



MARCELA FRANCO MINEIRO

**IDENTIFICAÇÃO DE RECEPTORES DO TIPO NOD (NLRs) EM
PLACAS DE ATEROMA HUMANO E INVESTIGAÇÃO DO
PAPEL INFLAMATÓRIO DE NLRP3 E IL-1 BETA**

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MARCELA FRANCO MINEIRO

**IDENTIFICAÇÃO DE RECEPTORES DO TIPO NOD (NLRs) EM PLACAS DE ATEROMA
HUMANO E INVESTIGAÇÃO DO PAPEL INFLAMATÓRIO DE NLRP3 E IL-1 BETA**

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

Coorientador: Dr. Rômulo Tadeu Dias de Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção do título de Mestra em Ciências Médicas, área de concentração Ciências Biomédicas.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA MARCELA FRANCO
MINEIRO E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARIA HELOÍSA
DE SOUZA LIMA BLOTTA**

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M662i Mineiro, Marcela Franco, 1988-
Identificação de receptores do tipo Nod (NLRs) em placas de ateroma humano e investigação do papel inflamatório do NLRP3 e IL-1 beta / Marcela Franco Mineiro. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Maria Heloísa de Souza Lima Blotta.
Coorientador: Rômulo Tadeu Dias de Oliveira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas. -

1. Aterosclerose. 2. Inflamação. I. Blotta, Maria Heloísa de Souza Lima, 1953-. II. Oliveira, Rômulo Tadeu Dias de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Identification of Nod like receptors (NLRs) in human atherosclerotic plaques and inflammatory role of NLRP3 and IL-1 beta

Palavras-chave em inglês:

Atherosclerosis

Inflammation

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestra em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Maria Heloísa de Souza Lima Blotta [Orientador]

Maria Cristina Oliveira Izar

José Roberto Matos Souza

Data de defesa: 30-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

MARCELA FRANCO MINEIRO

Orientador (a) PROF(A). DR(A). MARIA HELOÍSA DE SOUZA LIMA BLOTTA

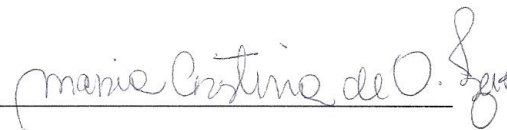
Co-Orientador (a) PROF(A). DR(A). RÔMULO TADEU DIAS DE OLIVEIRA

MEMBROS:

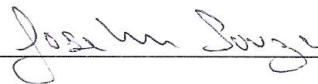
1. PROF(A). DR(A). MARIA HELOÍSA DE SOUZA LIMA BLOTTA



2. PROF(A). DR(A). MARIA CRISTINA OLIVEIRA IZAR



3. PROF(A). DR(A). JOSÉ ROBERTO MATOS SOUZA



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas

Data: 30 de julho de 2013

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

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais, Arthur e Ada, e Tiago. Cada um em um momento, em um vagão.

Agradeço

Aos meus pais, Arthur e Ada, pelo amor e apoio incondicionais, mesmo nos momentos de despedida com lágrimas nos olhos. Nossa família é meu porto-seguro.

Ao meu irmão, Otávio, que sempre me desejou e deseja “boa viagem” cheio de carinho. Apesar de não ser bom com palavras, sei que ele sempre torceu por mim.

À Prof^ª Dr^ª Maria Heloisa de Souza Lima Blotta, por me acolher no laboratório e se tornar mais que uma orientadora, mas uma amiga. Tão doce e tão marcante, foi um grande exemplo de comprometimento e dedicação.

Ao Dr. Rômulo Tadeu Dias de Oliveira, meu maior professor no laboratório, que me acompanhou em todos os acertos e erros da bancada e da vida de mestranda.

Ao Tiago, meu melhor encontro e minha fonte inesgotável de amor, parceria, compreensão, paciência e troca do que acreditamos ser a verdadeira sabedoria.

Ao Dr. Fábio Hússeman Menezes, que gentilmente cedeu as amostras de lesão aterosclerótica.

Aos pacientes que autorizaram a coleta do sangue e das amostras de lesão aterosclerótica.

À Rosiane Maria da Silva, pelos ensinamentos em imuno-histoquímica, pelo cuidado no processamento das amostras, pelas marcações e lindas fotos.

À Prof^ª Dr^ª Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro, querida professora dos tempos de IB, orientadora da iniciação científica e que, com certeza, foi fundamental para meus primeiros passos “imunológicos”.

Ao Dr. Ronei Luciano Mamoni, pelos ensinamentos e exemplo de dedicação e disciplina.

À Xinaida, Fernanda e Eliane pela amizade verdadeira, sorriso sincero e olhar tranquilizante. E pela companhia no bandeijão, claro.

Aos amigos do laboratório, alguns não mais presentes, Carol, Larissa, Rosiane, Munir, Fábio, Lívia e Liana, pelos momentos de descontração e boas risadas. E também pela doação de tubos de sangue.

Aos meus queridos familiares uberlandenses que sempre esperavam pelo meu retorno de braços abertos.

À Fapesp e ao CNPq pela ajuda financeira.

“I hope to do it better in time. I myself am very far from satisfied with this but, well, getting better must come through doing it and through trying.”

(Vincent van Gogh)

RESUMO

A presença de IL-1 β e IL-18 em lesões ateroscleróticas e o importante papel dessas citocinas na ativação endotelial, recrutamento celular e na polarização para a resposta T_H1 constitui indício indireto do envolvimento dos NLRs na patogênese da aterosclerose. Nesse trabalho investigamos a presença do RNAm e proteína de diversos NLRs, AIM2, caspase-1, proteína adaptadora ASC e IL-1 β em placas ateroscleróticas humanas. Observamos que amostras de ateroma de pacientes assintomáticos apresentaram maior expressão relativa do RNAm de NLRP1, 2 e 3, NLRC2, 3, 4 e 5, NAIP e ASC. A presença de fatores de risco não promoveu diferenças na expressão gênica do RNAm para nenhum deles. A marcação por imuno-histoquímica revelou a presença de NLRP1, 3, AIM-2, NLRC2, 3 e 5 e caspase-1, especialmente em macrófagos, células gigantes e células espumosas. Em culturas de monócitos do sangue periférico, macrófagos humanos derivados de monócitos e células da linhagem monocítica THP-1 estimuladas com LPS, a presença de cristais de colesterol teve efeito aditivo na produção de IL-1 β . Por outro lado, os inibidores farmacológicos inibiram a produção dessa citocina em células THP-1 após o estímulo com cristais de colesterol. A atividade da citocina IL-1 β também foi avaliada pela capacidade de induzir a produção de mediadores inflamatórios por células musculares lisas e células endoteliais. Catepsina S, MMP3, CXCL10, CXCL16 e CX3CL1 foram produzidas apenas por células musculares após o estímulo, mas CCL2, CXCL8 e CCL5 foram produzidos tanto por células musculares quanto por células endoteliais estimuladas. Em conclusão, nosso trabalho mostrou a presença de RNAm e proteína de diversos NLRs em placas de ateroma humano. Além disso, mostramos o papel dos cristais de colesterol na ativação de

monócitos e macrófagos produtores de IL-1 β , provavelmente via NLRP3, expresso em grande quantidade nas placas analisadas. Finalmente, os experimentos de estimulação de células musculares lisas e endoteliais ressaltaram a importância da IL-1 β como agente inflamatório e desestabilizador das lesões, confirmando seu potencial como alvo terapêutico visando a contenção do processo inflamatório que caracteriza a aterosclerose.

ABSTRACT

The presence of IL-1 β and IL-18 in atherosclerotic lesions and their important role in endothelial activation, cell recruitment and switch to Th1 response, are indirect indications of the involvement of NLRs in disease pathogenesis. In this study we investigated the presence of mRNA and protein of various NLRs, AIM2, caspase-1, adaptor protein ASC and IL-1 β in human atherosclerotic plaques. We observed that atheroma samples from asymptomatic patients had higher mRNA relative expression of NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRC2, NLRC3, NLRC4, NLRC5, NAIP and ASC. Risk factors have no influence in mRNA expression for any of them. Immunohistochemistry technique revealed the presence of NLRP1, NLRP3, AIM-2, NLRC2, NLRC3, NLRC5 and caspase-1, especially among macrophages, giant cells and foam cells. The presence of cholesterol crystals in monocytes and macrophages cultures stimulated with LPS, had an additive effect on IL-1 β production. On the other hand, pharmacological inhibitors inhibited this cytokine production by THP-1 cells stimulated with cholesterol crystals. The ability of IL-1 β to induce inflammatory mediators production by smooth muscle cells and endothelial cells was also evaluated. Cathepsin S, MMP3, CXCL10, CXCL16 and CX₃CL1 were produced only by smooth muscle cells after stimulation, but CCL2, CXCL8 and CCL5 were produced by both smooth muscle cells and endothelial cells. In conclusion, our study revealed the presence of various NLRs mRNA and protein in human atherosclerotic plaques. Furthermore, we demonstrated the role of cholesterol crystals in the activation of IL-1 β producers monocytes and macrophages, probably due to NLRP3 expressed in large amounts on the lesions analyzed. Finally, stimulation of smooth muscle cells and

endothelial cells highlighted the importance of IL-1 β as an inflammatory and destabilizing agent in lesions, confirming its potential as a therapeutic target that could restrain the prevailing inflammation in atherosclerosis.

Tabela I.	Sequência dos <i>primers</i> utilizados na reação de qRT-PCR	52
Tabela II.	Parâmetros clínicos e medicamentos usados pelos pacientes incluídos no estudo	68

Figura 1.	Bandas específicas de RNA em gel de agarose	53
Figura 2.	Curvas de <i>Melting</i> representativas da amplificação do cDNA	54
Figura 3.	Amplificação e curva padrão de genes representativos, obtidas nos testes de padronização dos <i>primers</i>	55
Figura 4.	Expressão relativa do RNAm para NLRP1, NLRP3, NLRC4, NAIP e AIM2 em fragmentos de ateroma humano	70
Figura 5.	Expressão relativa do RNAm para NLRP1, NLRP3, NLRC4, NLRC5 e AIM2 em fragmentos de ateroma humano organizados segundo a presença de fatores de risco	71
Figura 6.	Expressão relativa do RNAm para ASC, Caspase-1 e IL1 β em fragmentos de ateroma humano	72
Figura 7.	Expressão relativa do RNAm para NLRC1, NLRC2, NLRC3, NLRC5 e NLRP2 em fragmentos de ateroma humano	74
Figura 8.	Amostra de lesão aterosclerótica marcada com anti-NLRP1	76
Figura 9.	Amostra de lesão aterosclerótica marcada com anti-NLRP3	77
Figura 10.	Amostra de lesão aterosclerótica marcada com anti-AIM2	78
Figura 11.	Quantificação da área marcada com o anticorpo anti-NLRP3 e anti-AIM2 em amostras agrupadas por sintomatologia ou fatores de risco ...	79
Figura 12.	Amostra de lesão aterosclerótica marcada com anti-NLRC2	81
Figura 13.	Amostra de lesão aterosclerótica marcada com anti-NLRC5	82
Figura 14.	Amostra de lesão aterosclerótica marcada com anti-NLRC3	83
Figura 15.	Quantificação da área marcada com o anticorpo anti-NLRC3 em amostras agrupadas por sintomatologia ou fatores de risco	84
Figura 16.	Amostra de lesão aterosclerótica marcada com anti-caspase1	85

Figura 17.	Quantificação da área marcada com o anticorpo anti-caspase-1 em amostras agrupadas por sintomatologia ou fatores de risco	86
Figura 18.	Produção de IL-1 β e TNF- α por monócitos do sangue periférico estimulados	87
Figura 19.	Citometria de fluxo de células CD14+ submetidas às condições de cultura para diferenciação de macrófagos em M1 e M2	89
Figura 20.	Produção de IL-10, TNF- α , IL-6 e IL-1 β por macrófagos M1 e M2	90
Figura 21.	Produção de IL-1 β e TNF- α por macrófagos M1 e M2 derivados de monócitos	91
Figura 22.	Produção de IL-1 β e TNF- α por macrófagos THP/M ϕ , M1, M2a e M2c derivados de células THP-1	93
Figura 23.	Produção de IL-1 β e TNF- α por células THP/M ϕ na presença de diversas classes de inibidores	96
Figura 24.	Produção de catepsinas e metaloproteinases por células HVSMCs estimuladas com IL-1 β	98
Figura 25.	Produção de quimiocinas por células HVSMCs e HUVECs estimuladas com IL-1 β	100

ApoB100: fração 100 da apolipoproteína B

ApoE: apolipoproteína E

BSA: soroalbumina bovina

CCL: quimiocina ligante da família CC

cdNA: ácido desoxirribonucleico complementar

CMSPs: células mononucleares do sangue periférico

CXCL: quimiocina ligante da família CXC

CX₃CL: quimiocina ligante da família CX₃C

DAB: 3,3'- diaminobenzidina

DAC: doença arterial coronariana

DAMP: padrão molecular associado à injúria.

DEPC: dietilpirocarbonato

dNTP: deoxiribonucleotídeo

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: ensaio imunoenzimático de absorção

GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HSP: proteína de choque térmico

HUVEC: células endoteliais de cordão umbilical humano

HVSMC: células musculares lisas de aorta humana

IFN: interferon

Ig: imunoglobulina

IL: interleucina

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LOX1: receptor lectina-*like* para a LDL oxidada

LPS: lipopolissacarídeo

MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos

M-CSF: fator estimulador de colônias de macrófagos

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

MMP: metaloproteinase de matriz

NF- κ B: fator de transcrição nuclear kappa B

NLR: *nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing receptors*

PAMP: padrão molecular associado a patógenos

PBS: salina tamponada com fosfato

PMA: forbol 12-miristato 13-acetato

PRRs: receptores de reconhecimento padrão

qRT-PCR : reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

RNAm: ácido ribonucleico (RNA) mensageiro

ROS: reativos intermediários do oxigênio

TE: tris-EDTA

TGF: fator de transformação de crescimento

Th: linfócito T do tipo auxiliar (helper)

TLRs: receptores do tipo *Toll*

TNF: fator de necrose tumoral

VCAM-1: molécula 1 de adesão celular à vasculatura

YWHAZ: proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase, polipeptídeo zeta

1. INTRODUÇÃO	27
2. OBJETIVOS	41
2. 1. Objetivo geral	43
2. 2. Objetivos específicos	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	45
3. 1. Casuística	47
3. 2. Obtenção e estocagem das amostras de lesões ateroscleróticas	48
3. 3. Avaliação da expressão de genes relacionados aos NLRs por qRT-PCR e validação dos resultados	48
3. 4. Avaliação da expressão de proteínas em fragmentos de lesões ateroscleróticas por imuno-histoquímica	56
3. 5. Cultura e estimulação de monócitos e macrófagos para determinação da produção de IL-1 β	57
3. 6. Cultura e estimulação de células musculares lisas de aorta humana (HVSMCs) e células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs)	61
3. 7. ELISA	62
3. 8. Imunofluorescência e Citometria de Fluxo	63
3. 9. Análise estatística	64
4. RESULTADOS	65
4.1. Identificação de NLRs em amostras de lesões ateroscleróticas humana	67
4.2. Expressão da proteína dos receptores do tipo NOD (NLRs)	75
4.3. Produção de IL-1 β por monócitos e macrófagos após estimulação com cristais de colesterol	86
4.4. Avaliação da atividade da citocina IL-1 β na produção de mediadores inflamatórios por células musculares lisas e células endoteliais	97
5. DISCUSSÃO	101
6. CONCLUSÃO.....	117
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

1. Introdução



A capacidade do sistema imune vai muito além da proteção contra vírus, bactérias e parasitas helmintos. Por reconhecer e responder a uma infinidade de estímulos ambientais e endógenos, atualmente sabe-se que parte, senão a totalidade das doenças atualmente estudadas tem alguma associação com a resposta imune. Dentro desse contexto as doenças cardiovasculares não são exceção (1,2)

São inegáveis os avanços em saúde pública, tratamentos cardiológicos e descobertas científicas, mas as doenças cardiovasculares ainda representam a maior causa de morte no mundo (aproximadamente 30%), ultrapassando patologias como o câncer. Diante disso, é óbvio assumir que também representam um enorme custo à economia global e estimativas de gastos para o ano de 2030 ultrapassam o primeiro trilhão de dólares (3-5).

