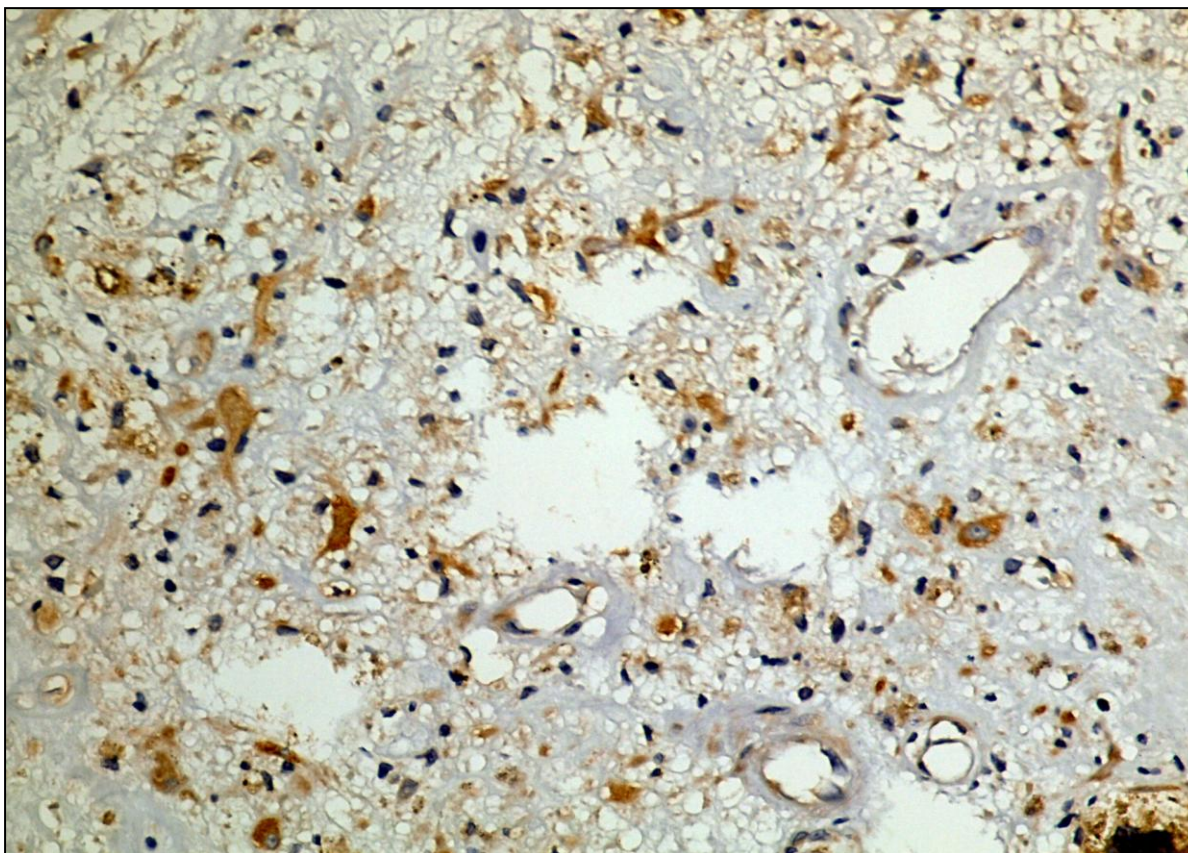


Figura 24 – Placa aterosclerótica corada com anti-IL-1 β . **A** - Notar os numerosos macrófagos e células gigantes positivas para IL-1 β (cor marrom). (400X). (imunoistoquímica, anticorpo anti-IL-1 β)

A participação da IL-18 na resposta inflamatória que caracteriza a aterosclerose foi comprovada em diferentes trabalhos experimentais e em humanos (141,142). Seu efeito está relacionado à estimulação da produção de outras citocinas inflamatórias como IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-8 e a expressão de moléculas de adesão, como a ICAM-1. Nas placas analisadas observamos expressão de IL-18 em macrófagos e células espumosas em contato com cristais de colesterol (fig. 26).

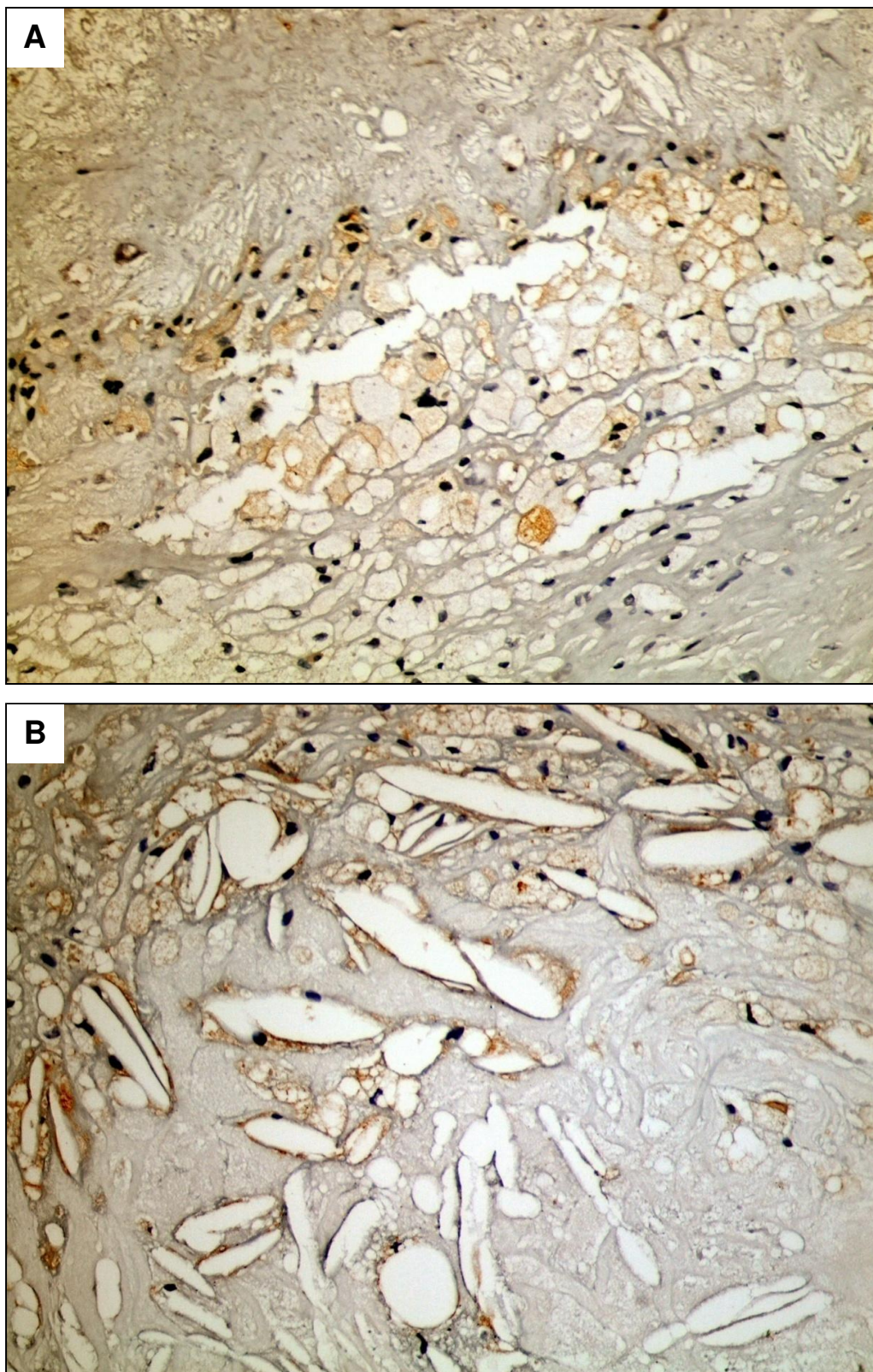


Figura 25 – Placa aterosclerótica corada com anti-IL-18. **A** - Marcação positiva em áreas ricas em macrófagos e células espumosas (400X) **(B)** Marcação intensa em macrófagos que estão em íntima associação com cristais de colesterol. (1000x) (imunohistoquímica, anticorpo anti- IL-18).

O ateroma é caracterizado pela presença de infiltrado composto de diferentes células, com predominância de macrófagos e linfócitos T. Essas células migram para a íntima arterial na dependência da expressão de moléculas de adesão pelo endotélio. Nossos resultados mostraram marcação para ICAM-1 pouco intensa nas lesões ateroscleróticas classificadas como estáveis (tabela VIII). Diferentemente, as placas instáveis, exibiram marcação exuberante, principalmente ao redor de células espumosas e células gigantes (fig. 26).

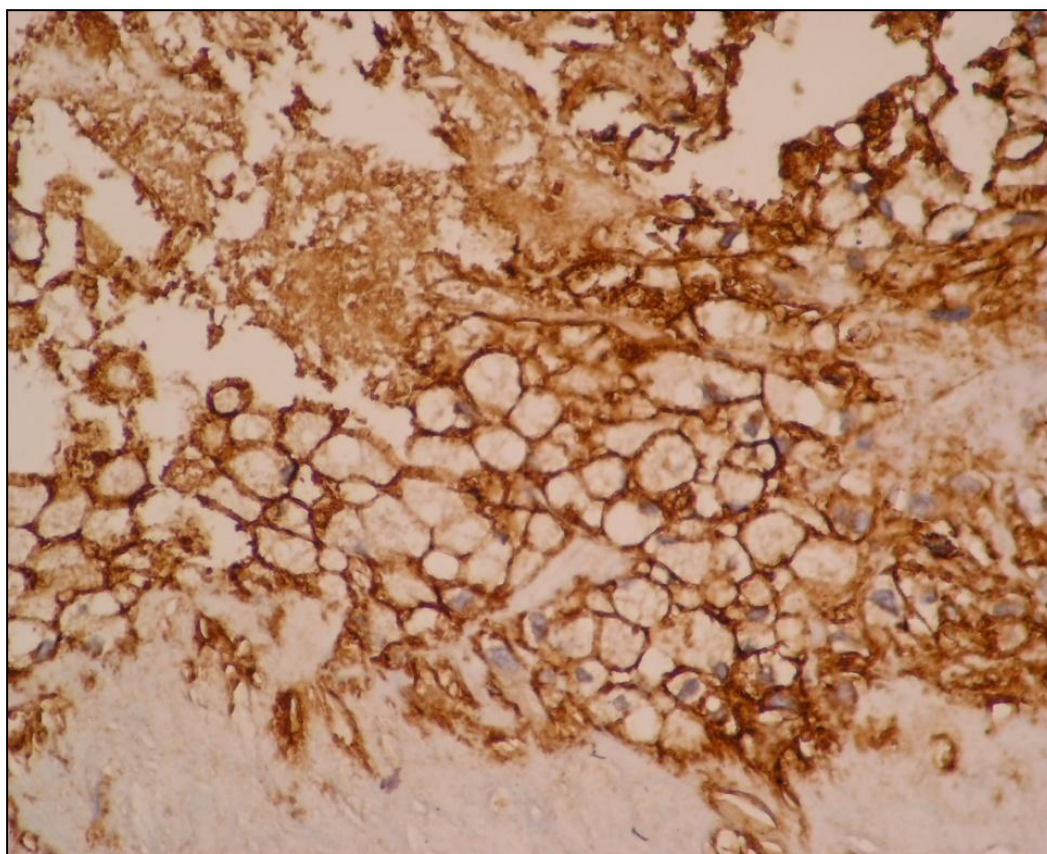


Figura 26 – Placa aterosclerótica instável com intensa marcação para ICAM-1 ao redor de células espumosas e células gigantes. (imunoistoquímica, anticorpo anti-ICAM-1 x 400).

A resposta anti-inflamatória na lesão foi confirmada pela detecção de TGF- β (fig. 27A) e IL-10 (fig. 27B) principalmente em macrófagos.