À parte das necessidades médicas e políticas de saúde pública, cada vez mais se faz necessário o conhecimento concreto e profundo dos processos biológicos que compõem, por exemplo, a doença arterial coronariana (DAC) e a doença cerebrovascular, que apresentam em comum um processo inflamatório anterior, conhecido como aterosclerose (6).

Por muitos anos pensou-se que a aterosclerose tratava-se apenas de um depósito passivo de lipídeos na parede de vasos sanguíneos. Contudo, pesquisas conduzidas nas últimas décadas mostram que a aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, mediada por lipídeos, especialmente as lipoproteínas de baixa densidade (LDLs), e leucócitos (7-9). Também é um erro pensar que aterosclerose envolve apenas desbalanço lipídico. Estilo de vida, idade, fatores hereditários e comorbidades fazem parte de uma

complexa rede de fatores capazes de alterar diversos sistemas do organismo, gerando inflamação, hipercolesterolemia e hipertensão. Com isso, a aterosclerose desenvolve-se e pode causar infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral, quando há oclusão de vasos que oxigenam o coração ou cérebro, respectivamente (1,7,10).

O processo-chave iniciador da aterogênese é a retenção e acúmulo de partículas de LDL na íntima arterial, principalmente em locais de estresse hemodinâmico. Nesses sítios, a apolipoproteína B100 (ApoB100, porção protéica da partícula de LDL) associa-se aos proteoglicanos da matriz extracelular através de ligações iônicas e sofre modificações oxidativas causadas por enzimas, como mieloperoxidases e lipoxigenases, ou por reativos intermediários do oxigênio (11). É importante salientar que esse LDL oxidado não compõe apenas um tipo definido de molécula, mas todo um espectro de partículas de LDL que sofreram modificações físico-químicas diversas e são imunogênicas (12,13).

Essa deposição lipídica e possivelmente o próprio fluxo sanguíneo mais turbulento em áreas de ramificação dos vasos levam à injúria, ativação e disfunção do endotélio (14). Dessa forma, moléculas de adesão como E-selectina e, principalmente, a molécula-1 de adesão celular à vasculatura (VCAM-1) passam a ser expressas na superfície das células endoteliais (15,16). Concomitantemente, ocorre a liberação de quimiocinas e o consequente recrutamento de células da resposta imunológica para o interior da íntima arterial (17,18).

No ateroma em desenvolvimento as quimiocinas CCL2, CX₃CL1 e CCL8 são importantes no recrutamento de monócitos para as lesões (19), sendo que a neutralização da ligação dessas quimiocinas a seus receptores quase elimina a aterosclerose em

modelos experimentais (20,21). Monócitos recém-infiltrados na íntima arterial sofrem ação do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) produzido por células endoteliais ativadas e células musculares lisas (7,22) e se diferenciam em macrófagos, as células mais abundantes em lesões humanas (23).

Diversos trabalhos demonstram que os monócitos circulantes apresentam expressão diferencial da molécula CD16 (24). Dessa forma, os monócitos apresentam grande plasticidade, e dependendo do local e estímulos sob os quais se diferenciam podem originar populações com características e funções distintas (24). Estudos recentes têm demonstrado a existência de pelo menos duas subpopulações distintas de macrófagos, M1 e M2, que podem afetar de diferentes formas a resposta imune (25,26).

Macrófagos M1 são induzidos pela presença de IFN- γ ou em conjunto com estímulos microbianos (LPS) ou fatores de crescimento como o GM-CSF e têm sua diferenciação inibida pela presença de IL-4 e IL-13 (25-27). São também caracterizados pela alta expressão de CD11c, TLR2, TLR4, CCR7, MHC de classe II, CD80 e CD86, além de produzirem grandes quantidades de citocinas e quimiocinas como a IL-12, IL-23, CCL2, CCL5, CXCL8 e baixa produção de IL-10. Além disso, são eficientes produtores de IL-1 β , TNF- α e IL-6, induzem a diferenciação de células Th1 e participam de processos relacionados à resistência contra patógenos intracelulares e resposta a tumores (25,26,28).

As células M2, por sua vez, são induzidas sob estímulo de M-CSF ou na presença de citocinas como a IL-4, IL-10, IL-13, glucocorticóides e vitamina D3. Macrófagos M2 podem ser subdivididos de acordo com a citocina presente em sua diferenciação: M2a, induzidos

por IL-4 ou IL-13; M2b, induzidos por complexos imunes, agonistas de TLRs e M2c, induzidos na presença de IL-10 e hormônios glicocorticóides. Fenotipicamente, os macrófagos M2 apresentam em sua superfície as moléculas CD206 (receptor para manose), CD301, CD163 e baixa expressão de MHC de classe II, CD80 e CD86. Esses macrófagos produzem pouca IL-12 e IL-23, mas apresentam alta produção de IL-10 e arginase-1. São capazes de promover a resposta Th2 e induzir resposta contra parasitas. As células M2 estão presentes em tumores estabelecidos e auxiliam na sua progressão sendo por isso a elas atribuída funções regulatórias (25,26,28).

O desequilíbrio entre as diferentes populações de macrófagos pode ser associado a várias patologias, inclusive a aterosclerose. Em camundongos ApoE^{-/-} foi observado maior número de células M2 nas lesões recentes, enquanto que no infiltrado de animais mais velhos predominava a população M1 (29). Na aterosclerose coronariana foi observada abundância de macrófagos M1 e número reduzido de células M2 no tecido adiposo do epicárdio (30). Ambos os estudos sugerem a associação entre a progressão da lesão e a predominância do perfil M1 sobre o M2.

Uma vez na íntima arterial, os monócitos diferenciados em macrófagos passam a expressar uma variedade de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) – receptores *scavenger*, receptores do tipo *Toll* (TLRs) e receptores *Nucleotide-binding Domain and Leucine-rich Repeat Containing (receptors)* (NLRs) – importantes para o início da resposta imune inata (31).

Os receptores do tipo *Scavenger* - incluem CD36, CD68, CXCL16, LOX-1 (*lectin-type oxidized low-density lipoprotein receptor-1*), receptor *scavenger A* (SR-A) e SR-B1 -

reconhecem epítomos oxidados específicos da LDLox e medeiam a captura e internalização dessas moléculas (8,31). O reconhecimento por esses receptores não gera inflamação diretamente, mas pode desencadear apresentação antigênica via MHC classe II (6), acúmulo de partículas de LDL colesterol no citoplasma e promover o desenvolvimento do principal grupo celular presente em lesões de ateroma, a célula espumosa (23). Em outros casos, esse acúmulo lipídico leva a apoptose, contribuindo para a formação do core necrótico (6,7). Entretanto, a importância desses sensores no desenvolvimento da lesão aterosclerótica ainda não está bem estabelecida, uma vez que a ausência de SR-A e CD36, em modelo experimental de ateroma, reduz a complexidade das lesões formadas sem afetar a formação de células espumosas (32).

Os TLRs são PRRs transmembrânicos que, após ligação ao agonista, geram resposta inflamatória diretamente por ativação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) e vias de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (31,33,34). Como consequência ocorre expressão de diversos genes codificadores de moléculas pró-inflamatórias, incluindo citocinas (IL-1, TNF- α , IL-12, IL-6), quimiocinas (CCL2, CCL5 e CXCL10), eicosanoides (LTB₄), proteases (colagenases, catepsinas, elastases), oxidases e moléculas coestimulatórias (CD80, CD86, CD40) (31,33). TLR2 e TLR4 parecem ter maior importância na aterogênese e são expressos em macrófagos, células endoteliais e células musculares (33,35). Trabalhos experimentais mostram que camundongos ApoE^{-/-} apresentam aumento da expressão de TLR4 na lesão (36) e de TLR2 em locais de stress hemodinâmico (37). Os TLRs também podem reconhecer os chamados padrões moleculares associados à injúria (DAMPs) como, por exemplo, produtos de stress tecidual,

degradação de matriz extracelular ou células mortas, encontrados em locais de inflamação (31). A proteína de choque térmico 60 (HSP60), liberada por células necróticas, é um DAMP encontrado em placas ateroscleróticas capaz de ativar TLR2 e TLR4 (38). Entretanto, o ligante endógeno com papel preponderante na aterogênese é a partícula de LDL modificada (39) cujo reconhecimento é mediado por TLR4 (40). Em trabalho anterior, nosso grupo mostrou que essa molécula promove ativação de células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) e consequente liberação de mediadores inflamatórios como IFN- γ , CCL2 e CCL8 (41).

Proteínas NLRs são citosólicas e estão envolvidas na ativação de NF- κ B, processamento de caspase-1 e liberação das citocinas IL-1 β e IL-18, morte celular por piroptose e regulação da sinalização de vias inflamatórias e transcrição do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) (42-44). Até o momento foram descritos 22 NLRs em humanos, divididos em quatro subfamílias com base na porção N-terminal, requerida para a transdução de sinal: NLRP, com domínio pirina; NLRC, com domínio recrutador e ativador de caspase (CARD); NLRB, com domínio de baculovírus inibidor de apoptose (BIR) e NLRA, com domínio ácido de transativação (45)

Os membros dessa família de receptores compartilham um domínio central (NACHT) envolvido na oligomerização (42,43,45). Proteínas NLR pertencem à família de ATPases transdutoras de sinal com múltiplos domínios (STAND) e NACHT representa o domínio ATPase. A presença do ADP indica o estado inativo da molécula, que após reconhecimento do ligante sofre uma mudança conformacional que permite a troca do

ADP por um ATP. Como consequência, a proteína se oligomeriza, forma homodímeros (na maioria dos casos) e é capaz de recrutar outras proteínas, como RIP2 ou ASC (42,43,45).

O domínio C-terminal rico em leucina (LRR), importante na ativação do receptor, também é comum a todos os NLRs (NLRP10 é a única exceção e não possui LRR) (42,43,45). Até recentemente não existiam estudos comprovando a interação direta dos NLRs a seus ligantes, como sabidamente acontece, por exemplo, com TLRs (46). Contudo, achados recentes obtidos a partir de EMSA (*Eletroforetic Mobility Shift Assay*) mostraram que o domínio LRR de NLRX1 liga-se diretamente a ssRNA e dsRNA (47). Análises bioquímicas e de cristalização de proteína também têm mostrado que flagelina e componentes do sistema de secreção III de bactérias (T3SSs) também são reconhecidos diretamente por NAIP (48-50). Além disso, existem fortes indícios da ligação direta de NLRC1 e NLRC2 com seus agonistas, mas algumas outras investigações ainda devem ser feitas (51,52).

Os primeiros membros da família dos NLRs identificados e caracterizados foram NLRC1 (NOD1) e NLRC2 (NOD2). Esses receptores ativam respostas inflamatórias via NF- κ B e MAPKS após o reconhecimento de fragmentos de peptidoglicano da parede de bactérias (53). Fragmentos de peptidoglicanos contendo ácido diaminopimélico (DAP) encontrado em bactérias Gram-negativas (54) e algumas Gram-positivas como *Listeria* spp. e *Bacillus* spp. (55,56) ativam NLRC1. Por outro lado, NLRC2 responde ao muramildipeptídeo (MDP) encontrado em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e micobactérias (57).

Alguns membros da família dos NLRs estão envolvidos na formação de um complexo multiprotéico denominado inflamassoma. Ativado na presença de diversos tipos de ligantes, desde PAMPs até produtos endógenos e partículas cristalizadas, o inflamassoma é capaz de recrutar caspase-1, que cliva pró-IL-1 β e pró-IL-18 nas formas biologicamente ativas (58-63). Os NLRs atualmente associados com a formação do inflamassoma são NLRP1, 3, 6, 12, NLRC4 e NAIP, sendo esses dois últimos constituintes de um único inflamassoma (58-61). AIM2 (proteína AIM2 induzida pelo interferon) não compõe a família NLR, mas também forma inflamassoma e recruta caspase-1. Sabe-se que o AIM2 está envolvido no reconhecimento de DNA viral e de bactérias intracelulares (64,65).

O inflamassoma mais estudado e caracterizado é o formado pelo NLRP3. Trabalhos mostram que diferentes estímulos podem ativá-lo, tais como: componentes microbianos (LPS, MDP, RNA bacteriano, RNA de dupla hélice análogo ao poli (I:C), sinais de perigo endógeno (ATP e hialurona), materiais cristalizados (cristais de urato monossódio e cristais de pirofosfato de sódio, alguns poluentes ambientais (asbestos e partículas de sílica) e peptídeos (amilóide- β) (66-75). A ativação do NLRP3 ainda é controversa, contudo, são propostos três mecanismos para explicá-la: 1) geração de reativos intermediários de oxigênio (ROS) na célula; 2) formação de canais de potássio e efluxo desse íon e 3) desestabilização do fagolisossomo e liberação de mediadores endógenos, como a catepsina B (76-80).

Algumas evidências da literatura sugerem que a presença de NLRs, formação do inflamassoma e, por conseguinte maturação de IL-1 β e IL-18 podem ter um papel na

patogênese da aterosclerose. Trabalhos experimentais mostraram que camundongos ApoE^{-/-}IL-1β^{-/-} apresentam lesões ateroscleróticas menores quando comparados ao grupo controle e que animais ApoE^{-/-} IL1Ra^{-/-} (deficiente no antagonista do receptor de IL-1) têm maior área de lesão e deposição lipídica (81,82). Lesões mais graves e com desenvolvimento acelerado também já foram detectadas em camundongos ApoE^{-/-} com expressão aumentada de IL-18 ou tratados com IL-18 recombinante (83,84).

Estudos em lesões humanas também são abundantes. Dados de nosso e de outros grupos detectaram RNAm e proteína da IL-1β (41,85) e alguns polimorfismos do gene para o IL-1Ra estão fundamentalmente associados com doença coronariana (86). Além disso, IL-18 e IL-18R foram detectados em células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos de lesões ateroscleróticas humanas (87), sendo que a concentração sérica de IL-18 mostrou ser um fator preditivo de morte em pacientes com doença coronariana (88).

Ainda que muito já tenha sido investigado, evidências diretas do envolvimento dos diferentes NLRs na aterosclerose são menos numerosas. Opitz *et. al.* (89) mostraram que células endoteliais humanas produzem CXCL8 após reconhecimento da bactéria *Chlamydomphila pneumoniae* via NLRC1. A presença da proteína de NLRC2 em células inflamatórias infiltradas e grande quantidade de catepsina B em segmentos instáveis do ateroma também já foram documentadas (90,91).

Os mecanismos da imunidade inata, dentre eles os controlados pela ativação dos NLRs, são importantes para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Na aterosclerose o recrutamento de diferentes subtipos de linfócitos TCD4⁺ ocorre

paralelamente aos monócitos e é regulado pela produção de CXCL9, CXCL10, CXCL11 e CCL11 (17,92). Trabalhos de nosso grupo e de outros mostraram a presença de linfócitos T_H2, T_H17, T-regulatórios e o subtipo mais relacionado às complicações do ateroma, as células T_H1 (41,92-95).

Células musculares lisas também participam do processo de desenvolvimento e ruptura da placa aterosclerótica. A migração dessas células promove a formação da capa fibrosa de espessura variável. A constante produção de citocinas, proteases, moléculas pró-trombóticas e substâncias vasoativas provocam, dentre outros efeitos deletérios, destruição da matriz existente, menor produção de colágeno por células musculares lisas e inibição da sua proliferação (1,96,97). A apoptose de células musculares lisas promove a desestabilização das lesões, expondo o material necrótico e pró-coagulantes que causam agregação plaquetária e trombose. Finalmente, o trombo formado pode ocluir o lúmen da artéria causando isquemia (1,96,97). É interessante comentar, que a literatura recente mostra que a placa aterosclerótica cresce em “saltos”, com sucessivas rupturas e formação de trombos, até atingir a estenose crítica. Sendo assim, inflamação e trombose são os responsáveis pelos sintomas observados (96,97).

Vários trabalhos procuram identificar novas drogas que possam prevenir o processo inflamatório nos estágios mais precoces de desenvolvimento da lesão. Estudo de nosso grupo mostrou que a inclusão da droga pentoxifilina no protocolo de tratamento de pacientes com eventos coronarianos elevou a concentração sérica da citocina anti-inflamatória TGF- β e reduziu a mortalidade por eventos cardiovasculares (98). Outros trabalhos mostraram que inibidores do NF- κ B também têm um papel na redução da

atividade inflamatória no ateroma. Entre eles, a Partenolida, sesquiterpeno lactona isolado de extratos vegetais de *Tanacetum parthenum*, promove a redução de lesões em camundongos ApoE^{-/-} pela diminuição da ativação do fator NF-κB, da produção da quimiocina CCL2 e consequente diminuição da quantidade de macrófagos infiltrantes (99). Outro inibidor de NF-κB, Bay 11-7082, inibe a produção de ciclooxigenase 2 (COX-2) e metaloproteinase-9 em células THP-1 estimuladas com citocinas inflamatórias (100). Recentemente, Juliana *et al* (101) mostraram que Partenolida e Bay 11-7082 promovem a inibição de múltiplos inflamassomas e do NLRP3, respectivamente.

A presença de IL-1β e IL-18 em lesões ateroscleróticas (41,81,82,84-88) e o importante papel dessas citocinas na ativação endotelial e na polarização para a resposta T_H1(1,7,96), constitui indício indireto do envolvimento dos NLRs na patogênese da doença. Além disso, alguns trabalhos mostraram o envolvimento direto de algumas proteínas relacionadas com os NLRs, como a proteína adaptadora ASC, a catepsina B e o próprio NLRC1 (89-91,102) na patogênese da aterosclerose. Entretanto, ainda é necessária uma investigação mais aprofundada do papel dos NLRs na aterosclerose. Certamente, a melhor compreensão do processo inflamatório que envolve os NLRs pode auxiliar na identificação de novos alvos terapêuticos.

2. Objetivos



2.1. Objetivo geral

Investigar a presença de NLRs e moléculas relacionadas a esses receptores em placas ateroscleróticas humanas e o papel dos cristais de colesterol na ativação do inflamassoma NLRP3 e consequente produção de IL-1 β por monócitos e macrófagos. Além disso, investigar o papel da IL-1 β sobre a produção de mediadores inflamatórios por células que compõem a lesão aterosclerótica.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar a expressão do RNAm e da proteína NLRC1, NLRC2, NLRC3, NLRC4 e NLRC5, NLRP1 e NLRP3, NAIP, AIM2, caspase-1, proteína adaptadora ASC e IL-1 β em lesões ateroscleróticas humanas provenientes de indivíduos submetidos à endarterectomia.

Avaliar o papel de cristais de colesterol na ativação dos inflamassomas formados por NLRP3 em monócitos do sangue periférico, macrófagos humanos derivados de monócitos do sangue periférico e em células da linhagem monocítica THP-1.

Verificar o papel dos inibidores farmacológicos na inibição da produção de IL-1 β (ativação do inflamassoma NLRP3) em células THP-1 após o estímulo com cristais de colesterol.

Avaliar a atividade da IL-1 β na produção de mediadores inflamatórios e proteases por células musculares lisas e células endoteliais.

3. Material e Métodos



3.1. Casuística

Para a realização dos ensaios de qRT-PCR e imuno-histoquímica (IHQ), foram utilizadas placas ateroscleróticas de pacientes com diagnóstico de estenose crítica de carótida (> de 70%), atendidos no ambulatório de Cirurgia Vascular do Hospital de Clínicas da UNICAMP e submetidos à cirurgia de endarterectomia. Lesões de ateroma remanescentes de estudo anterior (41) e outras coletadas posteriormente, ao longo dos últimos dois anos, foram incluídas no estudo, totalizando 64 amostras. Dessas, 17 foram utilizadas tanto para estudo da expressão gênica quanto para a pesquisa da proteína (IHQ). 33 amostras foram usadas apenas para análise do RNAm (n=50) e outras 13 empregadas apenas na IHQ (n=30). Além disso, 3 amostras obtidas de doadores de órgãos foram utilizadas como controle.

Para a análise dos resultados, os pacientes foram classificados e divididos em sintomáticos e assintomáticos, de acordo com a presença ou não de sintomas cerebrovasculares como ocorrência de AVC, episódio isquêmico transitório ou amaurose fugaz ipsilateral (5), no período de seis meses anteriormente à cirurgia. Além disso, os pacientes foram agrupados considerando a presença/ausência de fatores de risco para desenvolvimento de doença aterosclerótica, como gênero, tabagismo e hipertensão. Como controle foram analisados fragmentos de artéria carótida proveniente de três doadores de órgãos.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Parecer CEP N° 1028/2010) e todos os pacientes incluídos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

3. 2. Obtenção e estocagem das lesões ateroscleróticas

Os pacientes 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, resumidamente descrita como cervicotomia longitudinal, dissecação e reparo das artérias, heparinização sistêmica, descolamento da placa aterosclerótica (endarterectomia carotídea), rafia da artéria e síntese dos planos cirúrgicos (103).

Lesões ateroscleróticas designadas para estudo da expressão de genes (RT-PCR em tempo real) relacionados à ativação e função dos NLRs, foram acondicionadas em tubo cônico tipo Falcon contendo 4mL de solução RNAlater (Ambion, Life Technologies), incubadas *overnight* a 4 °C (para absorção do reagente) e acondicionadas a -80 °C até o momento do processamento. Placas ateroscleróticas designadas para pesquisa de proteínas pelo método de imuno-histoquímica foram acondicionadas em tubo cônico tipo Falcon contendo 25 mL de formol 4% com posterior inclusão em parafina.

3. 3. Avaliação da expressão de genes relacionados aos NLRs por qRT-PCR e validação dos resultados

Extração do RNA total

As amostras de lesão estocadas a -80 °C foram descongeladas e o excesso de *RNAlater* retirado com papel absorvente estéril. A cada amostra foi adicionado 4 mL de Reagente Tri (Invitrogen, Life Technologies) e o tecido dissociado com o uso de homogeneizador (Powergen 125, Fisher Scientifics). Cada homogeneizado foi centrifugado

(15 minutos, 4 °C, 12.000g) e, para cada 1 mL de sobrenadante coletado, adicionou-se 300 µL de clorofórmio. Após incubação em gelo por 10 minutos, as amostras foram centrifugadas e a fase aquosa transferida para outros tubos, aos quais foi adicionado igual volume de álcool isopropílico gelado e 2,4 µL de Poliacrilamida Linear (LPA, 20 µg/µL) (Ambion, Life Technologies), seguindo incubação de 50 minutos a -20 °C. Posteriormente, após centrifugação, o *pellet* contendo o RNA foi lavado (12000 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente) com 800 µL de etanol 75% gelado e depois ressuspenso em 35 µL de tampão TE. A concentração do RNA foi estimada por meio da leitura das amostras em espectrofotômetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific). A pureza do ácido nucleico obtido foi inferida pela razão entre as absorvâncias obtidas a 260 nm e 280 nm, que deveria estar próxima de 2. As amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento do uso.

Síntese de cDNA

Inicialmente as amostras de RNA foram tratadas para remoção de possíveis cadeias de DNA genômico contaminante. Para tanto, 1 µg de RNA total foi diluído em água DEPC em um volume final de 25,7 µL e acrescentados 3,97 µL de um *mix* contendo tampão 10x concentrado e 1 unidade de DNase (Ambion, Life Technologies). As amostras foram incubadas a 37 °C durante 30 minutos para ativação da enzima e remoção das cadeias contaminantes de DNA. Depois foram adicionados 0,3 µL de EDTA (0,5M pH 8.0) a cada tubo, seguido de nova incubação a 75 °C por 10 minutos, para interrupção da atividade enzimática da DNase.

Para a síntese do cDNA, a cada RNA tratado foi adicionado 2 μL de um oligonucleotídeo iniciador contendo oligo dT₁₆ [0,75 μg] + *primers* randômicos [3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$] (Invitrogen, Life Technologies). As misturas foram submetidas ao aquecimento a 70°C por 10 minutos e resfriadas rapidamente em gelo. A seguir, foram adicionados 18 μL de um *mix* composto por tampão de síntese 5x, 10mM de dNTP, 0,1M de DTT e 200U/ μL Superscript R/T II (Invitrogen, Life Technologies). As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos e, a seguir, a 40 °C por 50 minutos. A atividade enzimática foi interrompida pela incubação a 90 °C por 5 minutos, seguido por incubação a 4 °C por 5 minutos. A quantidade de cDNA foi estimada por meio da leitura das amostras em espectrofotômetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific) e armazenadas a -80 °C até o momento do uso.

Protocolo de qRT-PCR

A reação de qRT-PCR foi realizado em equipamento de análise em tempo real StepOne (Applied Biosystems, Life Technologies) utilizando metodologia com corante intercalante SybrGreen® (Applied Biosystems, Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os *primers* foram desenhados com auxílio do programa PrimerExpress (Applied Biosystems, Life Technologies). Resumidamente, em cavidades de placas de 48 poços foram adicionados 3 μL de cDNA (100 ng/ μL) ou de água tratada com DEPC (controle negativo), 1 μL do *primer sense* e 1 μL do *primer anti-sense* previamente diluídos na concentração de 80 pM/reação (Tabela I) e 5 μL do reagente *master mix* (Absolute SYBRGreen RT-PCR mix, Applied Biosystems, Life Technologies). A placa

contendo as amostras foi submetida à reação de PCR em tempo real com 40 ciclos de amplificação a 95 °C por 15 segundos, seguido de um período de anelamento/extensão a 60 °C por 1 minuto. A avaliação da especificidade dos *primers* foi feita pela análise da curva de *Melt* (aquecimento gradual da amostra amplificada de 60 °C a 95 °C, com incremento de 0,3 °C) na qual é possível observar a dissociação dos produtos de amplificação e a formação de apenas um *amplicon*.

Os resultados foram analisados quanto à expressão do gene de interesse de cada amostra, utilizando como gene normalizador o YWHAZ e como amostra de referência o cDNA obtido a partir do pool das amostras de cDNA das lesões. Os resultados foram expressos como concentração relativa calculada conforme descrito por Pfaffl (2001) (104) utilizando as eficiências de amplificação de cada *primer*, conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Expressão relativa} = \frac{(E_{\text{gene alvo}})^{\Delta\text{Ct}_{\text{gene alvo}}}}{(E_{\text{gene referência}})^{\Delta\text{Ct}_{\text{gene referência}}}}$$

Onde, $E_{\text{gene alvo}}$ é a eficiência de amplificação da reação com o *primer* de interesse; $E_{\text{gene referência}}$ é a eficiência de amplificação da reação com o *primer* do gene normalizador; $\Delta\text{Ct}_{\text{gene alvo}}$ é igual ao valor de Ct de uma amostra controle amplificada com o *primer* do gene de interesse (pool de cDNA de placas de ateroma para o *primer* avaliado) subtraído do Ct de amostra para o mesmo gene; $\Delta\text{Ct}_{\text{gene referência}}$ é igual ao valor de Ct de uma amostra controle amplificada com o *primer* do gene normalizador (pool de cDNA de placas de ateroma para o *primer* YWHAZ) menos o Ct de amostra para o mesmo gene.

Tabela I: Sequência dos *primers* utilizados na reação de qRT-PCR.

GENE	SEQUÊNCIA SENSE 5' → 3'	SEQUÊNCIA ANTISENSE 5' → 3'
YWHAZ	ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA	CCGCCAGGACAAACCAAGTAT
NLRC1	GGGCCACAGTGAGATGGAA	TCCCGATTGCTTTTCAGTAATTG
NLRC2	TCTTCACTGCGAGCAATTGC	GCCTCAATGCCAAGAAGTTCTG
NLRC3	CTTCACCTGCAGTGGAATTCA	GGCGTTCTCTGTAAATCTAAGCT
NLRC4	TCTGTGATCAACTCCTGGATATACCT	CCTCTGCCGAGCTTCAG
NLRC5	CAGCAGACAGGCTATGCTTTCA	TGTACCCAGCGGGAATGG
NLRP1	CGCTGAGCTCATCGAAAA	CAGCCGCTCTGGCCTAGAC
NLRP2	TCATCTCCAGAGAGTGGTGTCA	CTCGAAGAGCTAGGCAGAGGTT
NLRP3	TGCCCCGTCTGGGTGAGA	CCGGTGCTCCTTGATGAGA
Naip	AATATGTTCAATCCCTCAAGTCATAG	TGTTTGTACGGACAGCAATCAAT
AIM2	TGCATCTGCAGCCATCAGA	CAGGCTTAACATGAGGAGAGACTTT
ASC	CCACCAACCAAGCAAGATG	GCCTGGAGGAGCAAGTCCTT
Caspase-1	TGCCTGTTCTGTGATGTG	CAGTTTCCTTATTTTAATGTCCTGGG
IL-1 β	CACGATGCACCTGTACGATCA	AGACATCACCAAGCTTTTTTGCT

Avaliação da integridade do RNA total obtido após extração

O RNA total extraído de algumas amostras de lesão aterosclerótica, conforme descrito acima, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 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 (figura 1).