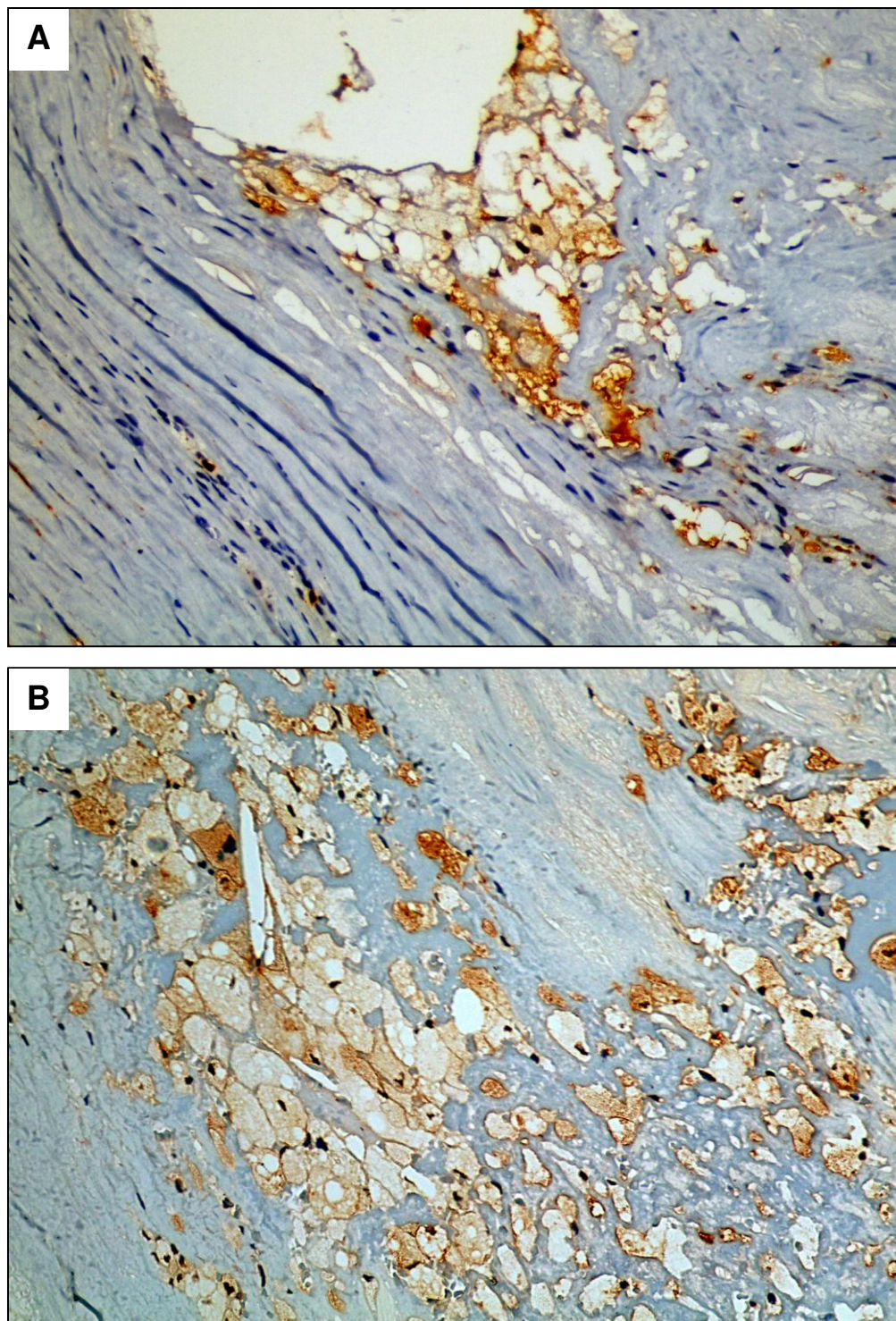


Figura 27 – Placa aterosclerótica corada com **A-** anti-TGF- β : observar os macrófagos positivos (cor marrom) agrupados na parte superior do campo; **B-** anti-IL-10: notar os numerosos macrófagos positivos (cor marrom) de permeio ao infiltrado mononuclear. (imunoistoquímica, anticorpo anti- TGF- β e anti-IL-10, x 400).

Trabalho recente mostrou a presença de granzima B em lesões ateroscleróticas humanas sugerindo um possível papel para esta molécula citotóxica na instabilidade de lesões, provavelmente por promover degradação de matriz extracelular e apoptose de células musculares lisas (143). Entretanto, estudos sobre a atividade citotóxica no ateroma são raros e sempre focados apenas na granzima B. Nossos resultados mostraram a presença de granzima B (fig. 28A), perforina (fig. 28B) e granulicina (fig. 29) em macrófagos e células espumosas, não sendo observado marcações positivas para granzima A (dado não mostrado).

Ao fazer a semi-quantificação das células positivas, verificamos marcações positivas com maior intensidade, em amostras de ateroma que apresentaram fenótipo instável (tabela IX).

Tabela IX – Análise semi-quantitativa da resposta citotóxica

Placa	Perforina	Granzima B	Granulicina	Fenótipo
1	-	-	+	Estável
2	+	+	+	Estável
3	+	++	++	Instável
4	+	++	++	Instável
5	+	+	-	Estável
6	+	+	+	Instável
7	+	++	+	Instável
8	+	+	+	Instável
9	-	-	-	Estável
10	+	+	+	Intermediária
11	-	-	-	Estável
12	-	-	-	Estável
13	-	-	-	Estável
14	-	-	-	Instável

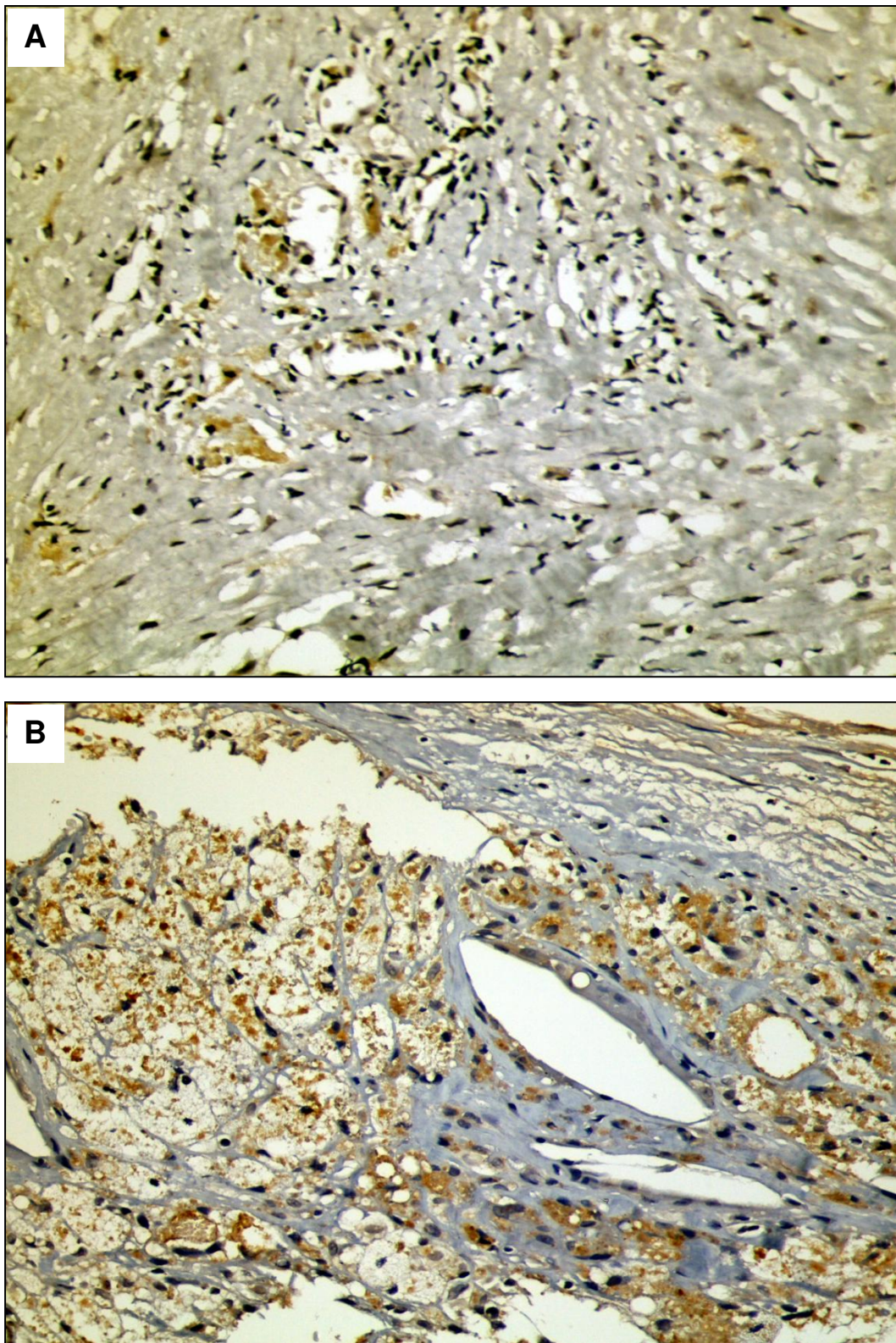


Figura 28 – Placa aterosclerótica corada com **A** - anti-granzima B e **B**- anti-perforina. Marcação positiva em áreas ricas em macrófagos e células espumosas (imunoistoquímica, anticorpo anti-granzima B e anti-perforina x400).

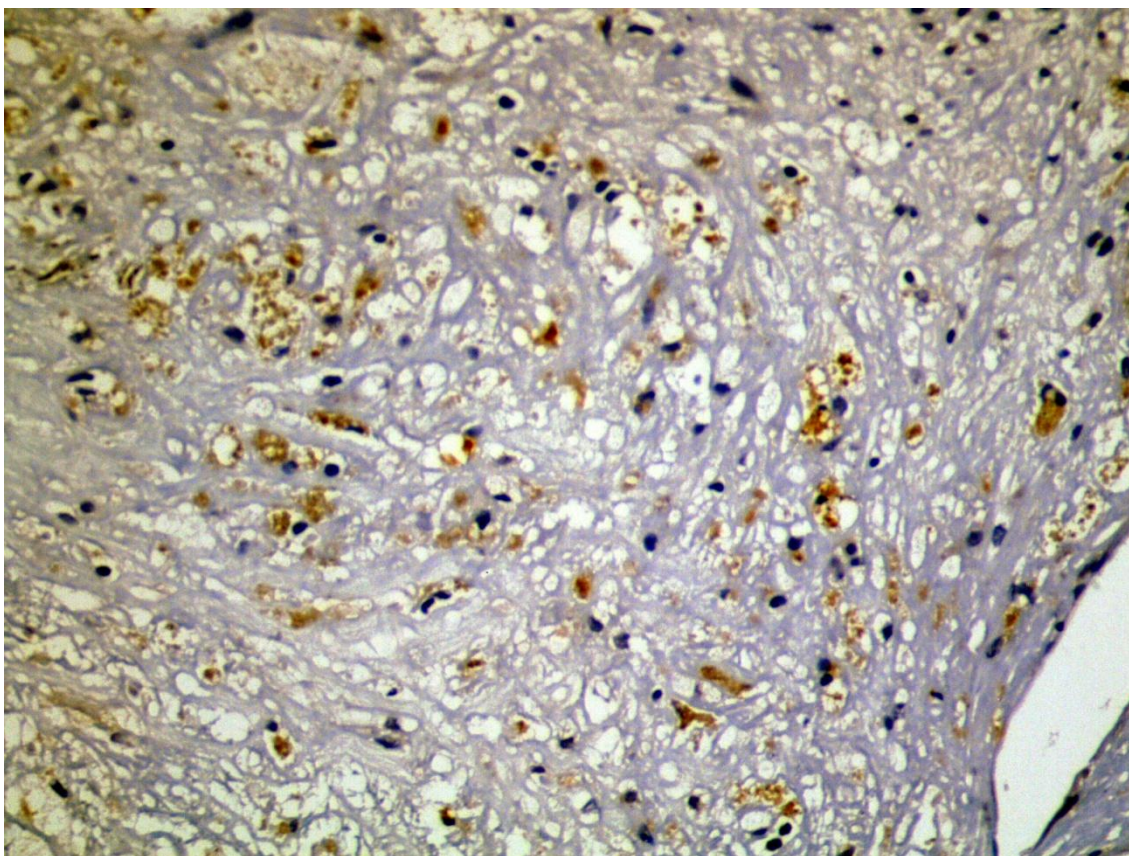


Figura 29 – Placa aterosclerótica corada com anti-granulisina. Marcação positiva em macrófagos e células espumosas (imunoistoquímica, anticorpo anti-granulisina x400)

5. Citometria de fluxo de lesão aterosclerótica humana (n=3)

Com o objetivo de verificar a composição celular e a produção de IL-17 por células da lesão aterosclerótica, fragmentos de ateroma foram submetidos a um processo de digestão enzimática com posterior recuperação e cultura das células obtidas.

5.1. Estratégia de análise dos resultados obtidos pela citometria de fluxo

Após a marcação e leitura das amostras em citômetro de fluxo, observamos a presença de grande quantidade de tecido e células mortas (fig. 30), o que pode comprometer a análise por dificultar a determinação do *gate* e identificação das células positivas para cada marcador. Para contornar esse problema, a análise foi feita utilizando-se *back gates* (fig. 31). Dessa maneira foi possível determinar com maior precisão a localização dos diferentes tipos celulares e então proceder à análise (fig. 31).

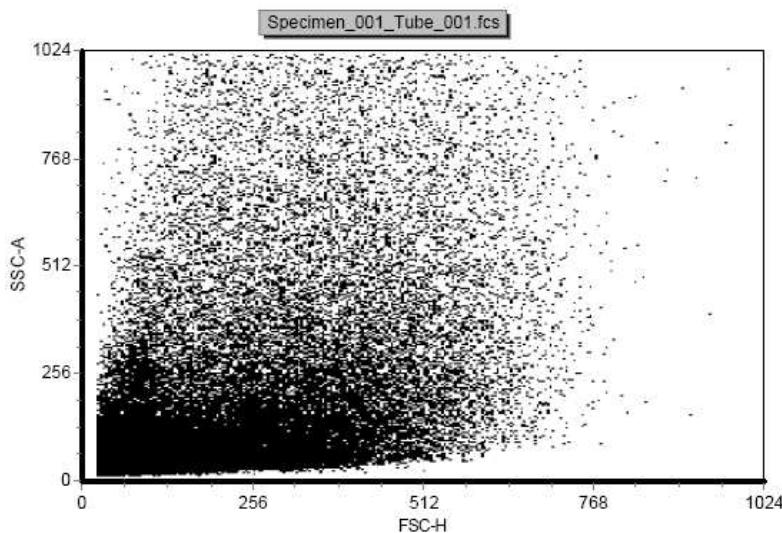


Figura 30: Dot Plot representativo da reação de citometria de fluxo de lesão aterosclerótica humana. A amostra de lesão foi dissociada com o uso de enzimas (Blendzyme – Roche) com posterior passagem por aparelho de desagregação de tecido (Medimachine – BD) e submetidas a cultura por 72 horas na presença de 10 µg/mL de PHA. Gráfico mostrando a distribuição das células por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC).