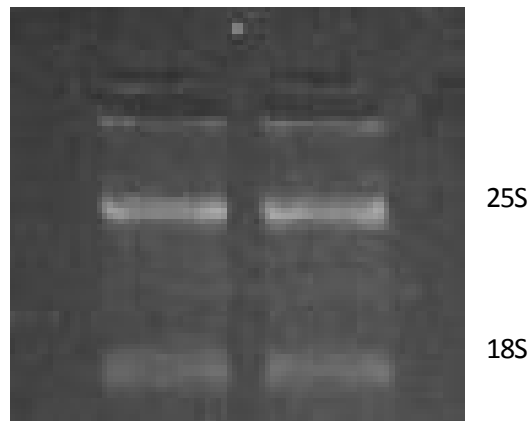


Figura 1. Bandas específicas de RNA em gel de agarose.

Avaliação da especificidade de amplificação dos *primers*

A avaliação da especificidade de cada primer utilizado é feita pela análise da curva de *Melting*, na qual é possível detectar a temperatura de dissociação da dupla fita de DNA dos produtos amplificados. A temperatura de *Melting* depende do tamanho e composição das bases nitrogenadas de cada produto, então, para cada gene analisado, deve existir apenas um pico, que representa a formação de apenas um produto de amplificação (Figura 2)

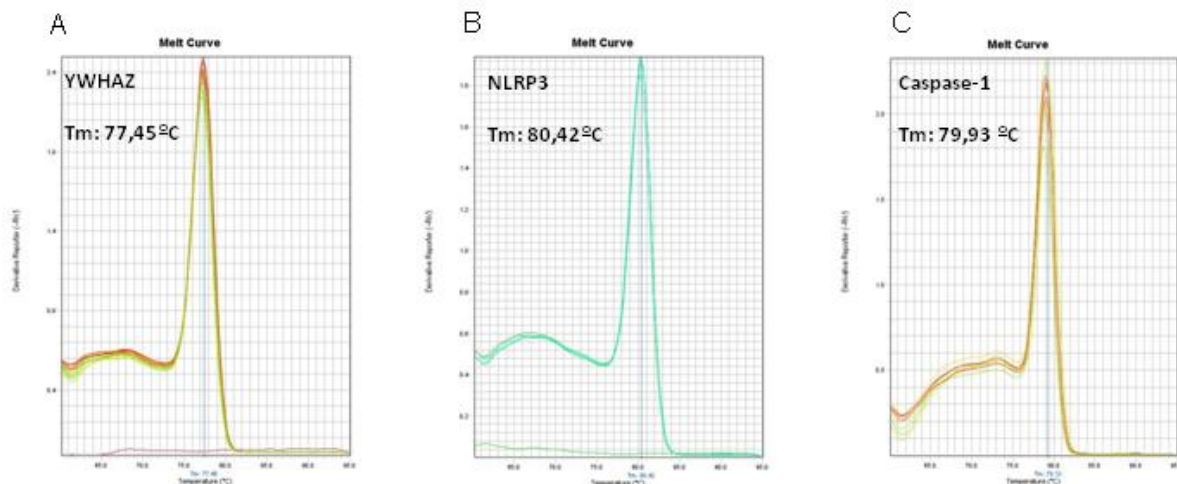


Figura 2. Curvas de *Melting* representativas da amplificação do cDNA. Curvas de *Melting* para YWHAZ (a), NLRP3 (b) e Caspase-1 (c). As reações utilizando os *primers* na concentração ideal são consideradas específicas, uma vez que todas as amostras testadas apresentam temperatura de *melting* (picos dos gráficos) muito semelhantes.

Avaliação da eficiência dos *primers*

A eficiência da reação de amplificação também foi determinada para cada gene analisado. Os testes foram realizados em triplicata utilizando amostras de cDNA na concentração inicial de 300ng/reação e diluídas de forma seriada na proporção 1:2, totalizando 5 pontos. Uma curva padrão pôde, então, ser elaborada e por meio dela calculou-se a eficiência (E) e a correlação entre os pontos da curva (R^2). Na figura 3 estão representadas as curvas de amplificação das amostras diluídas seriadamente (painéis à esquerda) e a curva padrão obtida (painéis à direita), com os respectivos valores de E e R^2 dos genes YWHAZ, NLRP3 e Caspase-1.

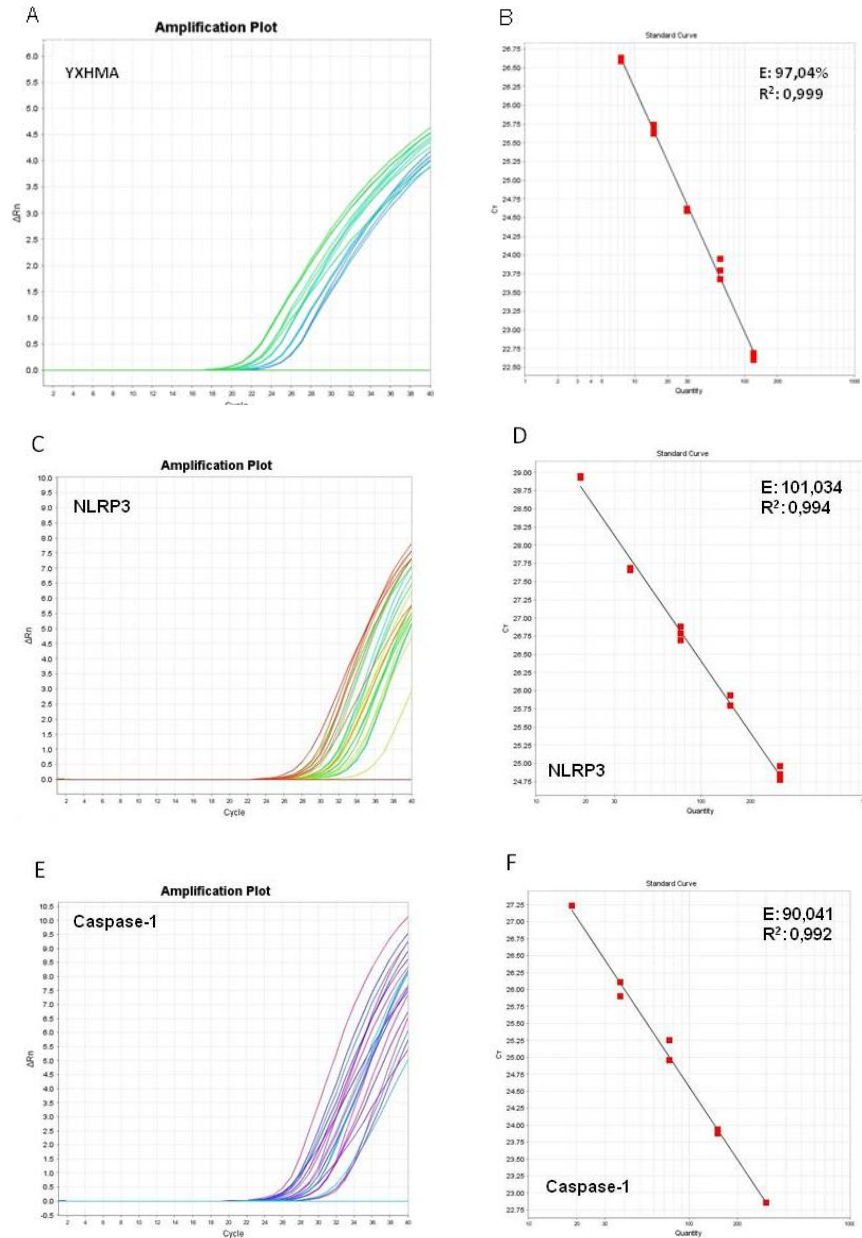


Figura 3. Amplificação e curva padrão de genes representativos, obtidas nos testes de padronização dos primers. Os painéis à esquerda representam curvas de amplificação dos genes YWHAZ (a), NLRP3 (c) e Caspase-1 (e) de acordo com a diluição das amostras. As diluições seriadas foram feitas na proporção 1:2, partindo de 300ng/reacção e totalizando 5 pontos. As curvas padrão respectivas (painéis à direita- YWHAZ [b], NLRP3 [d] e Caspase-1 [f]) foram geradas segundo a expressão das médias dos Cts em função da diluição da amostra. Os valores de E e R^2 da reacção estão destacados em cada gráfico.

A eficiência da reação 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 e são consideradas satisfatórias reações com eficiência entre 90 e 110%. Os valores de R^2 indicam a reprodutibilidade da pipetagem dos reagentes, sendo satisfatórios valores de R^2 de, no mínimo, 0.990. Sendo assim, todas as reações resultaram em valores dentro das faixas consideradas satisfatórias.

3.4. Avaliação da expressão de proteínas em fragmentos de lesões ateroscleróticas por imuno-histoquímica

Após inclusão em parafina e montagem das lâminas com cortes seriados de 4 μ m, as amostras foram desparafinizadas em xilol, reidratadas em série crescente de alcoóis e submetidas à recuperação antigênica com tampão específico para cada anticorpo (Citrato, pH 6.0 ou Tris-EDTA, pH 8.0) em panela de vapor a 95 °C, durante 45 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada com H_2O_2 10 volumes, seguido de incubação com reagente de bloqueio para proteínas. Após lavagem, as lâminas foram incubadas *overnight* com anticorpos primários específicos para AIM2, NLRP1, NLRC2, caspase-1, (Santa Cruz Biotechnology), NLRC3, NLRC5 e NLRP3 (LifeSpan BioSciences). Os anticorpos foram titulados a fim de otimizar a marcação e evitar ligações inespecíficas (dados não mostrados). Após o tempo de incubação, os cortes foram lavados e a revelação realizada com o kit MACH4 (Biocare Medical) conforme instruções do fabricante. Nesse processo os cortes foram incubados com o reagente pós-primário, lavados e incubados com o

anticorpo secundário conjugado a um polímero. As marcações foram reveladas com a utilização do substrato cromógeno 3,3'- diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich). Ao final da marcação, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris, desidratadas e montadas com Entellan (Sigma-Aldrich). Marcações positivas foram identificadas pela presença de coloração marrom e a análise quantitativa realizada com o programa GSA Image Analyser (GSA Software Development and Analytics)

3.5. Cultura e estimulação de monócitos e macrófagos para determinação da produção de IL-1 β

Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSPs)

Amostras de sangue periférico (100mL) de doadores saudáveis (idade entre 20 – 40 anos, sem fatores de risco para desenvolvimento de doença aterosclerótica) foram coletadas em tubos heparinizados e transferidas para tubos cônicos de 15 mL contendo 4 mL de Ficoll-Hypaque (GE HealthCare). Após centrifugação (400 g, 30 minutos, temperatura ambiente) o anel de CMSPs foi coletado, as células transferidas para tubos cônicos de 15 mL e lavadas duas vezes com meio RPMI (300 g, 10 minutos, 4 °C). Finalmente, as células foram resuspendidas em meio RPMI suplementado (soro bovino fetal 10% + L-glutamina [2mM] + gentamicina [5 μ g/mL]) e o número e viabilidade determinados com auxílio de Câmara de Neubauer e Azul de Tripán. As CMSPs obtidas foram utilizadas para experimentos de estimulação em cultura e para diferenciação de macrófagos humanos.

Separação de monócitos por seleção imunomagnética positiva

A purificação dos monócitos a partir de CMSPs foi feita com o kit de seleção imunomagnética positiva Monocyte Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) de acordo com as especificações do fabricante. Brevemente, CMSPs foram ressuspensas a uma concentração de 1×10^7 células/mL em tampão de separação PBS-B-E (PBS-BSA-EDTA) e incubadas (10 minutos a 4 °C) com uma mistura de anticorpos biotinizados anti-CD3 (linfócitos T), anti-CD7 (linfócitos T), anti-CD16 (neutrófilos e células NK), anti-CD19 (linfócitos B), anti-CD56 (células NK), anti-CD123 (células dendríticas e basófilos) e anti-CD235a (Glicoforina A, eritrócitos). Dessa forma, todas as células do sangue periférico foram marcadas, exceto os monócitos ($CD14^+$). Adicionou-se, então, anticorpo anti-biotina acoplado a esferas magnéticas, seguido de incubação por 15 minutos a 4 °C. Após lavagem com PBS-B-E (300 g, 10 minutos, 4 °C), as células foram ressuspensas no mesmo tampão e passadas em colunas de separação magnética LD (Miltenyi Biotec). A fração não retida pela coluna, correspondente aos monócitos, foi coletada, centrifugada, ressuspensa em meio RPMI 1640 suplementado e utilizadas em ensaios de estimulação antigênica e diferenciação em macrófagos. O resultado da separação foi avaliado por meio de citometria de fluxo, obtendo-se pureza entre 93% e 97%.

Diferenciação e caracterização de macrófagos a partir de monócitos do sangue periférico

Células $CD14^+$ (monócitos) foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado em placas de cultura de 24 poços ($0,5 \times 10^6$ células/mL) e incubadas em estufa (37 °C, 5% de CO_2) por 5 dias na presença de 50 ng/mL de GM-CSF (Peprotec) ou 100 ng/mL de M-CSF

(Peprotec) para diferenciação em macrófagos M1 ou M2, respectivamente. As citocinas foram adicionadas no primeiro dia de cultura, com suplementação adicional nas mesmas concentrações, no terceiro dia. Após a diferenciação, os macrófagos obtidos foram caracterizados por citometria de fluxo e utilizados em experimentos de estimulação para avaliação da produção de IL-1 β .

Diferenciação de subpopulações de macrófagos a partir de células da linhagem monocítica THP-1

Células da linhagem monocítica THP-1 foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado (10% de soro bovino fetal + L-glutamina [2mM] + penicilina/estreptomicina [5 μ g/mL]) em placas de cultura de 24 poços (0,25x10⁶ células/mL), na presença de PMA. No dia seguinte, as células foram lavadas duas vezes com meio RPMI 1640 e diferenciadas em quatro populações diferentes de macrófagos denominadas THP/M ϕ , M1, M2a e M2c. Para tal, as células foram incubadas por 48 horas (37 °C, 5% CO₂) na ausência de estímulos (THP/M ϕ) ou na presença de 20ng/mL LPS + 20 ng/mL IFN- γ (M1) ou 20 ng/mL IL-4 (M2a) ou 20 ng/mL IL-10 (M2c). As populações celulares obtidas foram caracterizadas quanto à produção de citocinas e utilizadas para experimentos de estimulação e avaliação da produção de IL-1 β .