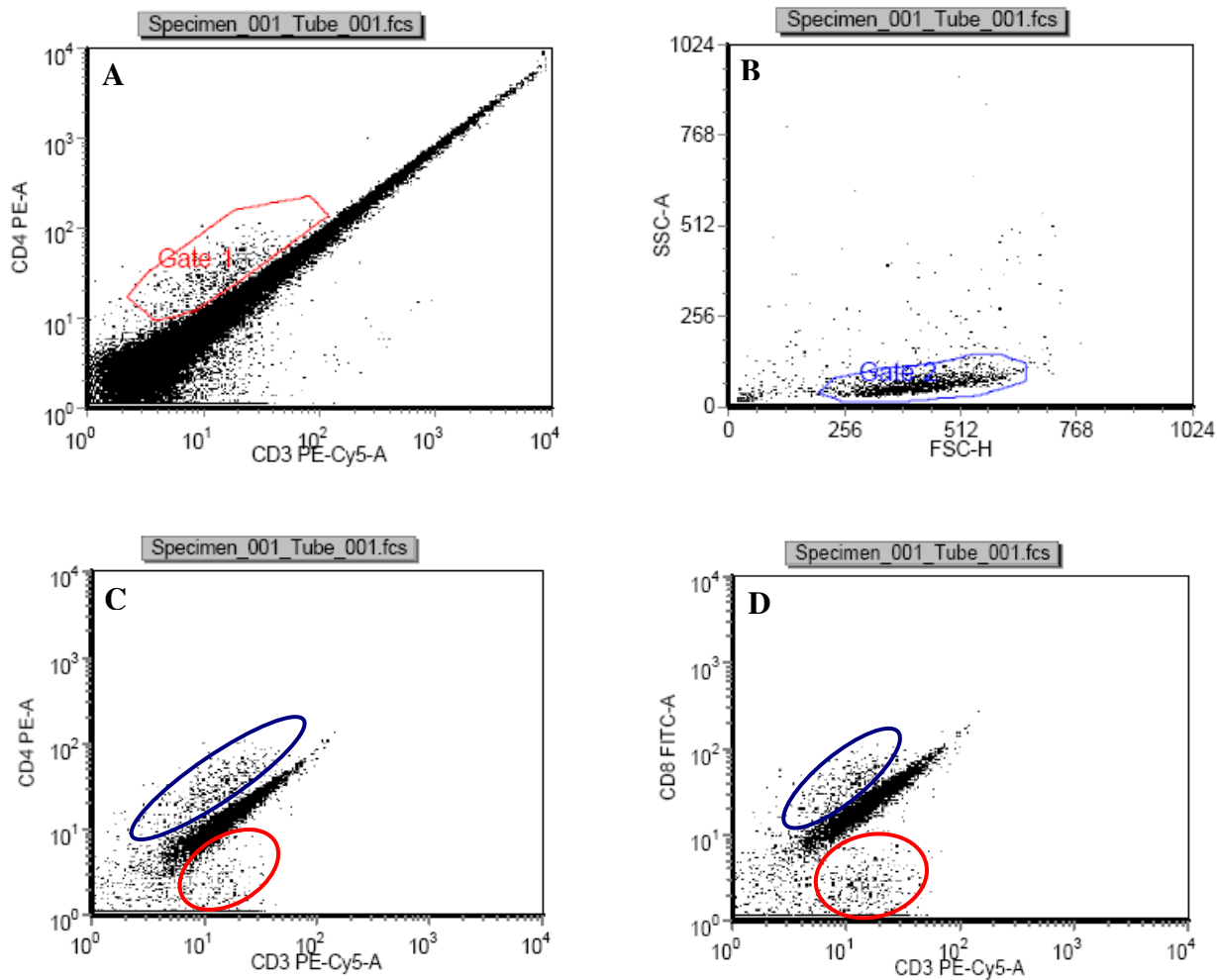


Figura 31: Análise de citometria de fluxo de preparação placa de aterosclerose utilizando *back gates*. **(A)** Inicialmente foi feito um dot plot mostrando as células CD3⁺ e CD4⁺ estabelecendo o *gate 1* no local dessas células. Após o estabelecimento do *gate* no local indicativo de linfócitos T, foi feito um dot plot **(B)** analisando as células que estão no *gate 1* por tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) formando o *gate 2*, que indica o local no qual os linfócitos T estão presentes. Estabelecido o *gate 2*, foram feitos outros dot plots **(C, D)** separando as populações pelas marcações positivas. Podemos observar que nos locais delimitados pelo círculo vermelho temos as células marcadas somente com um fluorocromo (CD3⁺) e os locais delimitados com círculo azul, as células duplo-positivas (T CD3⁺CD4⁺ ou T CD3⁺CD8⁺).

A análise da preparação celular da placa permitiu a detecção de células TCD4⁺, TCD8⁺, linfócitos T ativados (CD69⁺) e células NK (CD56), além de uma pequena porcentagem de células MHC classe II positivas (figura 32). Entretanto não foram detectados macrófagos (CD68), linfócitos B (CD19), nem células endoteliais (CD62E). A frequência de células positivas para IFN- γ foi 5% e para IL-17, 1% (dados não mostrados).

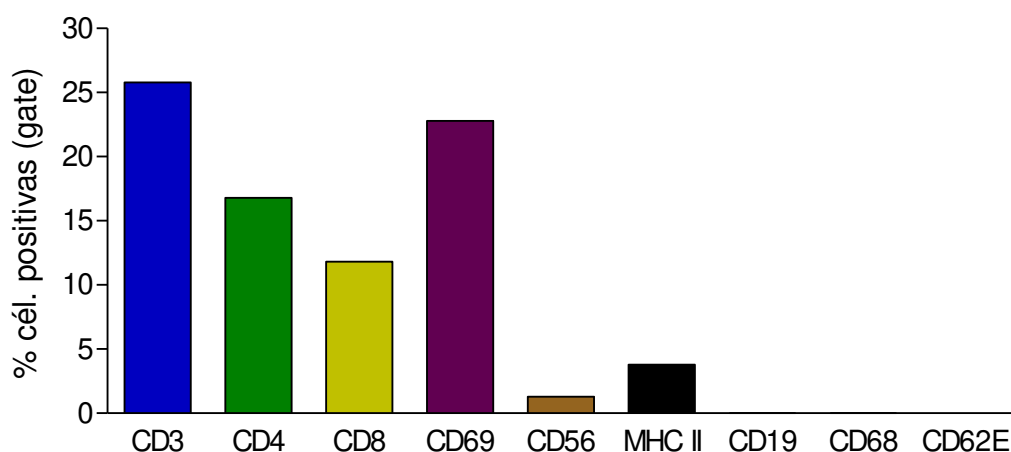


Figura 32 – Figura representativa de 3 experimentos de avaliação da frequência de células positivas para os marcadores indicados em suspensão celular de placa de ateroma. A amostra de lesão aterosclerótica foi dissociada com o uso de enzimas (Blendzyme – Roche) com posterior passagem por aparelho de desagregação de tecido (Medimachine – BD) e submetidas a cultura por 72 horas na presença de 10 μ g/mL de PHA. A porcentagem refere-se células positivas no *gate* de linfócitos.

6. Estimulação de placas ateroscleróticas em cultura e quantificação de citocinas (n = 6)

Tendo em vista a ausência de IL-17 (RNAm e proteína) nas amostras avaliadas *ex vivo*, a produção de ambos foi determinada após a estimulação *in vitro* com diferentes estímulos, conforme protocolo adaptado de Niessner et al (144). Neste experimento, o tecido contendo a lesão foi seccionado em pequenos fragmentos com o auxílio de uma lâmina e cultivado em placas de 24 poços por 24 horas. Foram analisadas 6 amostras de placas ateroscleróticas.

Os resultados mostraram que a estimulação com LPS promoveu aumento da expressão do RNAm para IL-6 e CCL20 e da expressão do RNAm e produção da proteína IL-1 β e IL-10 (fig 33, 35). A expressão de MMP9 (RNAm e proteína) foi semelhante em resposta a todos os estímulos utilizados (figs. 34 e 35).

Em relação a IL-17 verificou-se que a estimulação com citocinas (IL-23 e IL-2), mitógeno (PHA) e via receptor de imunidade inata (LPS) não promoveram a produção de níveis detectáveis da citocina. Entretanto, quando simulamos a estimulação via TCR (anti-CD3+anti-CD28), observamos aumento na expressão do RNAm e concentrações detectáveis de IL-17 nos sobrenadantes de cultura analisados (figs. 33 e 35).

Finalmente observamos que apenas a estimulação com LPS promoveu aumento na expressão do RNAm para IL-23 (fig. 33).

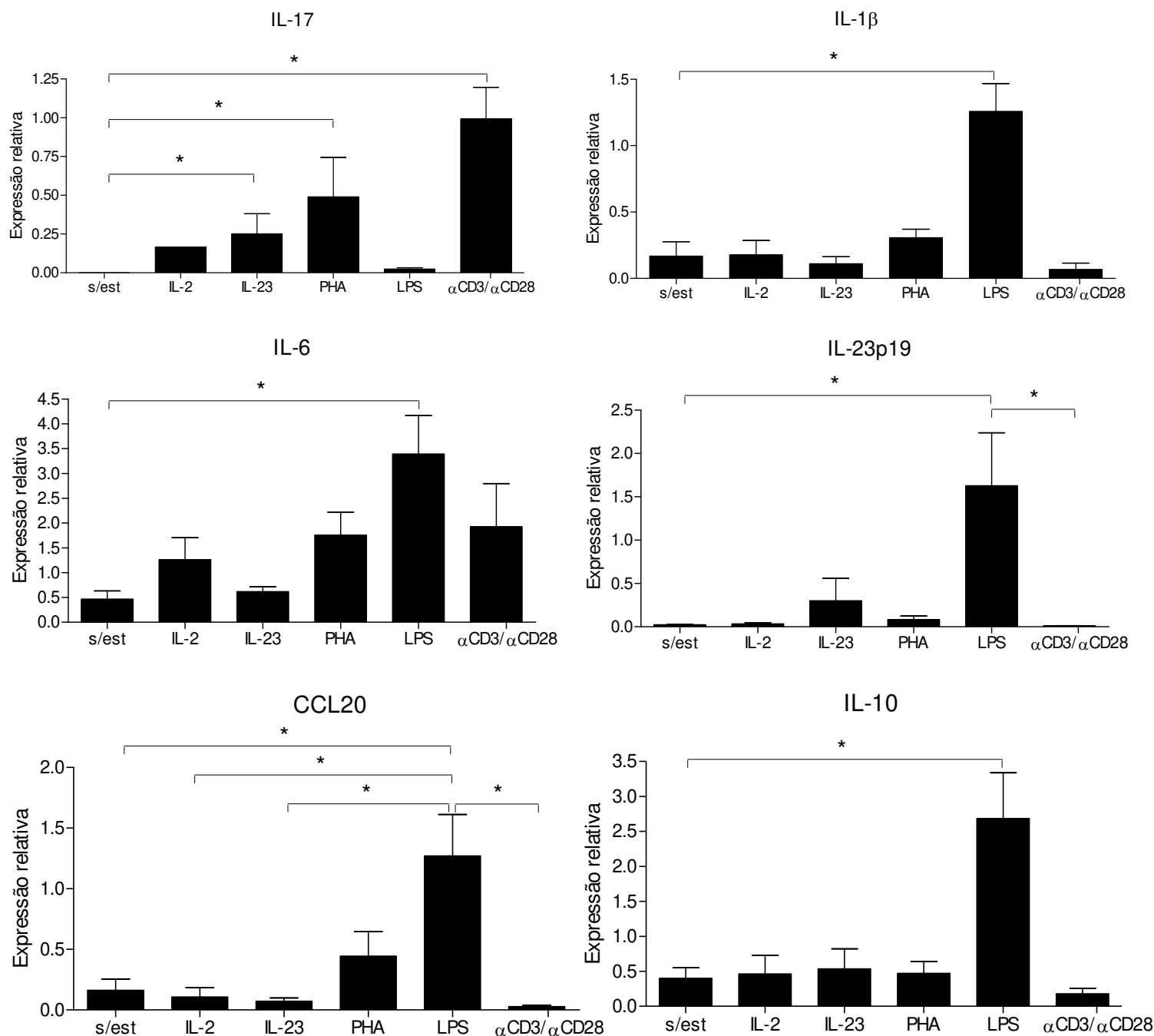


Figura 33 – Expressão relativa do RNAm dos mediadores indicados por amostras de ateroma submetidas à estimulação em cultura. As amostras foram incubadas por 24 horas na presença ou ausência dos seguintes estímulos: 10 µg/mL de LPS; 10 µg/mL de PHA; 50 ng/mL de IL-23; 5 ng/mL de IL-2 ou 1 µg/mL de anti-CD3 + 1 µg/mL de anti-CD28. * $p < 0,05$. Wilcoxon.

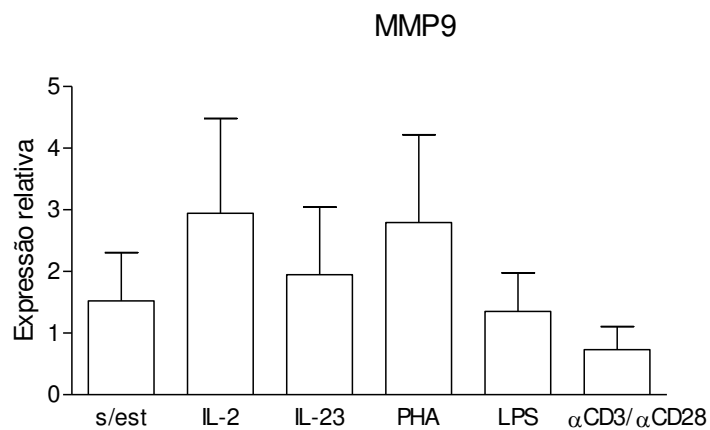


Figura 34 – Expressão relativa do RNAm para MMP9 em amostras de ateroma submetidas à estimulação em cultura. As amostras foram incubadas por 24 horas na presença ou ausência dos seguintes estímulos: 10 μ g/mL de LPS; 10 μ g/mL de PHA; 50 ng/mL de IL-23; 5 ng/mL de IL-2 ou 1 μ g/mL de anti-CD3 + 1 μ g/mL de anti-CD28. * $p < 0,05$. Wilcoxon.