Estimulação de monócitos, macrófagos M1 e M2 derivados de monócitos e macrófagos

THP/M ϕ , M1, M2a e M2c derivados de células THP-1

Para avaliar a produção diferencial de IL-1 β pelos diversos tipos celulares obtidos, monócitos do sangue periférico (1×10^6 células/mL), macrófagos derivados de monócitos ($0,5 \times 10^6$ cél/mL) e macrófagos derivados de células THP-1 ($0,25 \times 10^6$ cél/mL) foram cultivadas em meio RPMI suplementado em placas de 24 cavidades. As células foram estimuladas por 8 horas na presença de LPS (20 ng/mL), cristais de colesterol (2 mg/mL), LPS + cristais de colesterol ou apenas meio de cultura (controle) em estufa (37 °C, 5% CO₂). Após o tempo de incubação o sobrenadante de cultura foi coletado e armazenado a -80 °C até o momento do uso.

Preparação dos cristais de colesterol

Os cristais de colesterol foram preparados conforme protocolo adaptado de *Flynn et al.* (1979) (105). Brevemente, colesterol puro (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em etanol 95% e a mistura foi aquecida até 60 °C. Após filtração a vácuo procedeu-se incubação *overnight*, à temperatura ambiente, para a cristalização do colesterol. Os cristais formados foram coletados e após recristalização, foram submetidos à secagem de 15 horas. O material obtido foi pesado, autoclavado, pulverizado com auxílio de cadinho e armazenado a -20 °C até o momento do uso. Para utilização em cultura, os cristais foram ressuspendidos em meio RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies) na concentração de 2 mg/mL. A presença de endotoxina foi verificada com o kit Limulus Amebocyte Lysate (Cap Code)

Efeito de inibidores das vias de ativação do NLRP3 na estimulação de macrófagos provenientes de células THP-1 por cristais de colesterol

Macrófagos provenientes de células THP-1 (THP/Mφ - $0,25 \times 10^6$ células/mL), obtidos conforme descrito no item 3.5.5, foram submetidos à estimulação em cultura com LPS (20 ng/mL) ou LPS (20 ng/mL) e cristais de colesterol (2 mg/mL) na presença ou ausência de citocalasina D (2 μM), CA074 (20 μM), Bay-11-7082 (24 μM), Partenolida (20 μM), Bafilomicina A1 (20 μM), N-acetil-L-cisteína (20 μM) (Sigma-Aldrich) e Z-WEHD-FMK (inibidor de caspase-1; 10 μM; R&D Systems). Além dos controles positivos, nos quais não se adicionou nenhum inibidor, também foi feito um controle apenas com a adição de DMSO (solvente dos inibidores) à cultura. As células foram incubadas (37 °C e 5% CO₂) por 8 horas e o sobrenadante de cultura foi coletado e armazenado em freezer -80 °C até o momento do uso.

3.6. Cultura e estimulação de células musculares lisas de aorta humana (HVSMCs) e células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs)

Cultura de HVSMCs e HUVECs

Células musculares lisas de aorta humana (HVSMC - C-007-5C) e células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC - C-003-5C) foram obtidas comercialmente (Invitrogen, Life Technologies) e cultivadas de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, as células foram expandidas em garrafa de cultura de 75cm² e meio específico (meio 231 para HVSMC e meio 200 para HUVEC, ambos Invitrogen, Life Technologies). Após confluência, foram coletadas com uso de tripsina-EDTA/inibidor de tripsina

(Invitrogen), centrifugadas (170g, 4 °C, 10 minutos) e ressuspendidas em meio de cultura apropriado. Cada tipo celular foi repicado entre 5 e 7 vezes até o emprego em experimentos de estimulação.

Estimulação de HVSMCs e HUVECs com IL-1 β

HVSMCs e HUVECs foram semeadas em placas de cultura de 6 cavidades (3×10^4 células/mL) e, após atingirem 80% de confluência, foram lavadas e incubadas na presença ou ausência de 1ng/mL de IL-1 β recombinante (Peprotec) ou apenas meio específico. Após 24 horas de incubação (37°C, 5%CO₂) o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C até o momento do uso. O sobrenadante foi utilizado para detectar metaloproteinases (MMP1, MMP3 e MMP9), catepsinas (catepsina S e L) e quimiocinas (CCL2, CXCL8, CX3CL1, CXCL10, CXCL16 e CCL5) em ensaios de ELISA.

3.7. ELISA

Detecção de citocinas, quimiocinas e proteases

As amostras de sobrenadante de cultura obtidas foram testadas com o ensaio imunoenzimático do tipo sanduíche (kit *Duo Set*, R&D Systems), de acordo com as instruções do fabricante. 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 com PBS – Tween 20 0,05% e seguiu-se a adição de tampão de bloqueio PBS-BSA (PBS - BSA 1%) com incubação de 1 hora à temperatura ambiente. O procedimento de lavagem foi repetido e adicionaram-se as

amostras referentes à curva padrão (sete pontos) e as amostras-teste. Após incubação (2 horas à temperatura ambiente) as placas foram novamente lavadas e o anticorpo de detecção biotinilado foi adicionado com incubação por 2 horas, seguida de nova lavagem e adição do complexo estreptoavidina-peroxidase, seguindo de incubação (20 minutos à temperatura ambiente). As placas foram novamente lavadas e, adicionou-se o substrato/cromógeno (TMB [200 µg/mL] + H₂O₂ [0,03%]), diluído em tampão acetato de sódio/ácido acético 0,1M [pH 5,5]) e, finalmente, procedeu-se a última incubação (30 minutos, temperatura ambiente, abrigo da luz). A reação foi interrompida com a adição de H₂SO₄ 2N e as absorbâncias foram determinadas em leitor de ELISA (Labsystems Multiskan) a 450 nm.

3.8. Imunofluorescência e Citometria de fluxo

Monócitos obtidos após separação imunomagnética e macrófagos humanos derivados de monócitos foram submetidos à imunofluorescência. Para tal, 20µL da suspensão de células (aproximadamente 2×10^5 células) foram transferidos para placas de microtitulação (96 cavidades). Cada tipo celular foi caracterizado com um conjunto de anticorpos para marcação de superfície: anti-CD14 PE-Vy5, anti-CD68 Fitc, anti-CD11b APC-Cy7, anti-CD1a APC, anti-CD206 APC-Cy7, anti-CD163 PE-Cy5, anti-MHCII APC-Cy7, anti-CD80 APC e anti-CD86 PE. Os anticorpos foram diluídos em 20 µL de PBS-BSA (0,1%)-Azida sódica (0,2mM) (PBS-BSA-A), incubando-se por 20 minutos a 4 °C ao abrigo da luz. Após este período foram adicionados 150 µL de PBS-B-A, seguido de centrifugação (10 minutos, 1200 RPM, 4 °C). O sobrenadante foi desprezado e as células foram

ressuspendidas em vórtex, com posterior adição de 200 µL de tampão PBS-B-A e nova centrifugação (10 minutos, 1200 RPM, 4 °C). Então, as células foram novamente ressuspendidas, sendo adicionados 200 µL de formaldeído 2%, seguindo incubação à temperatura ambiente por 20 minutos. Após transferência das células fixadas, procedeu-se leitura em citômetro de fluxo (FACScanto/Becton & Dickson). A análise dos resultados foi feita em programa específico (DIVA/ Becton & Dickson), sendo analisada a porcentagem de células positivas e/ou a intensidade média de fluorescência (IMF) de cada marcador.

3. 9. Análise estatística

As diferenças entre dois grupos (controle vs. ateroma, sintomático vs. assintomático, hipertenso vs. normotenso, tabagista vs. não tabagista e homem vs. mulher) quanto aos parâmetros analisados foram avaliadas pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Para comparar duas variáveis contínuas (estímulos) em culturas de mesmo tipo celular, o teste t pareado foi aplicado. Para essa comparação em culturas de células diferentes, foi usado o teste t. Finalmente, a análise de três ou mais variáveis foi feita com o teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Foram consideradas significantes diferenças com valor de $p \leq 0,05$.

4. Resultados



4.1. Identificação de NLRs em amostras de lesões ateroscleróticas humana

Parâmetros clínicos dos pacientes submetidos à endarterectomia carotídea

Na tabela II estão relacionados os parâmetros clínicos e medicamentos usados pelos pacientes incluídos neste estudo. Foram coletadas amostras de 64 indivíduos, 49 homens e 15 mulheres, cuja média de idade foi de 68,2 anos. Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento da doença aterosclerótica, observou-se grande incidência de hipertensão arterial (77,8% do total de pacientes) seguido por dislipidemia (50,8%), *Diabetes Mellitus* (39,8%) e tabagismo (33,3%). Pacientes obesos (Índice de Massa Corpórea > 30 kg/m²) constituíam um grupo de apenas 6,4% de pacientes. As doenças prévias mais frequentes no grupo estudado foram acidente vascular cerebral e doença arterial periférica, que acometeram 67,8% e 30,6% de pacientes, respectivamente. Outras patologias foram menos frequentes. Quanto ao uso de medicamentos, podemos notar que a grande maioria dos pacientes fazia uso de estatina (83,6%) e aspirina (78,7%), além de inibidores da enzima conversora de angiotensina, β-bloqueadores, diurético, antagonista de cálcio e insulina.

Tabela II: Parâmetros clínicos e medicamentos usados pelos pacientes incluídos no estudo (n=64)

Parâmetro		%
Sintomatologia	Presente	53,1
	Ausente	46,9
Gênero	Masculino	76,6
	Feminino	23,4
Fatores de risco	Hipertensão arterial	77,8
	Dislipidemia	50,8
	Tabagismo	33,3
	Diabetes	33,8
	Obesidade	6,4
Patologias prévias	AVC	67,8
	Doença arterial periférica	30,6
	ICC	11,1
	AE	13,2
	AI	1,9
	Angioplastia	9,4
	Revascularização prévia	7,4
	IAM	16,3
Medicamentos	Estatina	83,6
	Aspirina	78,7
	IECA	64
	β -bloqueador	39
	Diurético	39,3
	Antagonista de cálcio	28,3
	Insulina	11,7

AVC, acidente vascular cerebral; ICC, insuficiência cardíaca congestiva; AE, angina estável; AI, angina instável; IAM, infarto agudo do miocárdio; IECA, inibidor da enzima conversora de angiotensina II; sintomatologia (casuística item 3.1.)

Expressão do RNAm de genes relacionados aos receptores do tipo NOD (NLRs)

A análise da expressão gênica foi realizada em 50 fragmentos de ateroma e 3 amostras controle, conforme já mencionado na casuística (item 3.1).

Inicialmente detectamos a presença do RNAm para alguns NLRs formadores de inflamassoma. Conforme observado na figura 4, foi detectado RNAm para NLRP1, NLRP3, NLRC4, NAIP e AIM2 na maioria das lesões ateroscleróticas analisadas. Ao comparar os resultados obtidos com amostras de artéria controle, observamos maior expressão relativa do RNAm para NLRP3 e NLRC4 em amostras de ateroma (figura 4A). Ao dividir o grupo de pacientes de acordo com a presença ou ausência de sintomatologia, notamos maior expressão relativa do RNAm para NLRP1, NLRP3, NLRC4 e NAIP nas amostras provenientes de pacientes assintomáticos, quando comparados ao grupo sintomático (figura 4B).

Trabalhos recentes associam a presença de fatores de risco para o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas com a modulação da expressão de marcadores inflamatórios presentes nas lesões (106-108). Em nosso estudo a presença de fatores de risco como hipertensão arterial, consumo de tabaco e gênero não foi associada com aumento ou diminuição da expressão do RNAm dos NLRs formadores de inflamassoma (figura. 5).

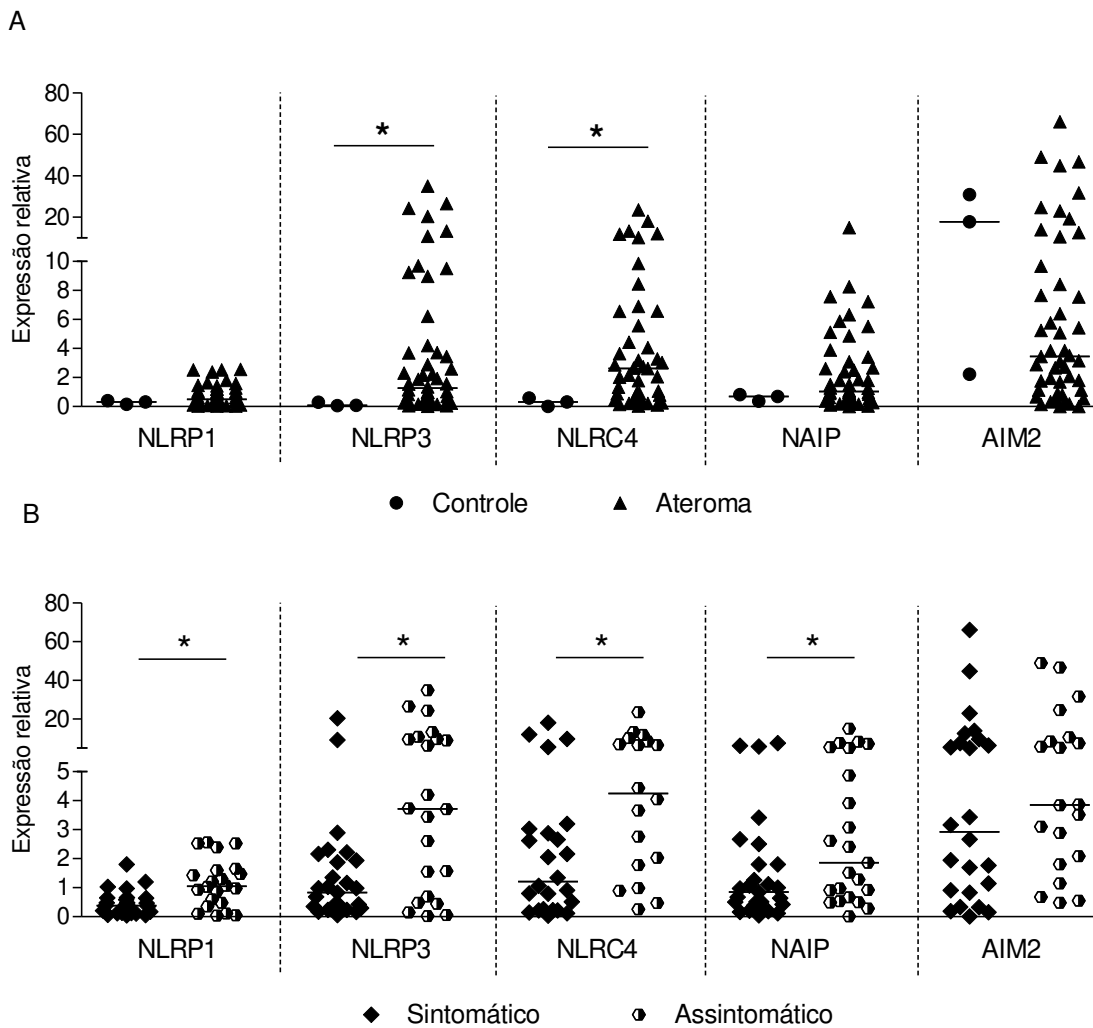


Figura 4. Expressão relativa do RNAm para NLRP1, NLRP3, NLRC4, NAIP e AIM2 em fragmentos de ateroma humano. (A) Lesões ateroscleróticas (n=50) *versus* amostras controle (n=3). (B) Lesões provenientes de pacientes sintomáticos (n=27) *versus* lesões de pacientes assintomáticos (n=23). Os pacientes foram agrupados de acordo com a presença de sintomas cerebrovasculares como ocorrência de AVC, episódio isquêmico transitório ou amaurose fugaz ipsilateral, no período de 6 meses anterior à cirurgia. * $p \leq 0,05$. Mann Whitney.