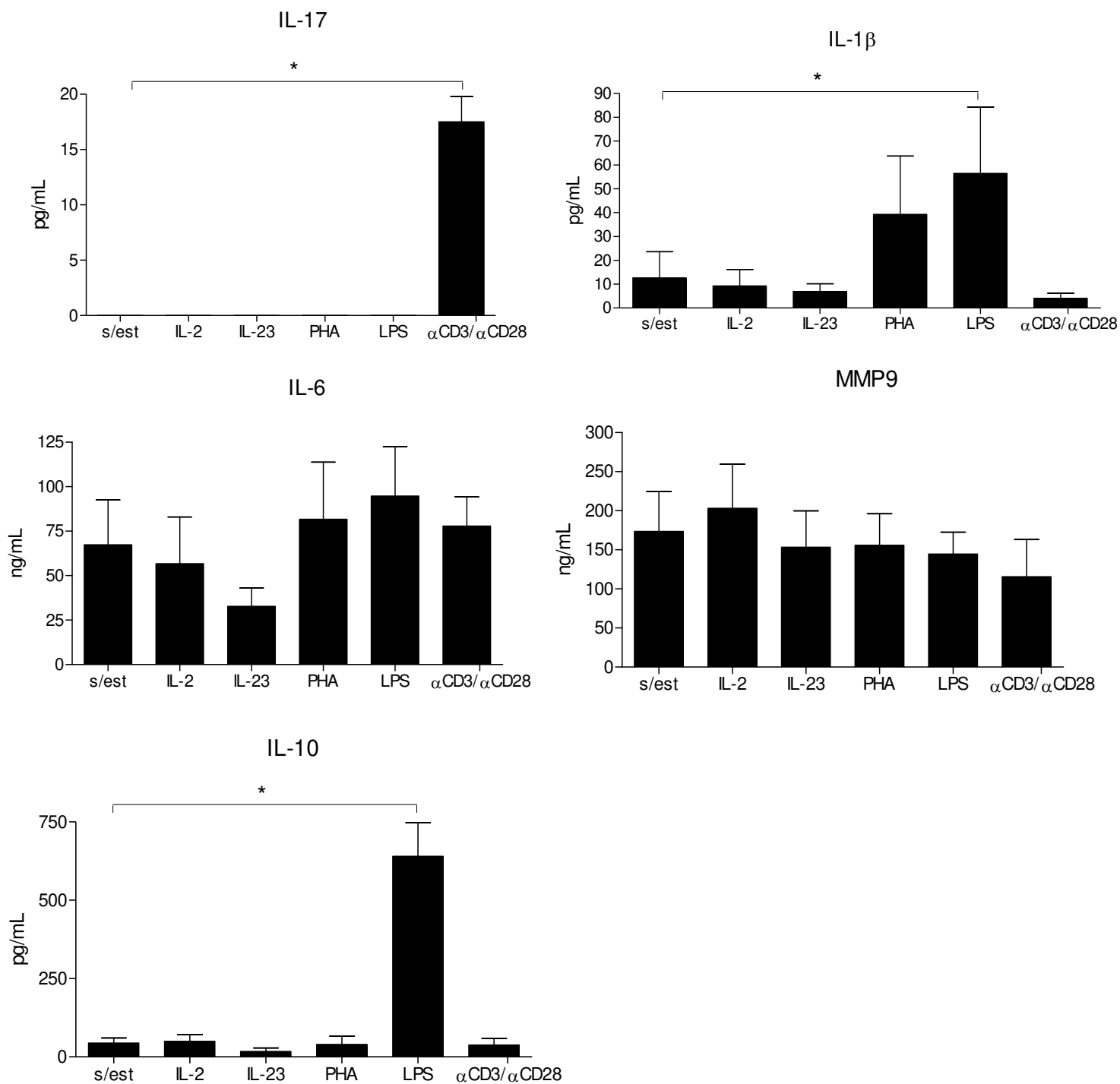
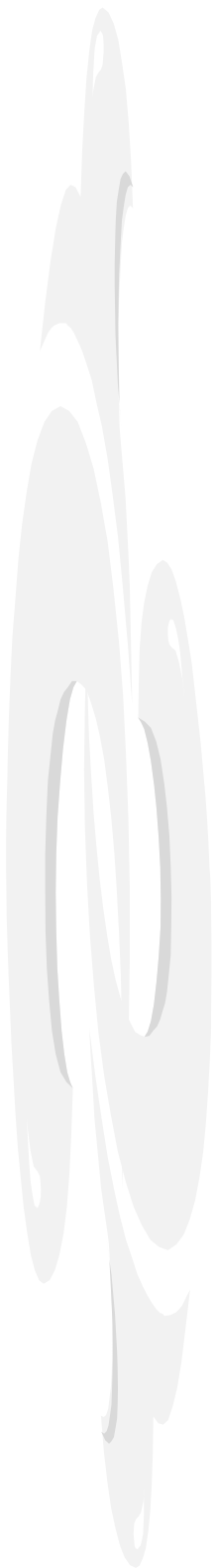


Figura 35 – Concentrações de citocinas em amostras de ateroma submetidas à estimulação em cultura. As amostras foram incubadas por 24 horas na presença ou ausência dos seguintes estímulos: 10 µg/mL de LPS; 10 µg/mL de PHA; 50 ng/mL de IL-23; 5 ng/mL de IL-2 ou 1 µg/mL de anti-CD3 + 1 µg/mL de anti-CD28. * p<0,05. Wilcoxon.



Discussão

Várias evidências fundamentam a idéia que a aterosclerose resulta da inflamação crônica da íntima das artérias, causada por uma reação imunológica contra autoantígenos (50). Este processo é regulado por uma intrincada rede de citocinas e quimiocinas, que vem sendo exaustivamente estudadas nos últimos anos, com vistas a novas terapias para o controle da doença.

A IL-17, citocina produzida por uma subpopulação de linfócitos denominada T_H17 , participa da ativação inicial do sistema imunológico e desempenha importante papel na interface entre a resposta inata e adaptativa. O fato da IL-17 estar envolvida na patogênese de doenças inflamatórias de caráter crônico, como as doenças autoimunes e de induzir a produção de elevadas concentrações de IL- 1β , TNF- α , TGF- β , CCL2 e MMPs, mediadores amplamente encontrados na placa, a tornam um alvo interessante a ser investigado na aterosclerose.

Nosso trabalho teve como objetivo principal estudar os componentes da resposta T_H17 na aterosclerose. Inicialmente, avaliamos as concentrações plasmáticas desta citocina nos pacientes com estenose de carótida, submetidos à endarterectomia. Grande parte destes pacientes tinha em seu histórico AVC prévio e doença arterial periférica. A maioria também fazia uso de aspirina e estatina, medicamentos com comprovada ação anti-inflamatória. A dosagem plasmática revelou níveis indetectáveis de IL-17 em todas as amostras.

Cheng e col (145) verificaram que pacientes com infarto agudo do miocárdio e pacientes com angina instável possuem um número maior de linfócitos $CD4^+$ produtores de IL-17 no sangue circulante, quando comparados com controles saudáveis. Na mesma linha, foi observado que mulheres obesas, que têm maior propensão ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, apresentam concentrações séricas mais elevadas de IL-17, quando comparadas a mulheres não obesas (146). Entretanto, em concordância com nossos resultados, Patel e col (147) constataram não haver diferença entre as concentrações plasmáticas de IL-17 de pacientes com angina instável, infarto agudo do miocárdio e indivíduos controles. Neste trabalho os autores chamam a atenção para a baixa sensibilidade do kit empregado para a detecção de IL-17, que foi o mesmo

utilizado em nosso estudo (15,6 pg/mL), o que explicaria os resultados divergentes.

A detecção sistêmica de mediadores relacionados à resposta inflamatória permitiu avanços substanciais na compreensão do processo aterosclerótico (148). Entretanto, a interpretação dos resultados sempre ficou limitada ao fato de alterações locais muitas vezes não terem repercussão sistêmica, devido ao comprometimento de pequenas áreas da vasculatura, à vida média curta de alguns mediadores, à presença de bloqueadores naturais e métodos laboratoriais de detecção inadequados ou pouco sensíveis.

A utilização de segmento de carótida de pacientes submetidos à endarterectomia para avaliar a doença aterosclerótica sistêmica é bastante comum (149). Pacientes com estenose de carótida são mais propensos a desenvolver doença aterosclerótica crônica em outros locais, comparados a população saudável. Além disso, lesões sintomáticas de carótidas apresentam características fenotípicas semelhantes às de placas de artéria coronária, como grande infiltrado de macrófagos e presença de um centro necrótico denso (150), o que valida sua utilização para estudar a patogênese da aterosclerose. Outro ponto a ser destacado é que a análise da placa permite avaliar localmente o infiltrado celular e os mediadores inflamatórios, além da associação entre eles.

Na tentativa de verificar a resposta T_H17 *in situ*, foram analisadas placas ateroscleróticas de pacientes submetidos à endarterectomia carotídea, classificados como sintomáticos (17%) e assintomáticos (83%), tendo por base critérios clínicos descritos na seção Casuística e Métodos. Não houve diferença entre os grupos (sintomáticos e assintomáticos) em relação a nenhum parâmetro analisado no trabalho (expressão de RNAm e proteína). Este resultado diverge da maior parte dos trabalhos da literatura, que descrevem maior produção de mediadores inflamatórios nas lesões de pacientes sintomáticos (150), provavelmente pelo predomínio de pacientes assintomáticos em nosso grupo de estudo.

As amostras coletadas foram classificadas em instáveis ou estáveis, baseado nos achados histológicos como o número de macrófagos no infiltrado

celular, a presença de necrose, cristais de colesterol e calcificação. As amostras consideradas instáveis apresentaram infiltrado inflamatório exuberante constituído basicamente por macrófagos e células espumosas (identificados pela morfologia e pela marcação com anti-CD68) e grande quantidade de cristais de colesterol e necrose, que indicam lesão mais avançada. Em algumas placas notou-se a presença de células gigantes, formadas a partir da fusão do citoplasma de macrófagos ativados que geralmente circundam o antígeno presente no tecido. As células gigantes são comuns em granulomas e a sua presença na lesão indica um estado de inflamação crônica.

A análise da expressão gênica revelou baixas concentrações relativas do RNAm para IL-17 em poucas amostras. Por outro lado observamos expressão elevada do RNAm de mediadores relacionados à resposta T_H17 como o receptor para IL-17 (IL-17R), IL-23, IL-22, CCL20 (quimiocina envolvida no recrutamento de células T_H17), dos receptores CCR4 e CCR6 (receptor da quimiocina CCL20), além do fator de transcrição RorC. Comparando-se às artérias controle, a expressão do RNAm para CCR4, RorC e IL-23p19 foi maior nas amostras de ateroma.

A IL-23 é uma citocina heterodimérica da família da IL-12, composta de duas subunidades, a p40 (compartilhada com a IL-12) e a p19 (131). Um ponto muito importante na biologia das células T_H17 é a dependência da IL-23 para a sua sobrevivência nos tecidos podendo ser utilizada como evidência indireta da atividade dessas células (92). Esta citocina sinaliza via receptor específico, composto pela cadeia IL-12R β 1 em conjunto com a cadeia IL-23R (93).

A análise imunoistoquímica não mostrou células positivas para IL-17 em nenhuma das amostras. Entretanto, a IL-23 foi detectada em células espumosas e macrófagos, principalmente nas lesões consideradas instáveis, o que pode ser considerado um indício da presença da resposta T_H17 . Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro relato da detecção da proteína IL-23 em amostras de ateroma humano.

Linfócitos T_H17^+ e células IL-23⁺ foram detectados em lesões crônicas de pacientes com doença periodontal, condição fortemente associada ao desenvolvimento de doença aterosclerótica (151). Publicação recente descreveu a presença de uma população de linfócitos $CD4^+$ IL-17⁺ e $IFN-\gamma^+$ em lesões ateroscleróticas de coronárias humanas (109). IL-17 A e F também foram detectadas em neutrófilos e mastócitos presentes na lesão (108).