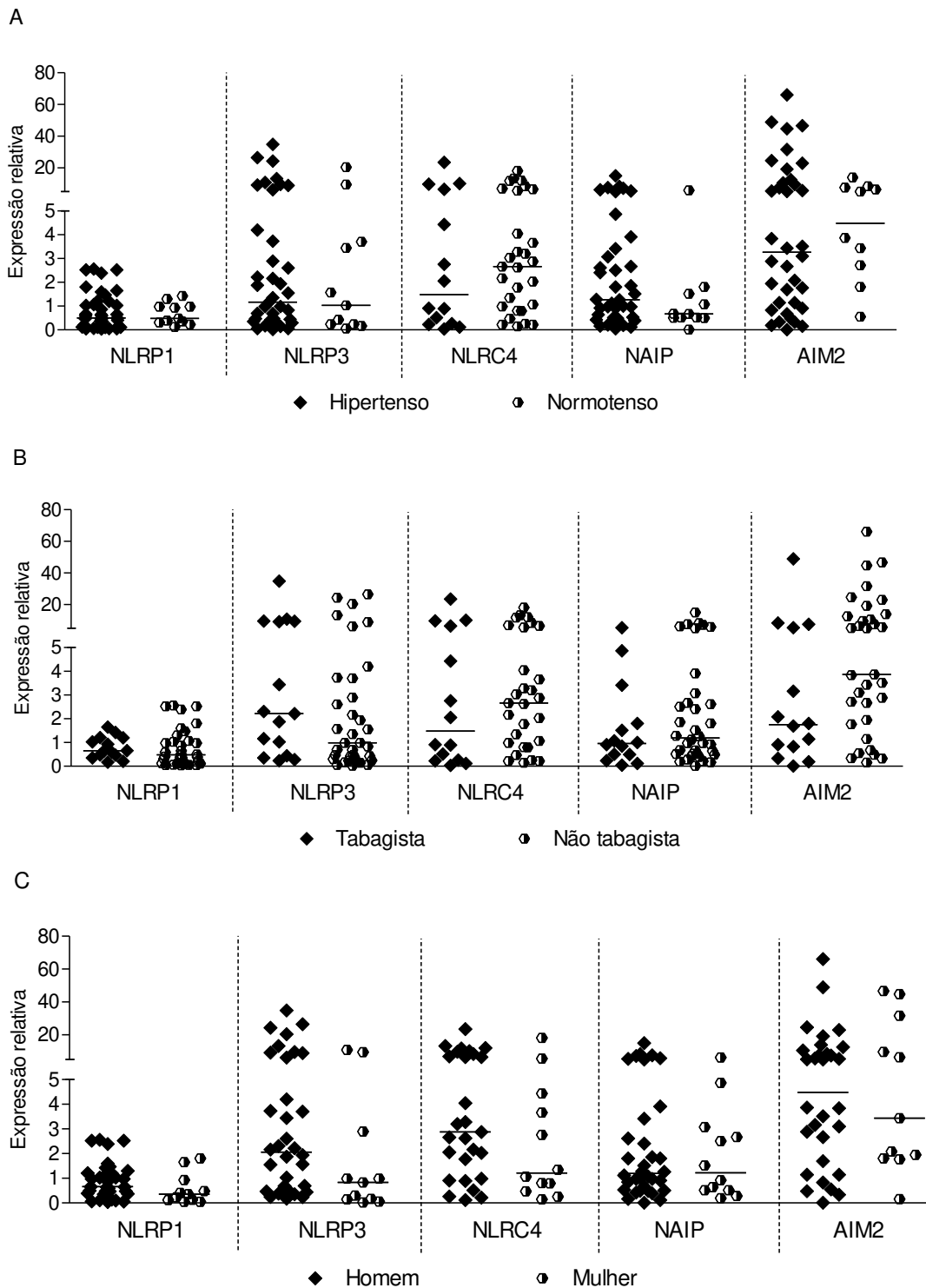


Figura 5. Expressão relativa do RNAm para NLRP1, NLRP3, NLRC4, NAIP e AIM2 em fragmentos de aterosclerose humana organizados segundo a presença de fatores de risco. (A) hipertensão (n=39) versus normotensão (n=11); (B) tabagista (n=15) versus não-tabagista (n=35) e (C) sexo masculino (n=38) versus sexo feminino (n=12). Mann Whitney.

A ativação dos inflamassomas promove recrutamento da proteína adaptadora ASC e consequente ligação e ativação da caspase-1 ao inflamassoma (60,77). O recrutamento e ativação da caspase-1 é suficiente para promover a clivagem da pró-IL1 β e liberação de IL-1 β ativa no microambiente (60,77). Nossos dados mostram que as lesões ateroscleróticas expressam RNAm para ASC, caspase-1 e IL-1 β (figura 6), sendo que a caspase-1 tem maior expressão relativa em amostras de ateroma e ASC em amostras de indivíduos assintomáticos, quando comparadas com artérias controles e lesões provenientes de pacientes sintomáticos, respectivamente (figura 6A e B).

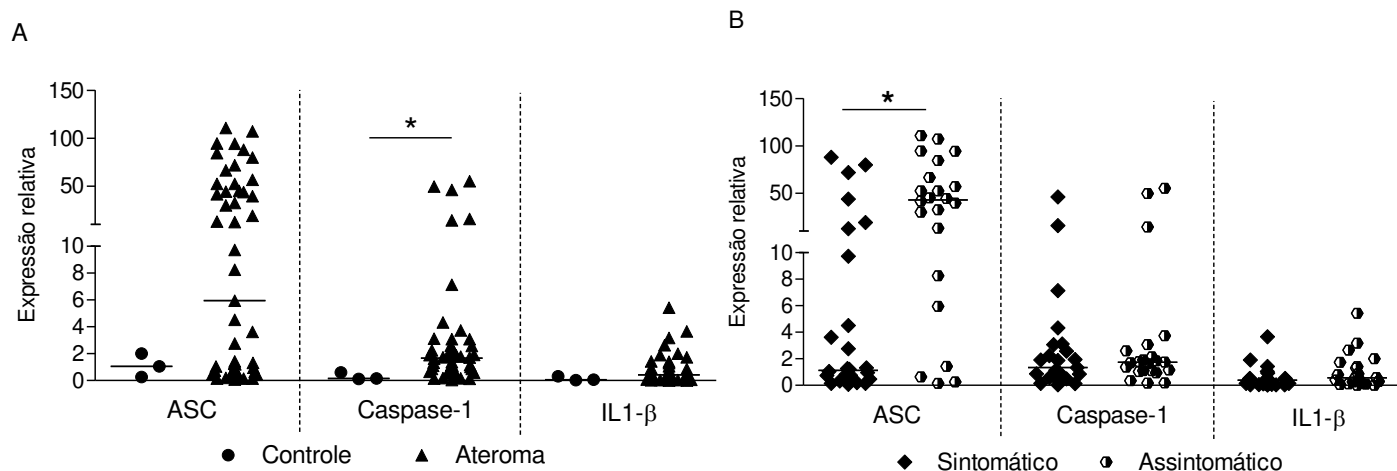


Figura 6. Expressão relativa do RNAm para ASC, Caspase-1 e IL-1 β em fragmentos de ateroma humano. (A) Lesões ateroscleróticas (n=50) versus amostras controle (n=3). (B) Lesões de pacientes sintomáticos (n=27) versus lesões de pacientes assintomáticos (n=23). Os pacientes foram agrupados de acordo com a presença de sintomas cerebrovasculares como ocorrência de AVC, episódio isquêmico transitório ou amaurose fugaz ipsilateral, no período de 6 meses anterior à cirurgia. * $p \leq 0,05$. Mann Whitney.

Os dados comparativos da expressão gênica do RNAm para ASC, caspase-1 e IL-1 β em pacientes agrupados por fatores de risco (tabagismo, presença de hipertensão arterial e diferenças de gênero) não mostrou diferenças significativas (dados não mostrados).

A família dos NLRs é constituída também de receptores envolvidos no reconhecimento de patógenos e ativação de vias inflamatórias (NLRC1 e NLRC2) e que têm funções imunoreguladoras (NLRC3 e NLRC5, CIITA e NLRP2 e NLRP10) (43-45,62,109). Nesse trabalho investigamos NLRC1, 2, 3, 5 e NLRP2. A análise da expressão gênica revelou presença do RNAm para todos os NLRs pesquisados, sendo que amostras de lesão apresentaram expressão gênica significativamente maior para NLRC2, NLRC3 e NLRP2 comparativamente ao grupo controle (figura 7A). Com relação à presença de sintomatologia, observamos que lesões ateroscleróticas de indivíduos assintomáticos apresentaram maior expressão do RNAm para todos os NLRs estudados, exceto NLRC1, quando comparado ao grupo sintomático (figura 7B).

Os dados comparativos da expressão do RNAm para NLRC1, 2, 3, 5 e NLRP2 em pacientes agrupados por fatores de risco (tabagismo, presença de hipertensão arterial e diferenças de gênero) não mostrou diferenças significativas (dados não mostrados).

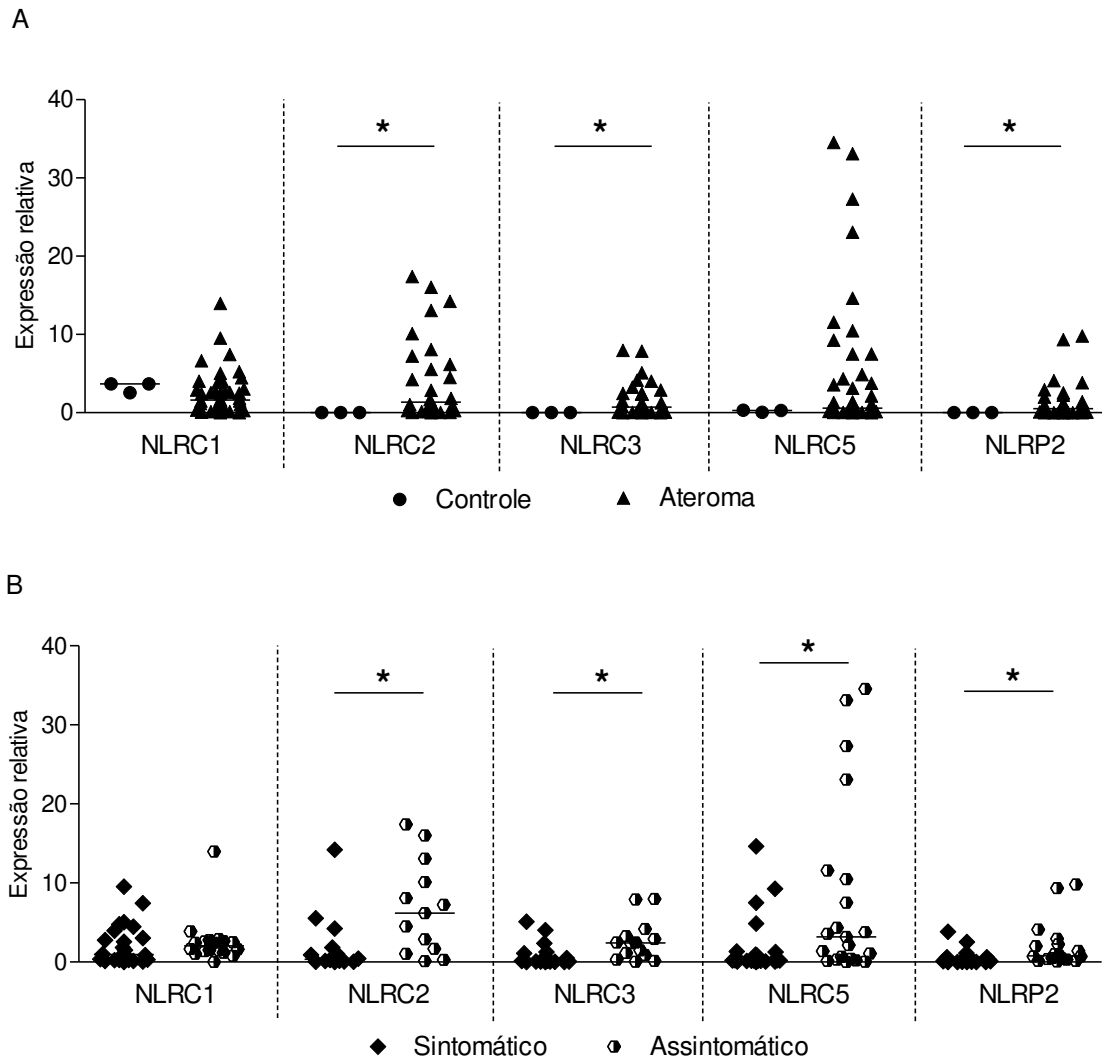


Figura 7. Expressão relativa do RNAm para NLRC1, NLRC2, NLRC3, NLRC5 e NLRP2 em fragmentos de ateroma humano. (A) Lesões ateroscleróticas (n=50) *versus* amostras controle (n=3). (B) Lesões de pacientes sintomáticos (n=27) *versus* lesões de pacientes assintomáticos (n=23). Os pacientes foram agrupados de acordo com a presença de sintomas cerebrovasculares como ocorrência de AVC, episódio isquêmico transitório ou amaurose fugaz ipsilateral, no período de 6 meses anterior à cirurgia. * $p \leq 0,05$. Mann Whitney.

4.2. Expressão da proteína dos receptores do tipo NOD (NLRs)

A análise da presença da proteína foi realizada em 27 fragmentos de ateroma. A maioria das amostras (54,7%) foi obtida de pacientes considerados clinicamente sintomáticos, segundo os critérios descritos na casuística (item 3.1).

Em trabalho anterior mostramos marcações positivas para IL-1 β e IL-18 em macrófagos, células espumosas e células gigantes presentes em lesões ateroscleróticas (41). Como a produção dessas citocinas está relacionada com a ativação dos NLRs formadores de inflamassomas, procedemos a detecção de NLRP1, NLRP3 e AIM2 em lesões de ateroma humano.

A técnica de imuno-histoquímica revelou a presença de macrófagos e células gigantes positivas para NLRP1 (figura 8). Além disso, pudemos observar grande quantidade de macrófagos e células gigantes positivas para NLRP3 (figura 9A e B) e AIM2 (figura 10 A e B), independente da presença de sintomatologia.

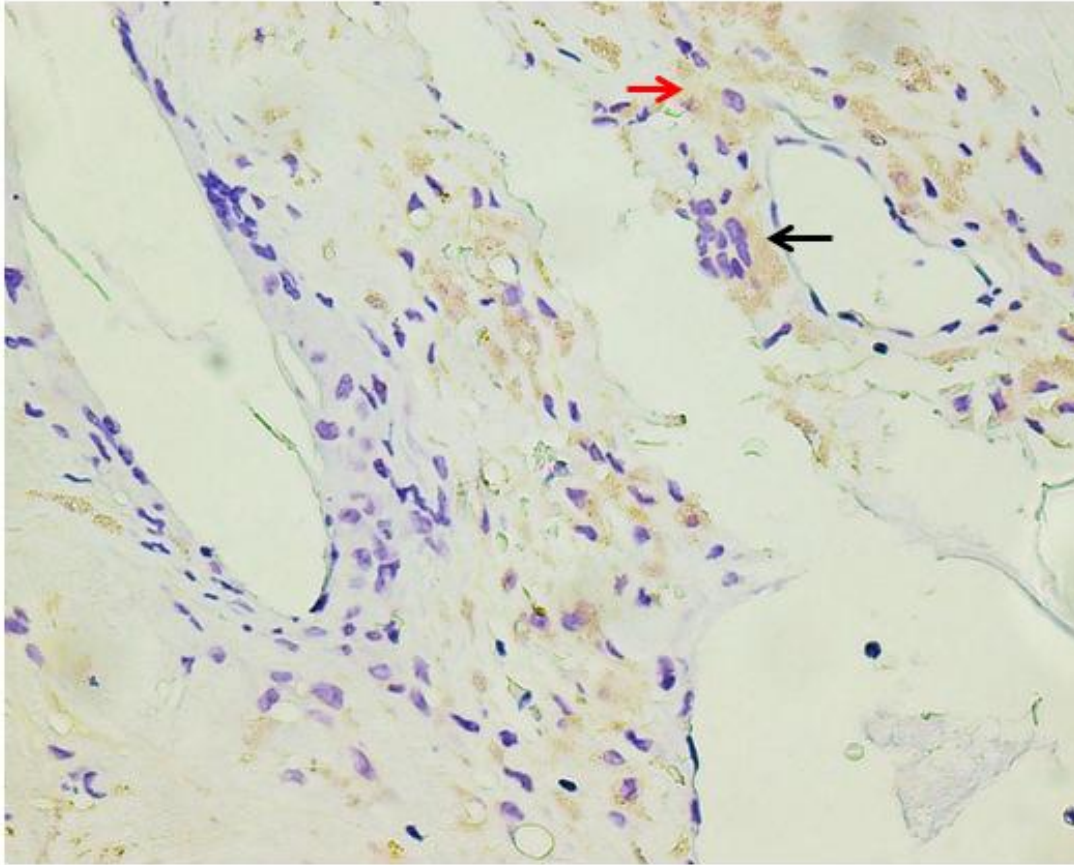


Figura 8. Amostra de lesão aterosclerótica marcada com anti-NLRP1. Marcações positivas (marrom) para NLRP1, em macrófagos (seta vermelha) e células gigantes (seta preta). Imuno-histoquímica, anticorpo anti-NLRP1, 400x.

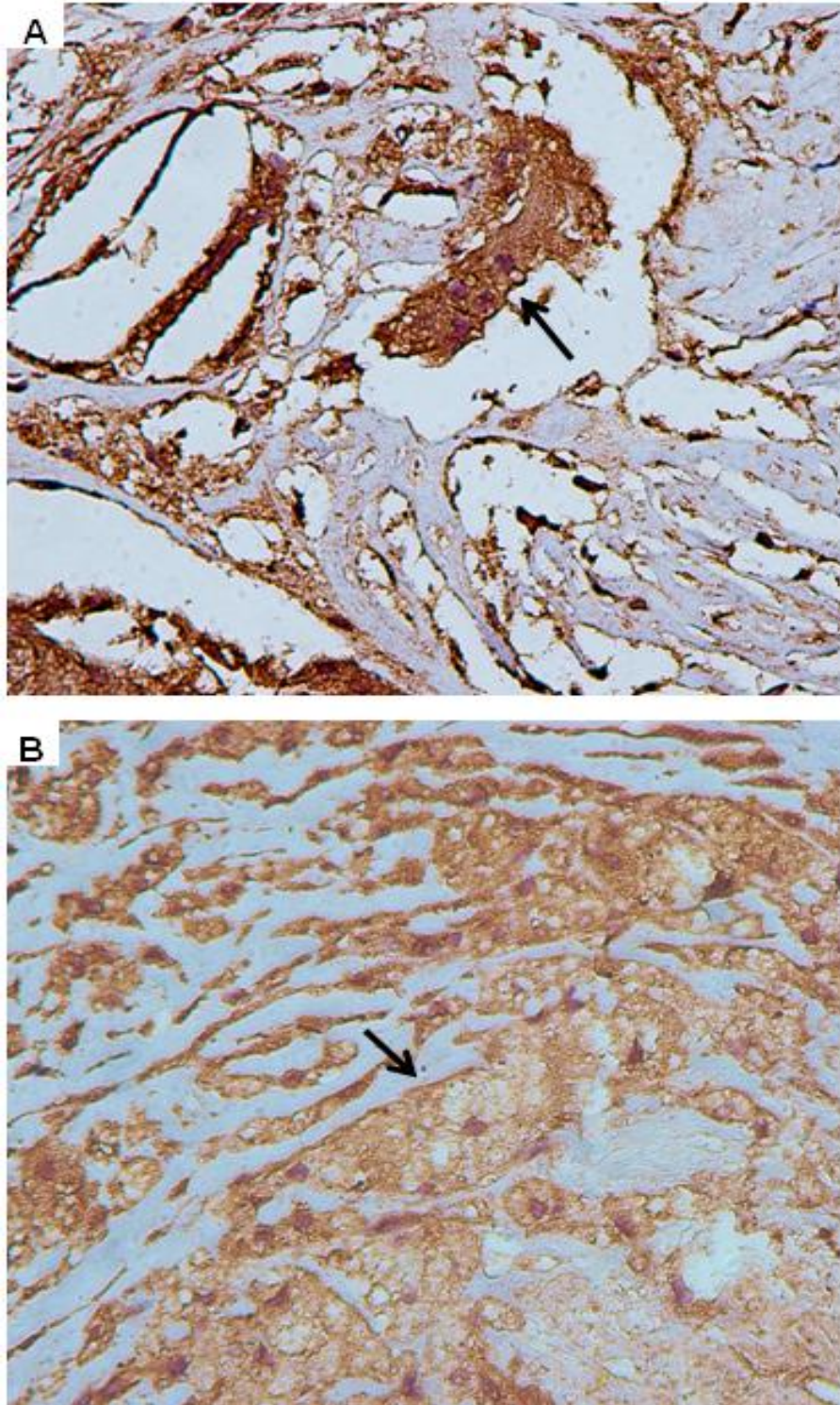


Figura 9. Amostra de lesão aterosclerótica marcada com anti-NLRP3. (A) Amostra proveniente de paciente assintomático. Marcações positivas (marrom) em célula gigante (seta). (B) Amostra proveniente de paciente sintomático. Marcações positivas (marrom) em células espumosas (seta). Imuno-histoquímica, anticorpo anti-NLRP3, 400x.

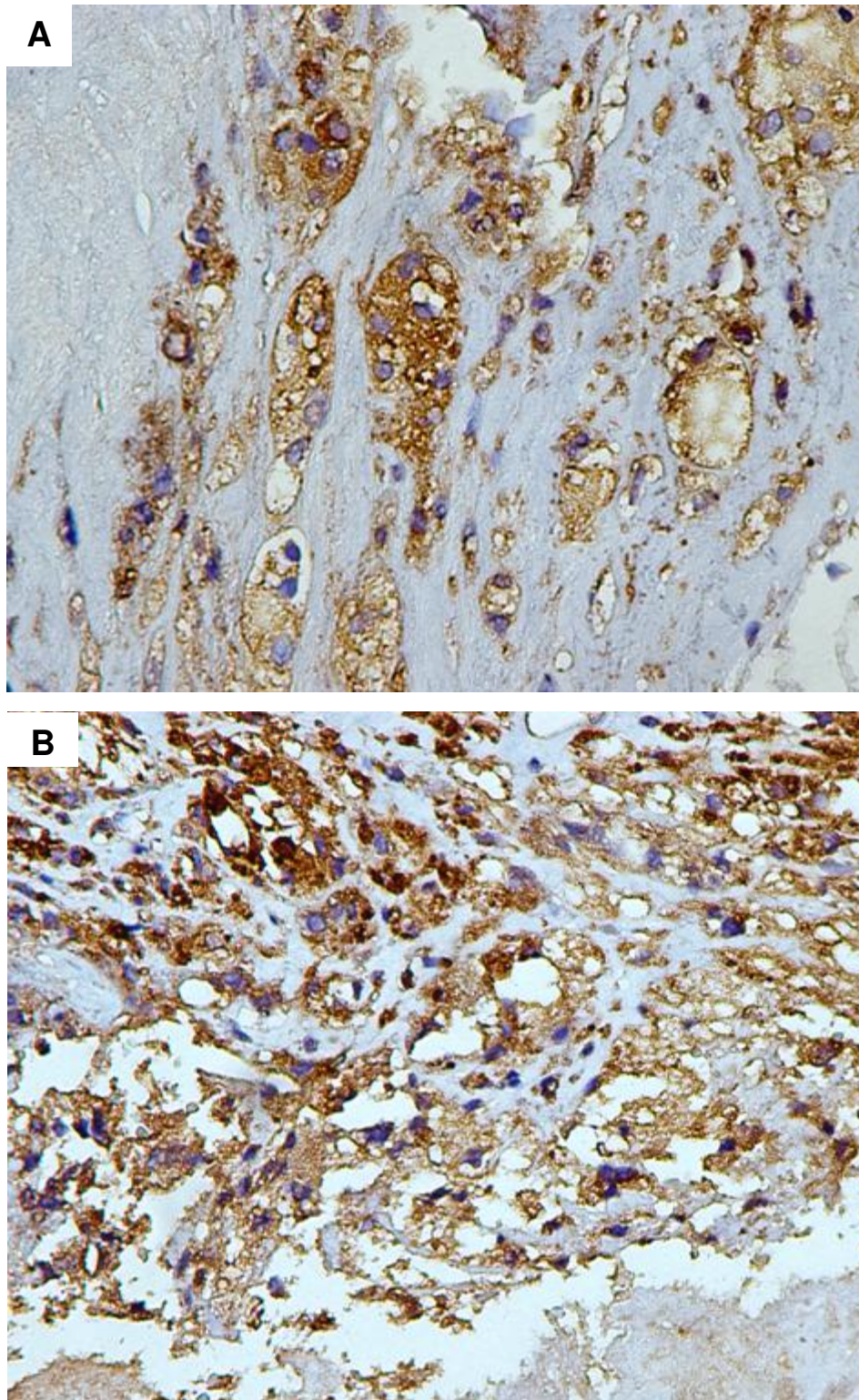


Figura 10. Amostra de lesão aterosclerótica marcada com anti-AIM2. (A) Amostra proveniente de paciente assintomático e (B) sintomático. Marcações positivas (marrom) em células gigantes e macrófagos. Imuno-histoquímica, anticorpo anti-AIM2, 400x.

O tamanho da área marcada com o anticorpo anti-NLRP3 e anti-AIM2 foi avaliada por meio do software GSA Image Analyser®. Como pode ser observado na figura 11, apenas o agrupamento tabagista *versus* não tabagista apresentou diferença na área positivamente marcada com o anticorpo anti-NLRP3. Não encontramos nenhuma diferença significativa na área marcada de amostras agrupadas por sintomatologia ou outros fatores de risco.

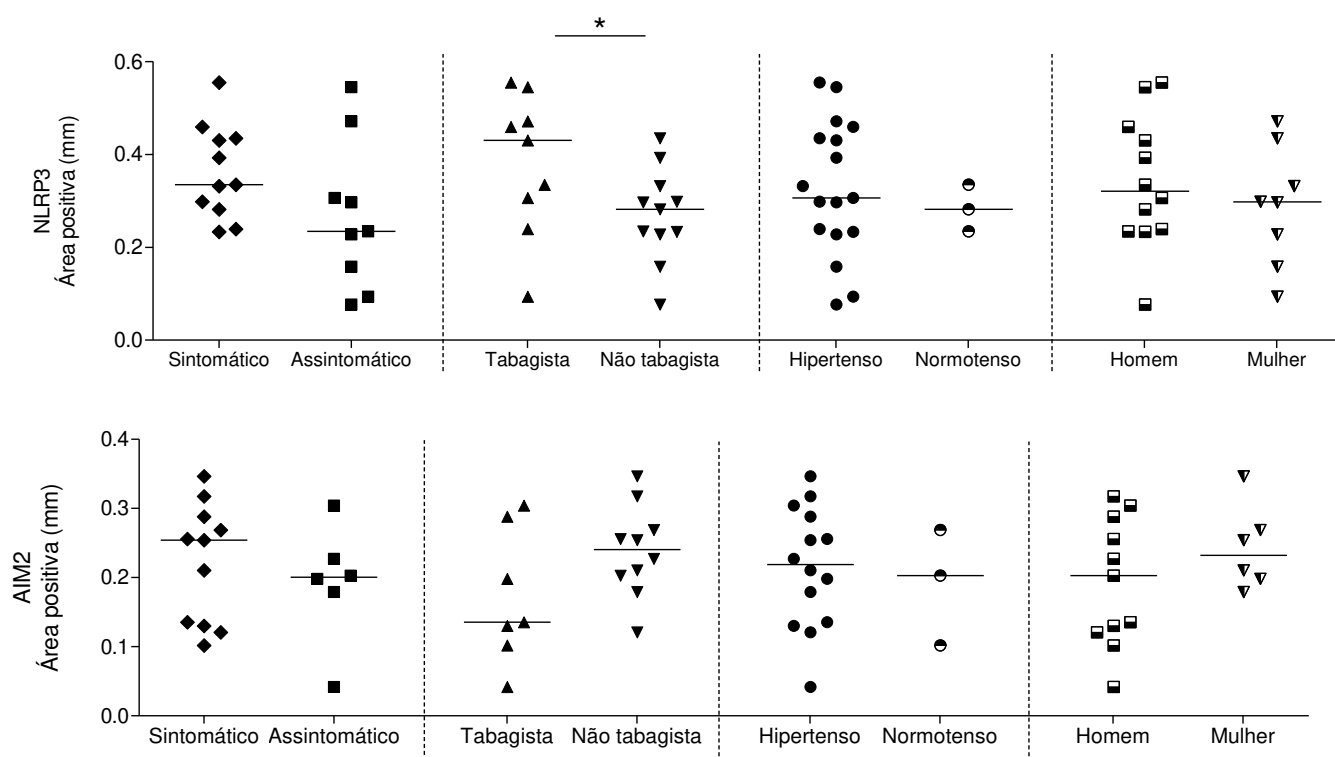


Figura 11. Quantificação da área marcada com os anticorpos anti-NLRP3 e anti-AIM2 em amostras agrupadas por sintomatologia ou fatores de risco. Amostras de ateroma foram agrupadas segundo a presença de sintomatologia e fatores de risco (tabagismo, hipertensão e diferença de gênero) e tiveram sua área de marcação positiva quantificada pelo software GSA Image Analyser®. * $p \leq 0,05$. Mann Whitney.