Os trabalhos que detectaram células IL-17⁺ em lesões ateroscleróticas mostraram sua localização nas camadas média e adventícia do vaso (108,152). Este é um ponto importante a ser salientado, pois devido a técnica cirúrgica empregada no procedimento de endarterectomia carotídea, as amostras analisadas em nosso estudo continham apenas a camada íntima. Poucas apresentavam resquícios da camada média, com pequeno número de células musculares lisas. Soma-se a isso o fato da maioria dos pacientes estar em uso de estatina (78%), que além da função de reduzir o colesterol sérico, também tem ação anti-inflamatória, comprovada pela indução da redução da expressão de moléculas de MHC de classe II em células apresentadoras de antígeno e da expressão de moléculas de adesão em linfócitos, como o LFA-1 (153). Fainberg e col (154) verificaram que o tratamento de CMSP com atorvastatina aumenta o número e a capacidade inibitória de células Treg. Outro dado interessante é a capacidade das estatinas em inibir a geração de linfócitos T_H17 . CMSP tratadas com simvastatina produzem níveis elevados de fatores supressores da secreção de citocinas (SOCS) 3 e 7, que modulam negativamente a produção de IL-6 e IL-23, além de inibir o fator de transcrição RorC, essencial para a polarização de linfócitos T_H17 (155). Esses dados poderiam explicar a detecção de apenas uma pequena quantidade de IL-17 em nossas amostras, já que a maioria dos pacientes incluídos no estudo faziam uso de estatina. Em nosso trabalho, outros mediadores inflamatórios, como IL-23, IL-1 β , TNF- α e IL-6, foram detectados nas lesões avaliadas, a despeito do tratamento com estatina. Uma possível explicação para a ausência de IL-17 seria uma maior suscetibilidade desta citocina à ação da droga. Entretanto, como já foi observado os trabalhos que descreveram a presença de IL-17 em lesões ateroscleróticas humanas (108,109,152) mostram sua localização

em células da camada adventícia e muscular, ausentes nas amostras analisadas em nosso estudo. A nosso ver, esta seria uma explicação mais plausível para a ausência da citocina IL-17 nas lesões.

Quando as amostras de lesão foram submetidas à estimulação em cultura, notamos que nem as citocinas IL-2 ou IL-23 ou mitógeno (PHA) foram capazes de promover a produção de IL-17. Entretanto, a estimulação via TCR (anti-CD3 + anti-CD28) induziu a síntese de pequenas concentrações dessa citocina em sobrenadantes de cultura. Eid e col (109) obtiveram resultados similares após estimular fragmentos de lesões ateroscleróticas humanas em cultura, observando produção de IL-17 após estímulo via TCR por 24 horas, com pico após 72 horas. A ativação via TCR para produção de IL-17 *in vitro* sugere a necessidade de constante estimulação antigênica local para manutenção do processo inflamatório na placa. Adicionalmente, suspensões celulares obtidas a partir de fragmentos de placa mostraram aproximadamente 1% de células IL-17 positivas pelo método de citometria de fluxo. Esses resultados indicam a presença de raras células produtoras de IL-17 que necessitam da ativação via TCR e de moléculas coestimulatórias.

A IL-1 β é considerada uma potente citocina pró-inflamatória devido a sua capacidade de induzir outras citocinas, como a IL-6; a expressão de quimiocinas, como a CCL2 e a expressão de moléculas de adesão no endotélio, como o ICAM-1 (156,157). A síntese, o processamento e a liberação da IL-1 β são processos finamente controlados e podem ser dividido em duas etapas. A primeira refere-se ao acúmulo de pró-IL-1 β em vesículas intracelulares, promovida pela ativação de receptores da imunidade inata (ex. TLR4). A segunda etapa envolve a ativação de NLRs que promove o recrutamento e ativação de caspases inflamatórias, como a caspase-1, culminando com a quebra da pró-IL-1 β e a secreção da citocina na sua forma ativa de 17 kDa (158). A IL-1 apresenta um antagonista natural, denominado IL-1RA, com o qual compete pela ligação ao receptor e representa um mecanismo de controle da resposta inflamatória (156).

Em nosso estudo encontramos maior expressão do RNAm para IL-1 β nas amostras de lesões em relação as amostras controle. Somado a isso, verificamos grande quantidade de macrófagos positivos para IL-1 β principalmente nas lesões consideradas instáveis. Similarmente, Olofsson e col (159) detectaram IL-1 β (RNAm e proteína) em lesões ateroscleróticas humanas, e mostraram que a presença do polimorfismo de 86 pares de bases no intron 2 do IL-1R α , foi associado a um menor desenvolvimento de lesões ateroscleróticas coronarianas. Na mesma linha, trabalhos experimentais mostraram que camundongos ApoE^{-/-}IL-1 β ^{-/-} apresentam lesões reduzidas, quando comparadas às desenvolvidas pelo grupo controle (160) e também que animais ApoE^{-/-} IL1RA^{-/-} exibem lesões ateroscleróticas maiores (161).

Assim como para a IL-1 β , verificamos maior expressão do RNAm para TNF- α nas amostras de lesões em relação as amostras controle. O TNF- α é uma citocina pleiotrópica com potente atividade inflamatória, produzida preferencialmente por monócitos e macrófagos (162). O TNF- α estimula células endoteliais a expressar moléculas de adesão, como o ICAM-1 e VCAM-1; promove aumento da produção de quimiocinas como a CCL2 e o aumento da expressão de receptores do tipo *scavenger* em macrófagos, como o SRA (163). Para exercer sua atividade biológica, o TNF- α liga-se ao seu receptor formado por duas cadeias, denominadas p55 (TNF-R1) e p75 (TNF-R2) (164,165). O papel do TNF- α na aterosclerose ainda não está bem esclarecido pois trabalhos experimentais apresentam resultados conflitantes. Camundongos ApoE^{-/-} ou LDLr^{-/-} deficientes em TNF- α , ou no receptor p55 podem apresentar tanto diminuição como aumento da lesão (163,166). Trabalhos em humanos mostram a presença do TNF- α em macrófagos, células musculares lisas e endotélio de lesões ateroscleróticas humanas (167). Além disso, concentrações séricas maiores dessa citocina foram encontradas em pacientes com doença arterial coronariana, quando comparado ao grupo controle (168).

Trabalhos iniciais em modelos experimentais murinos mostraram que a diferenciação das células T_H17 é dependente de IL-6, TGF- β , e IL-21 (88-90,96).

Entretanto, em humanos, as condições ótimas de polarização de linfócitos T *naive* para o subtipo T_H17 foram alvos de muita controvérsia. Alguns pesquisadores relataram a ação conjunta das citocinas IL-23, IL-1 β e IL-6 e do papel inibidor do TGF- β (99,169). No entanto, recentemente Manel e col (170) demonstraram que o TGF- β possui papel central na diferenciação das células T_H17 em associação com a IL-6, IL-23 e IL-1 β . Os autores atribuem a divergência dos resultados à utilização de diferentes fontes de linfócitos T *naive*, sendo que os primeiros trabalhos empregaram linfócitos T CD4⁺ CD45RA⁺ provenientes de sangue periférico. Alegam que, dependendo do modo de purificação, a preparação pode conter contaminantes, como linfócitos de memória, que já tiveram contato com o TGF- β . Outro ponto levantado é a utilização de meio de cultura suplementado com soro humano ou bovino, que poderia conter TGF- β , capaz de promover a geração de linfócitos T regulatórios, com impacto negativo sobre a polarização das células T_H17. Esses dados permitem inferir que a concentração de TGF- β é crítica para a polarização de células T_H17 e que, em excesso é inibitório, mas em concentrações moderadas é essencial.

A pesquisa do RNAm para IL-6 mostrou sua presença em todas as amostras analisadas, inclusive nos controles. Por outro lado, a estimulação em cultura dos fragmentos de ateroma mostrou que o estímulo com LPS (reconhecimento via TLR4) promoveu maior produção do RNAm para IL-1 β e IL-6 quando comparado aos outros estímulos utilizados. A IL-6 pode ser produzida por diversos tipos celulares incluindo macrófagos ativados, células endoteliais e tecido adiposo (171) e a sua produção é induzida pela IL-1 β (162). A IL-6 induz a síntese de quimiocinas, como a CCL2 por macrófagos, a expressão de ICAM-1 em células endoteliais; a proliferação de células musculares lisas e induz a produção de proteínas de fase aguda no fígado, como a PCR (148,171,172). Na aterosclerose, trabalhos clínicos e epidemiológicos investigaram o valor preditivo da dosagem de IL-6 plasmática e mostraram que pacientes com angina instável e concentrações elevadas de IL-6 apresentam maior mortalidade e morbidade (173). Além disso, camundongos ApoE^{-/-} que receberam IL-6 recombinante exibem lesões mais

desenvolvidas (172). Diferentemente, alguns trabalhos têm mostrado que a falta de IL-6 em camundongos ApoE^{-/-} ou LDLr^{-/-} promove aumento das lesões ateroscleróticas (174,175). Estes achados podem ser atribuídos ao papel bifásico da IL-6, que pode atuar tanto como mediador inflamatório ou anti-inflamatório (176-178).

Outra citocina pró-inflamatória com relevante papel na aterosclerose é a IL-18, membro da família da IL-1, inicialmente identificada como fator de indução de IFN- γ (179). É produzida por macrófagos, osteoblastos, condrócitos, queratinócitos e células musculares lisas (66,179-182). Citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α e a ativação de receptores da imunidade inata, como os TLRs, induzem a produção do precursor de 24kD da IL-18 (183), enquanto que a síntese da citocina ativa segue os mesmos passos da IL-1 β , com ativação de NLRs, produção de caspase-1 com clivagem do precursor na forma madura de 18 kD. A IL-18 pode induzir a produção de IFN- γ em linfócitos, incrementada pelo sinergismo com a IL-12 (184). A IL-18 também promove a liberação de diversos mediadores da resposta inflamatória, como as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α ; as quimiocinas CXCL8 e CCL2 e moléculas de adesão como ICAM-1 (185,186). Gerdes et al (66) mostraram a expressão da IL-18 e IL-18R em células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos de lesões ateroscleróticas humanas, bem como a expressão de caspase-1. A determinação de concentrações séricas de IL-18 mostrou ter valor preditivo em pacientes com doença coronariana (187). Não somente foi demonstrado que camundongos ApoE^{-/-} transfectado por via intramuscular com plasmídeos que codificam a proteína ligante de IL-18 (IL-18BP), desenvolveram lesões mais reduzidas, com o inverso ocorrendo após a administração intraperitoneal de IL-18 recombinante (142,188).

Em nosso trabalho a análise imunoistoquímica permitiu detectar grande quantidade de macrófagos positivos para a IL-18, principalmente nas lesões consideradas instáveis. Um dado interessante foi a presença de um número elevado de macrófagos positivos para IL-18 em íntima associação com cristais de colesterol (fig. 27). Recentemente foi demonstrado que cristais de colesterol

presentes nas lesões são reconhecidos por macrófagos, promovendo a ativação de NLRs e levando a produção de IL-1 β e IL-18 (39).

Uma característica importante no processo inflamatório presente na aterosclerose é o contínuo recrutamento de células da circulação para a lesão, dependente de proteínas com função quimiotática, como a CCL2 (26) e da presença de moléculas de adesão no endotélio, como a ICAM-1 e o VCAM-1 (21). Lesões ateroscleróticas apresentam grande expressão de ICAM-1, VCAM-1, selectina E e selectina P em regiões da capa fibrosa com grande densidade de macrófagos e linfócitos T (189,190). Além disso, placas sintomáticas apresentam alta expressão de ICAM-1 em regiões de estenose (191). O papel da ICAM-1 foi claramente demonstrado em trabalhos experimentais utilizando camundongos duplo *knockout* para ApoE e ICAM-1, nos quais ocorre uma diminuição parcial no desenvolvimento das lesões com menor infiltração de monócitos (192).

Em consonância com estes dados da literatura, nossos resultados mostraram que a marcação para ICAM-1 nas amostras classificadas como estáveis foi moderada. No entanto, em amostras instáveis foi detectada grande quantidade dessa molécula de adesão circundando principalmente as células gigantes e espumosas, confirmando sua importância no recrutamento de monócitos.

Além dos mediadores inflamatórios clássicos, a detecção de linfócitos TCD4⁺ produtores de IFN- γ em placas ateroscleróticas confirma o papel da resposta imune adaptativa do tipo T_H1 na doença. Linfócitos T_H1 induzem ativação celular, aumento da expressão de moléculas de adesão, da secreção de citocinas e quimiocinas por macrófagos e células endoteliais (75). A presença de IFN- γ está associada a mecanismos de ruptura da lesão aterosclerótica por promover liberação de metaloproteinases por macrófagos e causar apoptose de células musculares lisas (8). Por outro lado, a deficiência do receptor para o IFN- γ ou do fator de transcrição T-bet promove diminuição no tamanho das lesões em camundongos (69,70). Em concordância com estes achados, em trabalho anterior, verificamos elevada expressão de IFN- γ (RNAm e proteína) em CMSP de pacientes com doença arterial coronariana (38).

No presente trabalho, as análises da expressão gênica mostraram a presença de RNAm para IFN- γ , IL-2, IL-12p35 e para o fator de transcrição T-bet. Ao comparar os resultados obtidos com as amostras controle notamos que o ateroma apresentava maior expressão do RNAm para IFN- γ . Adicionalmente, foi possível detectar um pequeno número de células IFN- γ positivas nas lesões, pelo método de citometria de fluxo.

Os linfócitos do subtipo T_H2, caracterizados pela secreção de IL-4, IL-5 e IL-13 (58), e apresentando o GATA-3 como principal fator de transcrição (62,63), também já foram detectados em lesões ateroscleróticas (81). Entretanto seu papel na doença ainda não está bem esclarecido. Camundongos ApoE^{-/-} IL-4^{-/-} apresentam lesões menores quando comparados ao grupo controle (81). Entretanto animais LDLR^{-/-} irradiados para os quais foram transferidas células IL-5^{-/-} apresentaram aumento no desenvolvimento das lesões (193). Nossos resultados mostraram maior expressão do RNAm de GATA-3 em placas ateroscleróticas, comparado a artérias controle.

Os resultados contraditórios reforçam a noção de que não apenas as respostas T_H1 e T_H2, uma regulando a outra, estão atuando na aterosclerose. Um terceiro componente, a resposta T_H17, poderia participar do controle recíproco da resposta T_H1 e T_H2.

Mais recentemente, trabalhos com modelos experimentais mostraram que camundongos ApoE^{-/-} nos quais a IL-17 foi inibida apresentaram diminuição na formação das lesões, menor concentração circulante de IL-6 e expressão de CXCL1 em macrófagos (106). Além disso, camundongos LDLR^{-/-} irradiados, que receberam células de animais IL-17R^{-/-} apresentam redução no tamanho de lesões ateroscleróticas com aumento do número de macrófagos e da produção de IL-10 (107). Por outro lado, em camundongos duplamente *knockout*, (ApoE^{-/-} e IL-18^{-/-}) a ausência da resposta T_H1/IL-12/IL-18 leva a um aumento no desenvolvimento da doença aterosclerótica, mediada por uma via alternativa, o eixo T_H17/IL-17 (194), mostrando o controle da resposta T_H1 sobre a resposta T_H17. Entretanto, contradizendo os trabalhos anteriores, Taleb e col (152) mostraram que a administração de IL-17 a camundongos LDLR^{-/-} promove diminuição das lesões

com menor infiltrado de células CD3⁺ e diminuição da expressão de VCAM-1. A falta de consenso reflete a existência de uma relação mais complexa entre populações celulares efetoras no controle da aterosclerose.

De qualquer forma, nossos resultados indicam, embora indiretamente (expressão elevada do RNAm para IL-23, IL17R e RorC) e da proteína IL-23, que o eixo T_H17/IL-17 pode estar envolvido no processo aterosclerótico. Outra explicação para a ausência de IL-17 (RNAm e proteína) poderia ser o recrutamento de células T_H17 para a lesão em um momento anterior ao da retirada da placa aterosclerótica. De fato, a expressão do RNAm para FOXP3, IL-10 e TGF- β e da proteína TGF- β e IL-10 em todas as amostras analisadas sugere a presença de linfócitos com caráter regulatório, que poderiam estar atuando em uma fase mais tardia no controle do processo inflamatório. Diversos trabalhos mostraram o papel células Treg na estabilização das lesões induzindo a diminuição local da quantidade de células e citocinas inflamatórias (112,114,195,196).

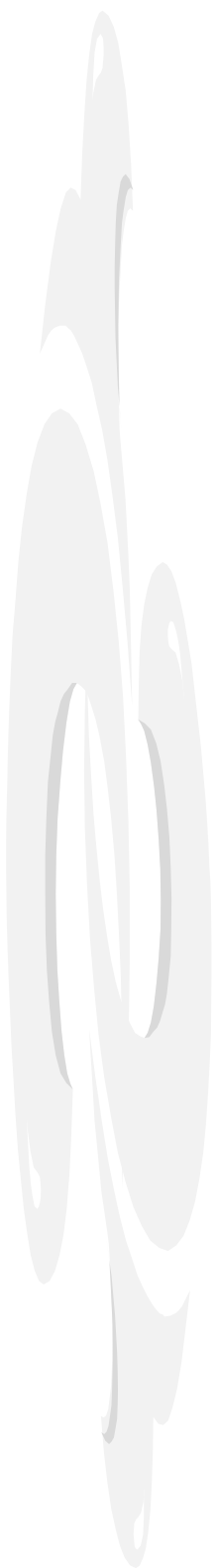
Apesar do foco principal de nosso trabalho ter sido investigar a resposta T_H17 em lesões de ateroma humano, os resultados permitem inferir a presença de outros subtipos de linfócitos TCD4⁺. A presença de RNAm para IL-27R e EBI3 (uma das subunidades que compõem a IL-27) nas amostras avaliadas e em concentração maior do que nas amostras controle, sugere a participação da IL-27 no processo. A IL-27 induz a diferenciação de linfócitos TCD4⁺ em células Tr1 produtoras de IL-10 (137) e estas células poderiam atuar no controle da resposta inflamatória na placa, conforme sugerido por Mallat et al (138). Estes autores mostraram que a transferência adotiva de linfócitos Tr1 para camundongos ApoE^{-/-} promoveu diminuição da resposta T_H1, com menor produção de IFN- γ e do desenvolvimento de lesões.

Finalmente, os dados de expressão gênica também mostraram grande expressão relativa do RNAm para moléculas citotóxicas (perforina, granzima A, granzima B e granulicina) em amostras de ateroma. Comprovando estes resultados também observamos grande quantidade de macrófagos positivos para

granzima B e perforina nos infiltrados celulares presentes nas lesões e um pequeno número de células positivas para granzulina.

A produção de moléculas citotóxicas é geralmente associada a linfócitos TCD8⁺ ou células NK (197), e à resposta imunológica inata e adaptativa a tumores e infecções virais. Entretanto, trabalhos recentes mostraram a presença de macrófagos positivos para granzima B em lesão aterosclerótica (198) e em células da linhagem THP-1 (199), estimuladas com componentes de matriz extracelular, sugerindo um papel para esta molécula no remodelamento da matriz extracelular pela degradação de vitronectina, fibronectina e laminina (143).

Em resumo, nossos resultados mostraram a expressão de componentes da resposta T_H17, em associação com elementos da resposta T_H1, T_H2 e Treg em lesões ateroscleróticas humanas. Trabalhos estão em andamento em nosso laboratório para melhor identificar os mecanismos de interação, balanço e potencial de colaboração entre essas populações no controle da aterosclerose.



Conclusões

A pesquisa da IL-17 em lesões ateroscleróticas humanas, provenientes de pacientes submetidos à endarterectomia carotídea, mostrou expressão rara do RNAm para IL-17 e nenhuma célula IL-17⁺ na avaliação pelo método de imunoistoquímica. Entretanto, após estimulação em cultura foi possível observar a produção de IL-17 e a presença de células IL-17⁺, embora em pequeno número. Por outro lado observamos a expressão de grande quantidade do receptor para IL-17 (IL-17r), além da IL-23 e IL-22, de CCL20 (quimiocina envolvida no recrutamento de células T_H17), e de CCR4 e CCR6 (receptores da quimiocina CCL20) além do fator de transcrição RorC. Outro dado interessante foi a intensa marcação para as citocinas IL-23 e IL-1 β em amostras de ateroma que apresentavam intenso infiltrado de macrófagos e classificadas como instáveis. Esses dados sugerem de forma indireta que a resposta T_H17 pode participar da patogênese da aterosclerose.

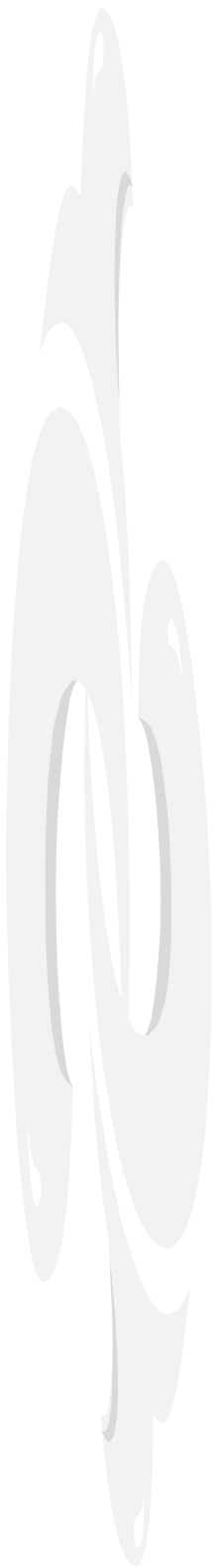
A análise das amostras coletadas mostrou a presença de componentes da resposta T_H1 (IFN- γ , IL-12p35, IL-18, T-bet); T_H2 (GATA-3) e Treg (IL-10, TGF- β e FOXP3). Esses achados indicam que várias populações de células T CD4⁺ efetoras co-existem na lesão aterosclerótica e que a interação entre elas deve ser importante na patogênese da doença.

A resposta anti-inflamatória foi analisada e encontramos expressão aumentada do RNAm para IL-10, FOXP3 e EBI3 em lesões de ateroma quando comparado ao grupo controle. Macrófagos positivos para IL-10 e TGF- β também foram detectados nas lesões, além da expressão do RNAm para IL-27R. Esses dados mostram a presença de resposta regulatória que atua no controle da resposta inflamatória local.

A análise imunoistoquímica também mostrou macrófagos positivos para moléculas citotóxicas, como a perforina, granzima B e em menor quantidade, granulinsina, em concordância com os achados de expressão gênica. Estas moléculas, ainda pouco explorados no contexto da aterogênese, poderiam participar dos processos de degradação de matriz extracelular, o que pode contribuir para mecanismos de ruptura de lesões instáveis.

As citocinas IL-17 e IL-23 não foram detectadas no plasma de pacientes com estenose de carótida submetidos à endarterectomia, nem tampouco em lesados medulares. No entanto, em alguns pacientes com doença arterial coronariana e *diabetes mellitus*, condição associada à intensa resposta inflamatória, a IL-17 foi detectada no plasma, sugerindo mais uma vez a sua participação no processo inflamatório que caracteriza a aterosclerose.

Em conjunto os resultados obtidos indicam que a resposta inflamatória presente no ateroma conta com a participação de diferentes grupos de células T CD4 efectoras. A detecção de componentes da resposta T_H17, embora ainda pouco estudados no contexto da aterosclerose, sugerem a sua participação na patogênese da doença. Novas pesquisas são necessárias para a compreensão dos mecanismos de interação, balanço e potencial de colaboração entre essas populações no controle da aterosclerose.



Referências Bibliográficas

1. World Health Organization. World Health Statistics 2008. 2008.
2. Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Arq Bras Cardiol. 2004; 82.
3. Ribeiro RA MR, Melchior R, Dill JC, Hohmann CB, Lucchese AM. . Custo anual do manejo da cardiopatia isquêmica crônica no Brasil: Perspectiva pública e privada. Arq Bras Cardiol. 2005; 85: 3 - 8.
4. Becker AE, de Boer OJ, van Der Wal AC. The role of inflammation and infection in coronary artery disease. Annu Rev Med. 2001; 52: 289-97.
5. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. J Clin Invest. 1997; 100 (11): 2680-90.
6. Lusis AJ. Atherosclerosis. Nature. 2000; 407 (6801): 233-41.
7. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Nature. 2002; 420 (6917): 868-74.
8. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001; 21 (12): 1876-90.
9. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). N Engl J Med. 1976; 295 (8): 420-5.
10. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. J Clin Invest. 1991; 88 (6): 1785-92.
11. Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. Nat Med. 2002; 8 (11): 1211-7.
12. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999; 340 (2): 115-26.
13. Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis. Science. 1996; 272 (5262): 685-8.
14. de Nooijer R, Bot I, von der Thüsen JH, Leeuwenburgh MA, Overkleeft HS, Kraaijeveld AO et al. Leukocyte cathepsin S is a potent regulator of both cell and matrix turnover in advanced atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009; 29 (2): 188-94.
15. Gimbrone MA, Jr. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. Am J Pathol. 1999; 155 (1): 1-5.
16. Boren J, Olin K, Lee I, Chait A, Wight TN, Innerarity TL. Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. J Clin Invest. 1998; 101 (12): 2658-64.
17. Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultén LM, Wiklund O, Innerarity TL et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. Nature. 2002; 417 (6890): 750-4.
18. Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. Curr Opin Lipidol. 2003; 14 (5): 421-30.
19. Kume N, Murase T, Moriwaki H, Aoyama T, Sawamura T, Masaki T et al. Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. Circ Res. 1998; 83 (3): 322-7.

20. Chen H, Li D, Saldeen T, Mehta JL. Transforming growth factor-beta(1) modulates oxidatively modified LDL-induced expression of adhesion molecules: role of LOX-1. *Circ Res*. 2001; 89 (12): 1155-60.
21. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2003; 170 (2): 191-203.
22. Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med*. 2000; 191 (1): 189-94.
23. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001; 107 (10): 1255-62.
24. Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1998; 102 (1): 145-52.
25. Combadiere C, Potteaux S, Rodero M, Simon T, Pezard A, Esposito B et al. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytes and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*. 2008; 117 (13): 1649-57.
26. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*. 1998; 2 (2): 275-81.
27. Lesnik P, Haskell CA, Charo IF. Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest*. 2003; 111 (3): 333-40.
28. Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P et al. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest*. 1999; 104 (8): 1041-50.
29. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92 (18): 8264-8.
30. Hartvigsen K, Chou MY, Hansen LF, Shaw PX, Tsimikas S, Binder CJ et al. The role of innate immunity in atherogenesis. *J Lipid Res*. 2009; 50 Suppl: S388-93.
31. Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF et al. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest*. 2000; 105 (8): 1049-56.
32. Lundberg AM, Hansson GK. Innate immune signals in atherosclerosis. *Clin Immunol*. 2010; 134 (1): 5-24.
33. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation*. 2002; 105 (10): 1158-61.
34. Otsui K, Inoue N, Kobayashi S, Shiraki R, Honjo T, Takahashi M et al. Enhanced expression of TLR4 in smooth muscle cells in human atherosclerotic coronary arteries. *Heart Vessels*. 2007; 22 (6): 416-22.
35. Mullick AE, Soldau K, Kiessses WB, Bell TA, 3rd, Tobias PS, Curtiss LK. Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events. *J Exp Med*. 2008; 205 (2): 373-83.

36. Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation*. 2001; 104 (25): 3103-8.
37. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Hacker H et al. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem*. 2001; 276 (33): 31332-9.
38. de Oliveira RT, Mamoni RL, Souza JR, Fernandes JL, Rios FJ, Gidlund M et al. Differential expression of cytokines, chemokines and chemokine receptors in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol*. 2009; 136 (1): 17-26.
39. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010; 464 (7293): 1357-61.
40. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005; 352 (16): 1685-95.
41. Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*. 2006; 1: 297-329.
42. Dansky HM, Charlton SA, Harper MM, Smith JD. T and B lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94 (9): 4642-6.
43. Daugherty A, Pure E, Delfel-Butteiger D, Chen S, Leferovich J, Roselaar SE et al. The effects of total lymphocyte deficiency on the extent of atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice. *J Clin Invest*. 1997; 100 (6): 1575-80.
44. Zhou X, Nicoletti A, Elhage R, Hansson GK. Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. *Circulation*. 2000; 102 (24): 2919-22.
45. Gotsman I, Sharpe AH, Lichtman AH. T-cell costimulation and coinhibition in atherosclerosis. *Circ Res*. 2008; 103 (11): 1220-31.
46. Palinski W, Horkko S, Miller E, Steinbrecher UP, Powell HC, Curtiss LK et al. Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma. *J Clin Invest*. 1996; 98 (3): 800-14.
47. 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 (4): 605-16.
48. Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92 (9): 3893-7.
49. Zhou X, Robertson AK, Hjerpe C, Hansson GK. Adoptive transfer of CD4+ T cells reactive to modified low-density lipoprotein aggravates atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26 (4): 864-70.
50. Wick G, Knoflach M, Xu Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22: 361-403.
51. Liu C, Waters DD. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: from Koch postulates to clinical trials. *Prog Cardiovasc Dis*. 2005; 47 (4): 230-9.

52. Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase expression. *Circulation*. 1998; 98 (4): 300-7.
53. Buono C, Pang H, Uchida Y, Libby P, Sharpe AH, Lichtman AH. B7-1/B7-2 costimulation regulates plaque antigen-specific T-cell responses and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*. 2004; 109 (16): 2009-15.
54. Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ, de Muinck ED, Grewal IS, Kotliansky VE et al. Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis. *Nat Med*. 1999; 5 (11): 1313-6.
55. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature*. 1998; 394 (6689): 200-3.
56. Schonbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97 (13): 7458-63.
57. Wang X, Ria M, Kelmenson PM, Eriksson P, Higgins DC, Samnegard A et al. Positional identification of TNFSF4, encoding OX40 ligand, as a gene that influences atherosclerosis susceptibility. *Nat Genet*. 2005; 37 (4): 365-72.
58. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986; 136 (7): 2348-57.
59. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000; 100 (6): 655-69.
60. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. 1993; 260 (5107): 547-9.
61. Andersson J, Libby P, Hansson GK. Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol*. 2010; 134 (1): 33-46.
62. Zhang DH, Cohn L, Ray P, Bottomly K, Ray A. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem*. 1997; 272 (34): 21597-603.
63. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 1997; 89 (4): 587-96.
64. Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med*. 1990; 172 (3): 921-9.
65. Uyemura K, Demer LL, Castle SC, Jullien D, Berliner JA, Gately MK et al. Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1996; 97 (9): 2130-8.
66. Gerdes N, Sukhova GK, Libby P, Reynolds RS, Young JL, Schonbeck U. Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis. *J Exp Med*. 2002; 195 (2): 245-57.
67. Buono C, Come CE, Stavrakis G, Maguire GF, Connelly PW, Lichtman AH. Influence of interferon- γ on the extent and phenotype of diet-induced

- atherosclerosis in the LDLR-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23 (3): 454-60.
68. Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. IFN-gamma deficiency exerts gender-specific effects on atherogenesis in apolipoprotein E-/- mice. *J Interferon Cytokine Res.* 2002; 22 (6): 661-70.
69. Gupta S, Pablo AM, Jiang X, Wang N, Tall AR, Schindler C. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest.* 1997; 99 (11): 2752-61.
70. Buono C, Binder CJ, Stavrakis G, Witztum JL, Glimcher LH, Lichtman AH. T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102 (5): 1596-601.
71. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989; 7: 145-73.
72. Sad S, Marcotte R, Mosmann TR. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity.* 1995; 2 (3): 271-9.
73. Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med.* 1998; 187 (12): 2103-8.
74. Bancroft GJ, Schreiber RD, Unanue ER. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol Rev.* 1991; 124: 5-24.
75. Harvey EJ, Ramji DP. Interferon-gamma and atherosclerosis: pro- or anti-atherogenic? *Cardiovasc Res.* 2005; 67 (1): 11-20.
76. Leon ML, Zuckerman SH. Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis. *Inflamm Res.* 2005; 54 (10): 395-411.
77. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 1991; 11 (5): 1223-30.
78. Hansson GK, Hellstrand M, Rymo L, Rubbia L, Gabbiani G. Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells. *J Exp Med.* 1989; 170 (5): 1595-608.
79. McLaren JE, Ramji DP. Interferon gamma: a master regulator of atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009; 20 (2): 125-35.
80. Fernandes JL, Mamoni RL, Orford JL, Garcia C, Selwyn AP, Coelho OR et al. Increased Th1 activity in patients with coronary artery disease. *Cytokine.* 2004; 26 (3): 131-7.
81. Davenport P, Tipping PG. The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol.* 2003; 163 (3): 1117-25.
82. King VL, Szilvassy SJ, Daugherty A. Interleukin-4 deficiency decreases atherosclerotic lesion formation in a site-specific manner in female LDL receptor-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22 (3): 456-61.
83. Leskinen MJ, Kovanen PT, Lindstedt KA. Regulation of smooth muscle cell growth, function and death in vitro by activated mast cells--a potential mechanism

- for the weakening and rupture of atherosclerotic plaques. *Biochem Pharmacol.* 2003; 66 (8): 1493-8.
84. Winsor GL, Waterhouse CC, MacLellan RL, Stadnyk AW. Interleukin-4 and IFN-gamma differentially stimulate macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1) and eotaxin production by intestinal epithelial cells. *J Interferon Cytokine Res.* 2000; 20 (3): 299-308.
 85. Iademarco MF, Barks JL, Dean DC. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 expression by IL-4 and TNF-alpha in cultured endothelial cells. *J Clin Invest.* 1995; 95 (1): 264-71.
 86. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005; 6 (11): 1123-32.
 87. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005; 6 (11): 1133-41.
 88. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006; 441 (7090): 235-8.
 89. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature.* 2006; 441 (7090): 231-4.
 90. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006; 24 (2): 179-89.
 91. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ et al. The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell.* 2006; 126 (6): 1121-33.
 92. Stritesky GL, Yeh N, Kaplan MH. IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. *J Immunol.* 2008; 181 (9): 5948-55.
 93. Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25: 221-42.
 94. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature.* 2007; 448 (7152): 484-7.
 95. Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature.* 2007; 448 (7152): 480-3.
 96. Zhou L, Ivanov, II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol.* 2007; 8 (9): 967-74.
 97. Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S et al. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol.* 2006; 7 (9): 929-36.
 98. Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T

- helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol.* 2006; 7 (9): 937-45.
99. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol.* 2007; 8 (6): 639-46.
 100. Sato W, Aranami T, Yamamura T. Cutting edge: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5- phenotype. *J Immunol.* 2007; 178 (12): 7525-9.
 101. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004; 21 (4): 467-76.
 102. Kolls JK, Kanaly ST, Ramsay AJ. Interleukin-17: an emerging role in lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003; 28 (1): 9-11.
 103. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest.* 2006; 116 (5): 1310-6.
 104. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005; 201 (2): 233-40.
 105. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2003; 198 (12): 1951-7.
 106. Smith E, Prasad KM, Butcher M, Dobrian A, Kolls JK, Ley K et al. Blockade of interleukin-17A results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2010; 121 (15): 1746-55.
 107. van Es T, van Puijvelde GH, Ramos OH, Segers FM, Joosten LA, van den Berg WB et al. Attenuated atherosclerosis upon IL-17R signaling disruption in LDLr deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 388 (2): 261-5.
 108. de Boer OJ, van der Meer JJ, Teeling P, van der Loos CM, Idu MM, van Maldegem F et al. Differential expression of interleukin-17 family cytokines in intact and complicated human atherosclerotic plaques. *J Pathol.* 2010; 220 (4): 499-508.
 109. Eid RE, Rao DA, Zhou J, Lo SF, Ranjbaran H, Gallo A et al. Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 2009; 119 (10): 1424-32.
 110. Stephens GL, Shevach EM. Foxp3+ regulatory T cells: selfishness under scrutiny. *Immunity.* 2007; 27 (3): 417-9.
 111. Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. Cytokine network and T cell immunity in atherosclerosis. *Semin Immunopathol.* 2009; 31 (1): 23-33.
 112. Heller EA, Liu E, Tager AM, Yuan Q, Lin AY, Ahluwalia N et al. Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells. *Circulation.* 2006; 113 (19): 2301-12.
 113. de Boer OJ, van der Meer JJ, Teeling P, van der Loos CM, van der Wal AC. Low numbers of FOXP3 positive regulatory T cells are present in all developmental stages of human atherosclerotic lesions. *PLoS One.* 2007; 2 (1): e779.
 114. Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AK, Gourdy P, Zoll J et al. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med.* 2006; 12 (2): 178-80.

115. Gotsman I, Grabie N, Gupta R, Dacosta R, MacConmara M, Lederer J et al. Impaired regulatory T-cell response and enhanced atherosclerosis in the absence of inducible costimulatory molecule. *Circulation*. 2006; 114 (19): 2047-55.
116. Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamate C, Merval R et al. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res*. 2001; 89 (10): 930-4.
117. Lutgens E, Gijbels M, Smook M, Heeringa P, Gotwals P, Koteliansky VE et al. Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22 (6): 975-82.
118. Robertson AK, Rudling M, Zhou X, Gorelik L, Flavell RA, Hansson GK. Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2003; 112 (9): 1342-50.
119. Stefoni S, Cianciolo G, Donati G, Dormi A, Silvestri MG, Coli L et al. Low TGF-beta1 serum levels are a risk factor for atherosclerosis disease in ESRD patients. *Kidney Int*. 2002; 61 (1): 324-35.
120. Tashiro H, Shimokawa H, Sadamatu K, Yamamoto K. Prognostic significance of plasma concentrations of transforming growth factor-beta in patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis*. 2002; 13 (3): 139-43.
121. Mallat Z, Besnard S, Duriez M, Deleuze V, Emmanuel F, Bureau MF et al. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res*. 1999; 85 (8): e17-24.
122. Caligiuri G, Rudling M, Ollivier V, Jacob MP, Michel JB, Hansson GK et al. Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice. *Mol Med*. 2003; 9 (1-2): 10-7.
123. Potteaux S, Esposito B, van Oostrom O, Brun V, Ardouin P, Groux H et al. Leukocyte-derived interleukin 10 is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24 (8): 1474-8.
124. Smith DA, Irving SD, Sheldon J, Cole D, Kaski JC. Serum levels of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 are decreased in patients with unstable angina. *Circulation*. 2001; 104 (7): 746-9.
125. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Boersma E, Simoons ML et al. Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2003; 107 (16): 2109-14.
126. Cina CS CC, Haynes RB. . Carotid endarterectomy for symptomatic carotid stenosis (Cochrane review). . The Cochrane Library. 2004; (2).
127. Guillaumon AT ON, Freire LMD, Baldini Neto L, Martins AM, Rocha EF. Endarterectomia carotídea sob bloqueio loco-regional. *J Vasc Br*. 2005; 4 (3): 249-54.
128. Menezes FH LG, Matsui IA, Santos ACOQ, Silveira SAF. Avaliação através da ultra-sonografia duplex da medida de reestenose da carótida interna dos pacientes submetidos à endarterectomia aberta de bifurcação carotídea, com eversão parcial da carótida interna. *J Vasc Br*. 2005; 4: 47-54.
129. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric

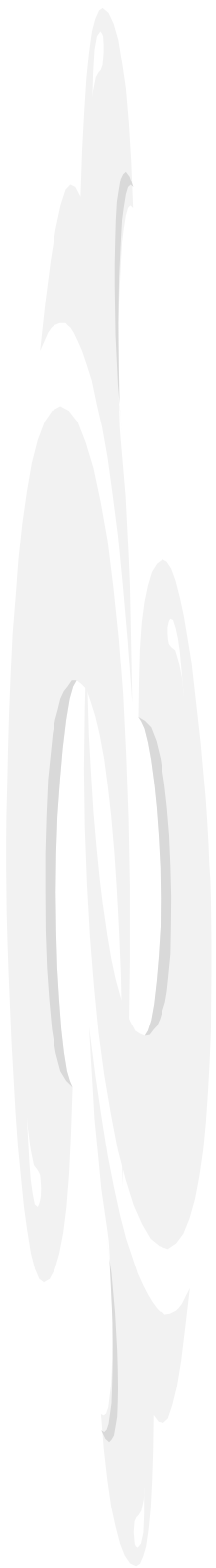
- averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3 (7): RESEARCH0034.
130. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 2006; 1 (3): 1559-82.
 131. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 2000; 13 (5): 715-25.
 132. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med.* 2006; 203 (10): 2271-9.
 133. Weber C, Zernecke A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8 (10): 802-15.
 134. Yan ZQ, Hansson GK. Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. *Immunol Rev.* 2007; 219: 187-203.
 135. Patel S, Chung SH, White G, Bao S, Celermajer DS. The "atheroprotective" mediators apolipoprotein A-I and Foxp3 are over-abundant in unstable carotid plaques. *Int J Cardiol.* 2009.
 136. Terkeltaub RA. IL-10: An "immunologic scalpel" for atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19 (12): 2823-5.
 137. Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA et al. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol.* 2007; 8 (12): 1380-9.
 138. Mallat Z, Gojova A, Brun V, Esposito B, Fournier N, Cottrez F et al. Induction of a regulatory T cell type 1 response reduces the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation.* 2003; 108 (10): 1232-7.
 139. Castellani ML, Anogeianaki A, Felaco P, Toniato E, De Lutiis MA, Shaik B et al. IL-35, an anti-inflammatory cytokine which expands CD4+CD25+ Treg Cells. *J Biol Regul Homeost Agents.* 24 (2): 131-5.
 140. Buzza MS, Zamurs L, Sun J, Bird CH, Smith AI, Trapani JA et al. Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin. *J Biol Chem.* 2005; 280 (25): 23549-58.
 141. Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, Besnard S, Leseche G, Chvatchko Y et al. Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability. *Circulation.* 2001; 104 (14): 1598-603.
 142. Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, Graber P, Alouani S, Esposito B et al. Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates atherosclerotic lesion development and stability. *Circ Res.* 2001; 89 (7): E41-5.
 143. Chamberlain CM, Granville DJ. The role of Granzyme B in atheromatous diseases. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007; 85 (1): 89-95.
 144. Niessner A, Sato K, Chaikof EL, Colmegna I, Goronzy JJ, Weyand CM. Pathogen-sensing plasmacytoid dendritic cells stimulate cytotoxic T-cell function in the atherosclerotic plaque through interferon-alpha. *Circulation.* 2006; 114 (23): 2482-9.