Originalmente, o NLRC2 foi documentado por sua capacidade de reconhecer um produto da degradação de peptidoglicano da parede bacteriana (57). Em nosso estudo, como verificamos a presença de RNAm para NLRC2 em lesões de ateroma, procedemos a investigação com a detecção da proteína. A marcação para NLRC2 foi realizada em uma amostra de ateroma proveniente de paciente sintomático e conforme mostra a figura 12A, macrófagos foram positivamente marcados. Interessante notar a ausência de marcação em uma célula gigante circundando um cristal de colesterol (figura 12B, seta).

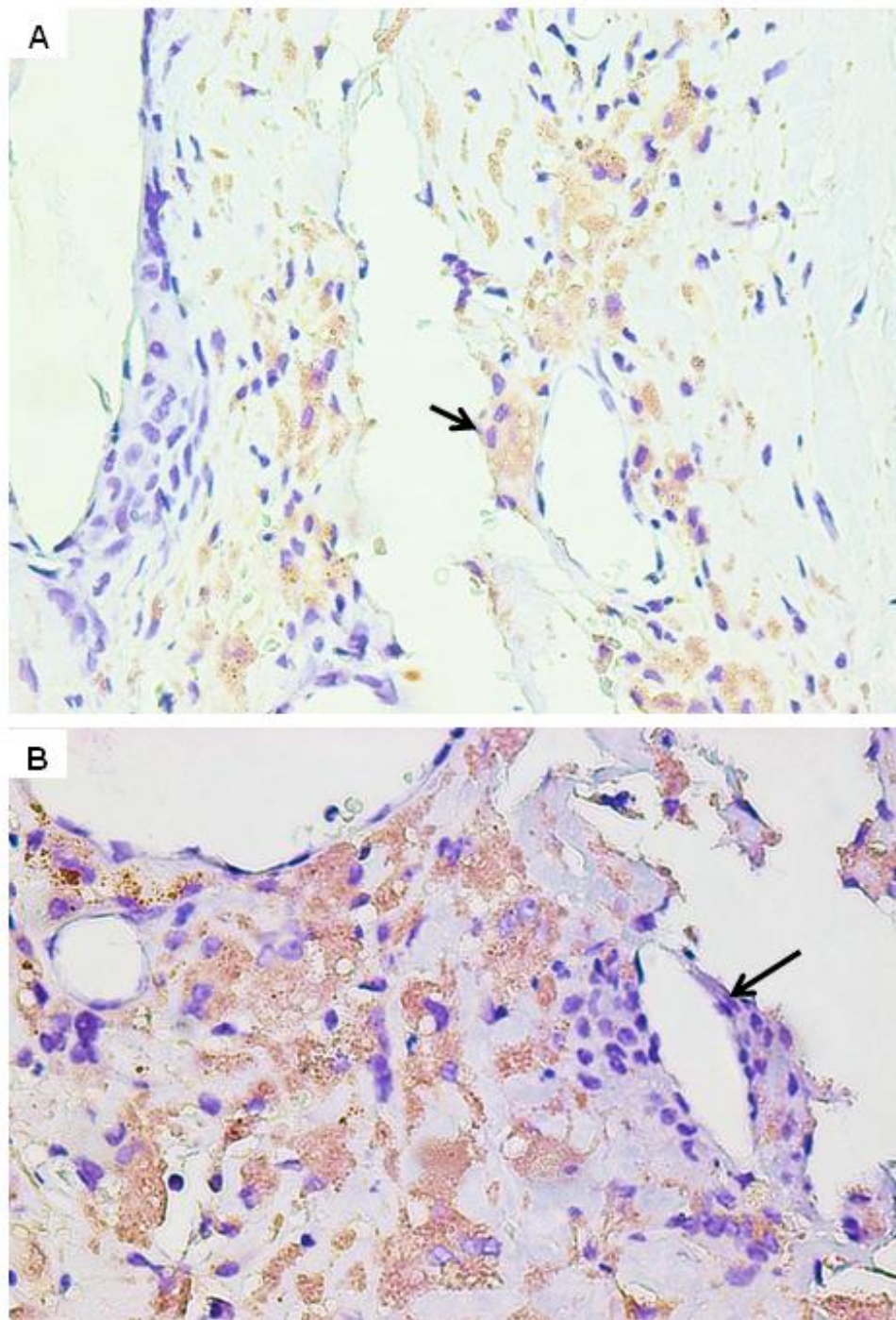


Figura 12. Amostra de lesão aterosclerótica marcada com anti-NLRC2. Amostra proveniente de paciente sintomático. (A) Marcações positivas (marrom) em macrófagos (seta). (B) Ausência de marcação em célula gigante circundando um cristal de colesterol (seta). Imuno-histoquímica, anticorpo anti-NLRC2, 400x

Posteriormente, analisamos a presença da proteína para NLRC5 (figura 13) e NLRC3 (figura 14). Marcações positivas para NLRC5 foram encontradas em células espumosas enquanto que, marcações para NLRC3 foram encontradas em macrófagos e células gigantes.

A quantificação da área de marcação para NLRC3 (figura 15) revelou diferenças estatísticas apenas quando comparamos o grupos de pacientes tabagista *versus* não-tabagista. Não verificamos diferenças entre amostras dos grupos sintomático *versus* assintomático ou hipertenso *versus* normotenso ou homem *versus* mulher (figura 15)

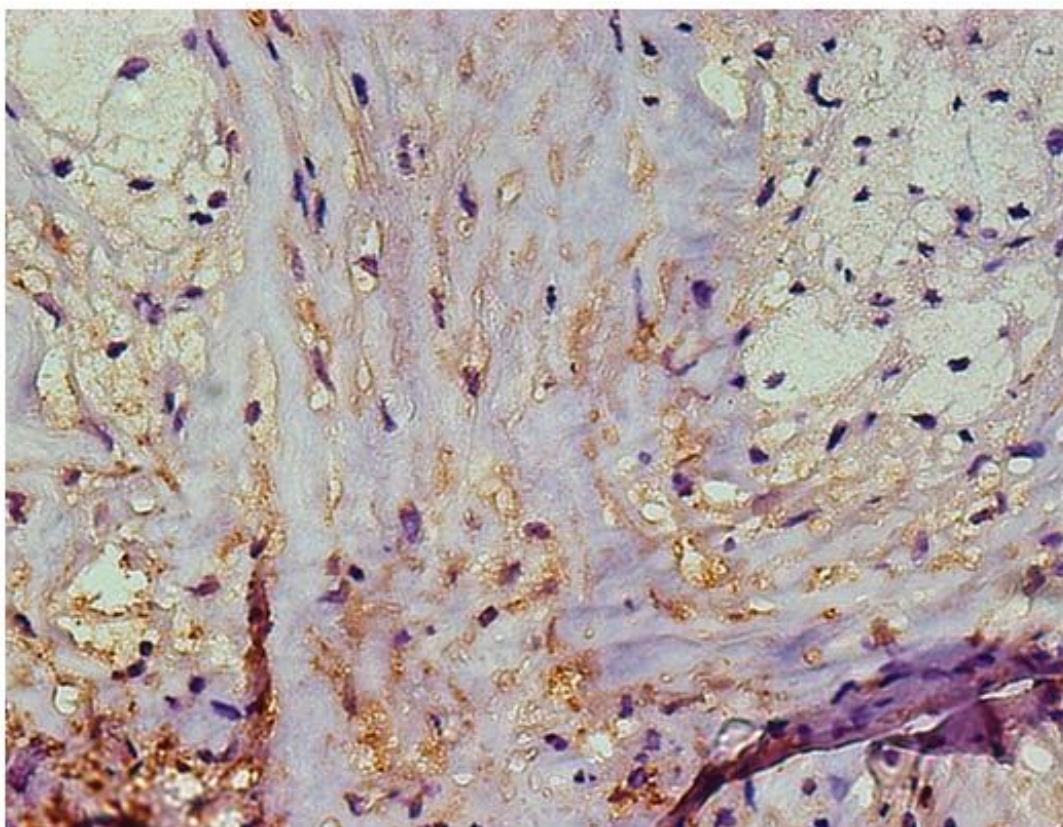


Figura 13. Amostra de lesão aterosclerótica marcada com anti-NLRC5. Marcações positivas (marrom) para NLRC5 em região com grande quantidade de células espumosas (seta preta). (400x). Imuno-histoquímica, anticorpo anti-NLRC5, 400x

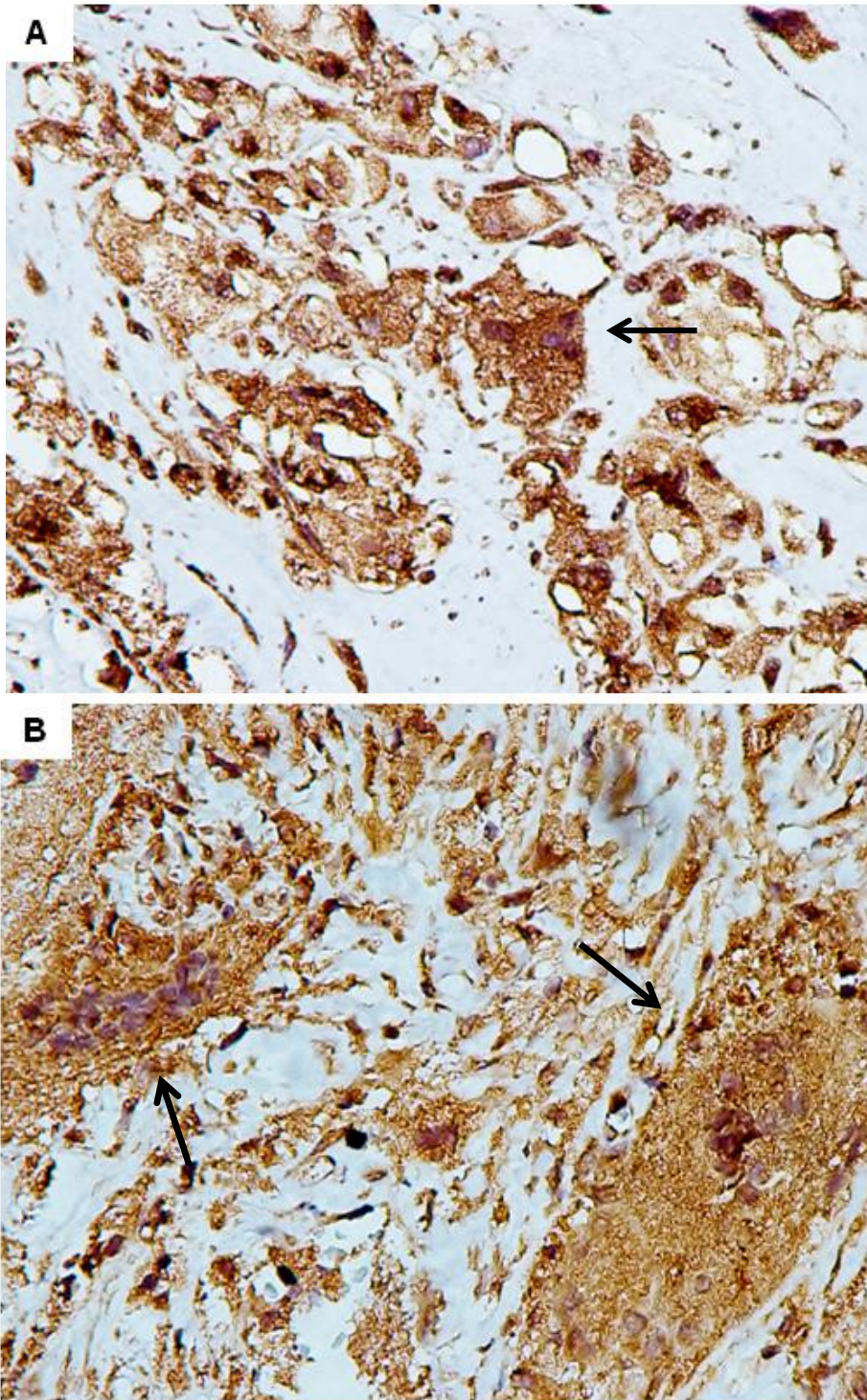


Figura 14. Amostra de lesão aterosclerótica marcada com anti-NLRC3. (A) Amostra de paciente assintomático. Marcações positivas (marrom) em macrófagos e células gigantes (seta). (B) Amostra de paciente sintomático. Marcações positivas em células gigantes (setas). Imuno-histoquímica, anticorpo anti-NLRC3, 400x

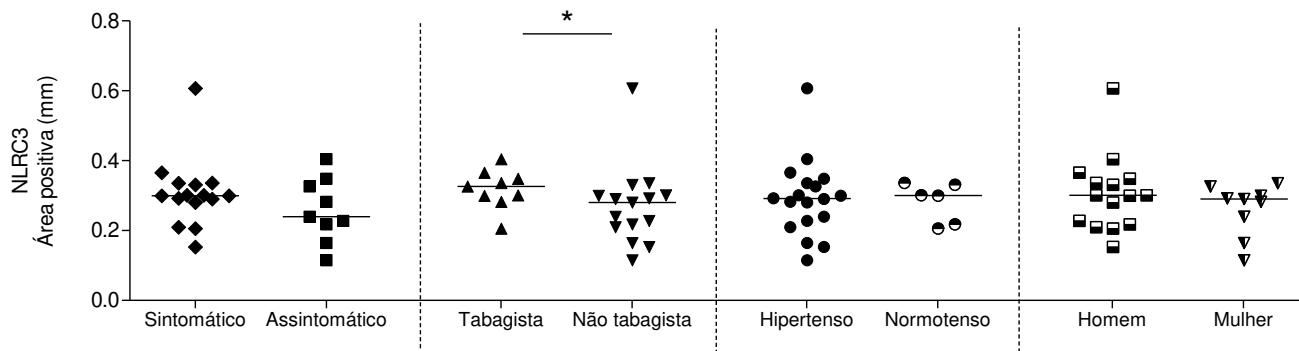


Figura 15. Quantificação da área marcada com o anticorpo anti-NLRC3 em amostras agrupadas por sintomatologia ou fatores de risco. Amostras de ateroma foram agrupadas segundo a presença de sintomatologia e fatores de risco (tabagismo, hipertensão e diferença de gênero) e tiveram sua área de marcação positiva quantificada pelo software GSA Image Analyser®. * $p \leq 0,05$. Mann Whitney.

Finalmente, analisamos a presença da protease caspase-1, recrutada após formação do inflamassoma (60,77). O padrão de marcação positiva de caspase-1 mostrou-se muito semelhante àquele observado nos NLRs, sendo essa protease abundante em macrófagos e células gigantes (figura 16A). Na figura 16B destacamos a presença da caspase-1 em célula gigante em torno de um cristal de colesterol.

Observamos maior área positiva para caspase-1 em paciente sintomáticos, quando comparado ao grupo assintomático (figura 17). Entretanto, não encontramos diferenças estatísticas quando comparamos a presença de fatores de risco para o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (tabagista *versus* não-tabagista, hipertenso *versus* normotenso e homem *versus* mulher).