145. Cheng X, Yu X, Ding YJ, Fu QQ, Xie JJ, Tang TT et al. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol.* 2008; 127 (1): 89-97.
146. Winer S, Paltser G, Chan Y, Tsui H, Engleman E, Winer D et al. Obesity predisposes to Th17 bias. *Eur J Immunol.* 2009; 39 (9): 2629-35.
147. Patel KD, Murphy RT, White M, Gasparro D, Kelleher DP, Ryan T et al. Interleukin 17: an unlikely marker of acute coronary syndrome? *Atherosclerosis.* 2009; 205 (1): 33-4.
148. Koenig W, Khuseynova N. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27 (1): 15-26.
149. Golledge J, Greenhalgh RM, Davies AH. The symptomatic carotid plaque. *Stroke.* 2000; 31 (3): 774-81.
150. Redgrave JN, Lovett JK, Gallagher PJ, Rothwell PM. Histological assessment of 526 symptomatic carotid plaques in relation to the nature and timing of ischemic symptoms: the Oxford plaque study. *Circulation.* 2006; 113 (19): 2320-8.
151. Cardoso CR, Garlet GP, Crippa GE, Rosa AL, Junior WM, Rossi MA et al. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24 (1): 1-6.
152. Taleb S, Romain M, Ramkhalawon B, Uyttenhove C, Pasterkamp G, Herbin O et al. Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis. *J Exp Med.* 2009; 206 (10): 2067-77.
153. Jain MK, Ridker PM. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4 (12): 977-87.
154. Mausner-Fainberg K, Luboshits G, Mor A, Maysel-Auslender S, Rubinstein A, Keren G et al. The effect of HMG-CoA reductase inhibitors on naturally occurring CD4+CD25+ T cells. *Atherosclerosis.* 2008; 197 (2): 829-39.
155. Zhang X, Jin J, Peng X, Ramgolam VS, Markovic-Plese S. Simvastatin inhibits IL-17 secretion by targeting multiple IL-17-regulatory cytokines and by inhibiting the expression of IL-17 transcription factor RORC in CD4+ lymphocytes. *J Immunol.* 2008; 180 (10): 6988-96.
156. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 519-50.
157. Tamaru M, Tomura K, Sakamoto S, Tezuka K, Tamatani T, Narumi S. Interleukin-1 β induces tissue- and cell type-specific expression of adhesion molecules in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18 (8): 1292-303.
158. Bryant C, Fitzgerald KA. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends Cell Biol.* 2009; 19 (9): 455-64.
159. Olofsson PS, Sheikine Y, Jatta K, Ghaderi M, Samnegard A, Eriksson P et al. A functional interleukin-1 receptor antagonist polymorphism influences atherosclerosis development. The interleukin-1 β :interleukin-1 receptor antagonist balance in atherosclerosis. *Circ J.* 2009; 73 (8): 1531-6.
160. Kirii H, Niwa T, Yamada Y, Wada H, Saito K, Iwakura Y et al. Lack of interleukin-1 β decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23 (4): 656-60.
161. Isoda K, Sawada S, Ishigami N, Matsuki T, Miyazaki K, Kusuhashi M et al. Lack of interleukin-1 receptor antagonist modulates plaque composition in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24 (6): 1068-73.

162. Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res.* 2008; 79 (3): 360-76.
163. Ohta H, Wada H, Niwa T, Kirii H, Iwamoto N, Fujii H et al. Disruption of tumor necrosis factor- α gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2005; 180 (1): 11-7.
164. Gray PW, Barrett K, Chantry D, Turner M, Feldmann M. Cloning of human tumor necrosis factor (TNF) receptor cDNA and expression of recombinant soluble TNF-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87 (19): 7380-4.
165. Smith CA, Davis T, Anderson D, Solam L, Beckmann MP, Jerzy R et al. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science.* 1990; 248 (4958): 1019-23.
166. Schreyer SA, Peschon JJ, LeBoeuf RC. Accelerated atherosclerosis in mice lacking tumor necrosis factor receptor p55. *J Biol Chem.* 1996; 271 (42): 26174-8.
167. Barath P, Fishbein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, Forrester JS. Tumor necrosis factor gene expression in human vascular intimal smooth muscle cells detected by in situ hybridization. *Am J Pathol.* 1990; 137 (3): 503-9.
168. Vaddi K, Nicolini FA, Mehta P, Mehta JL. Increased secretion of tumor necrosis factor- α and interferon- γ by mononuclear leukocytes in patients with ischemic heart disease. Relevance in superoxide anion generation. *Circulation.* 1994; 90 (2): 694-9.
169. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol.* 2007; 8 (9): 942-9.
170. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ mat. *Nat Immunol.* 2008; 9 (6): 641-9.
171. Rattazzi M, Puato M, Faggin E, Bertipaglia B, Zambon A, Pauletto P. C-reactive protein and interleukin-6 in vascular disease: culprits or passive bystanders? *J Hypertens.* 2003; 21 (10): 1787-803.
172. Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19 (10): 2364-7.
173. Biasucci LM, Liuzzo G, Fantuzzi G, Caligiuri G, Rebuzzi AG, Ginnetti F et al. Increasing levels of interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events. *Circulation.* 1999; 99 (16): 2079-84.
174. Elhage R, Clamens S, Besnard S, Mallat Z, Tedgui A, Arnal J et al. Involvement of interleukin-6 in atherosclerosis but not in the prevention of fatty streak formation by 17 β -estradiol in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2001; 156 (2): 315-20.
175. Schieffer B, Selle T, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Grote K, Tietge UJ et al. Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation.* 2004; 110 (22): 3493-500.
176. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood.* 1989; 74 (1): 1-10.
177. Tilg H, Dinarello CA, Mier JW. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol Today.* 1997; 18 (9): 428-32.

178. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest.* 1998; 101 (2): 311-20.
179. Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature.* 1995; 378 (6552): 88-91.
180. Olee T, Hashimoto S, Quach J, Lotz M. IL-18 is produced by articular chondrocytes and induces proinflammatory and catabolic responses. *J Immunol.* 1999; 162 (2): 1096-100.
181. Stoll S, Muller G, Kurimoto M, Saloga J, Tanimoto T, Yamauchi H et al. Production of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes. *J Immunol.* 1997; 159 (1): 298-302.
182. Udagawa N, Horwood NJ, Elliott J, Mackay A, Owens J, Okamura H et al. Interleukin-18 (interferon-gamma-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation. *J Exp Med.* 1997; 185 (6): 1005-12.
183. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19: 423-74.
184. Micallef MJ, Ohtsuki T, Kohno K, Tanabe F, Ushio S, Namba M et al. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol.* 1996; 26 (7): 1647-51.
185. Kohka H, Yoshino T, Iwagaki H, Sakuma I, Tanimoto T, Matsuo Y et al. Interleukin-18/interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, up-regulates ICAM-1 (CD54) expression in KG-1 cells. *J Leukoc Biol.* 1998; 64 (4): 519-27.
186. Puren AJ, Fantuzzi G, Gu Y, Su MS, Dinarello CA. Interleukin-18 (IFNgamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1beta via TNFalpha production from non-CD14+ human blood mononuclear cells. *J Clin Invest.* 1998; 101 (3): 711-21.
187. Blankenberg S, Tiret L, Bickel C, Peetz D, Cambien F, Meyer J et al. Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina. *Circulation.* 2002; 106 (1): 24-30.
188. Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. Interleukin-18 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E(-/-) mice through release of interferon-gamma. *Circ Res.* 2002; 90 (2): E34-8.
189. Johnson-Tidey RR, McGregor JL, Taylor PR, Poston RN. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol.* 1994; 144 (5): 952-61.
190. O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation.* 1996; 93 (4): 672-82.
191. DeGraba TJ, Siren AL, Penix L, McCarron RM, Hargraves R, Sood S et al. Increased endothelial expression of intercellular adhesion molecule-1 in symptomatic versus asymptomatic human carotid atherosclerotic plaque. *Stroke.* 1998; 29 (7): 1405-10.

192. Nageh MF, Sandberg ET, Marotti KR, Lin AH, Melchior EP, Bullard DC et al. Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17 (8): 1517-20.
193. Binder CJ, Hartvigsen K, Chang MK, Miller M, Broide D, Palinski W et al. IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2004; 114 (3): 427-37.
194. Pejnovic N, Vratimos A, Lee SH, Popadic D, Takeda K, Akira S et al. Increased atherosclerotic lesions and Th17 in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice fed high-fat diet. *Mol Immunol.* 2009; 47 (1): 37-45.
195. Mor A, Planer D, Luboshits G, Afek A, Metzger S, Chajek-Shaul T et al. Role of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27 (4): 893-900.
196. Yang K, Li D, Luo M, Hu Y. Generation of HSP60-specific regulatory T cell and effect on atherosclerosis. *Cell Immunol.* 2006; 243 (2): 90-5.
197. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 165-97.
198. Kim WJ, Kim H, Suk K, Lee WH. Macrophages express granzyme B in the lesion areas of atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Immunol Lett.* 2007; 111 (1): 57-65.
199. Kida Y, Shimizu T, Kuwano K. Conditional expression of liver-enriched transcriptional activator protein augments *Acholeplasma laidlawii*-induced granulysin gene expression in a human monocytic cell line, THP-1. *Immunology.* 2005; 114 (1): 121-32.



Anexos

CEP, 10/08/06.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 262/2006 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0194.0.146.000-06

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LINFÓCITOS TCD4+ PRODUTORES DE IL-17 NA ATEROSCLEROSE"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Rômulo Tadeu Dias de Oliveira

INSTITUIÇÃO: HC/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/04/06

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 25/07/07 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar a expressão de IL-17 e outros mediadores relacionados bem como a composição celular de placas ateroscleróticas de indivíduos submetidos à endarterectomia. Relacionar os achados imunológicos (mediadores e composição celular) com a morfologia da placa avaliada por ultrassom. Analisar os efeitos dos linfócitos TCDA+IL-17+ gerados *in vitro* sobre linhagem de células endoteliais derivadas da placa. Relacionar os achados relativos à ecogenicidade das placas carótídeas obtidos com ultrassom duplex com os achados imunológicos.

III - SUMÁRIO

Dentre os pacientes atendidos de forma habitual e dentro da rotina de atendimento à população do Ambulatório de Cirurgia vascular do HC-Unicamp, serão selecionados 30 pacientes com diagnóstico de estenose crítica de artéria carótida interna e indicação de cirurgia pela técnica de endarterectomia carótídea. Os pacientes serão submetidos a estudo ultrassonográfico pré-operatório e posteriormente, na mesma instituição, serão submetidos à cirurgia pela equipe de Cirurgia vascular. Todos os pacientes que aceitarem participar do estudo serão submetidos no período pré-operatório ao exame de ultrassom de alta definição das carótidas para definição da morfologia da placa. Amostras da parede vascular contendo placas ateroscleróticas serão coletadas da artéria carótida durante o procedimento de endarterectomia. Após recebimento da placa, uma metade será tratada para extração do RNA. A outra metade será tratada para obtenção de cortes histológicos e avaliação do infiltrado celular e presença de citocinas e receptores por imunohistoquímica. A obtenção de células TCD4+CD45RA+ para geração de células TCD4+IL-17+ será feita mediante coleta de 30 mL de sangue periférico de indivíduos saudáveis.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto é bem fundamentado e justificado. Para participar da pesquisa os sujeitos não serão submetidos a qualquer tipo de alteração da conduta médica ou alteração de risco operatório. O material retirado da artéria carótida durante procedimento de endarterectomia seria normalmente descartado. Amostras de 30 mL de sangue periférico serão colhidos dos pacientes juntamente com os exames pré-operatórios de rotina. Desta maneira, o estudo não apresentará riscos ou desconfortos suplementares aos pacientes, além daqueles diretamente ligados à intervenção cirúrgica. Tanto o termo de consentimento destinado aos pacientes quanto o para os indivíduos saudáveis estão adequados, sendo redigidos com muita clareza.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

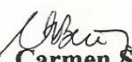
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.



VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de julho de 2006.


Prof.ª Dr.ª Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 24/06/08.
(PARECER CEP: Nº 262/2006)

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LINFÓCITOS TCD4+ PRODUTORES DE IL-17 NA ATEROSCLEROSE”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Rômulo Tadeu Dias de Oliveira

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o Adendo que inclui a coleta e análise de fragmento de artéria renal ou aorta de doador falecido de múltiplos órgãos, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de junho de 2008.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP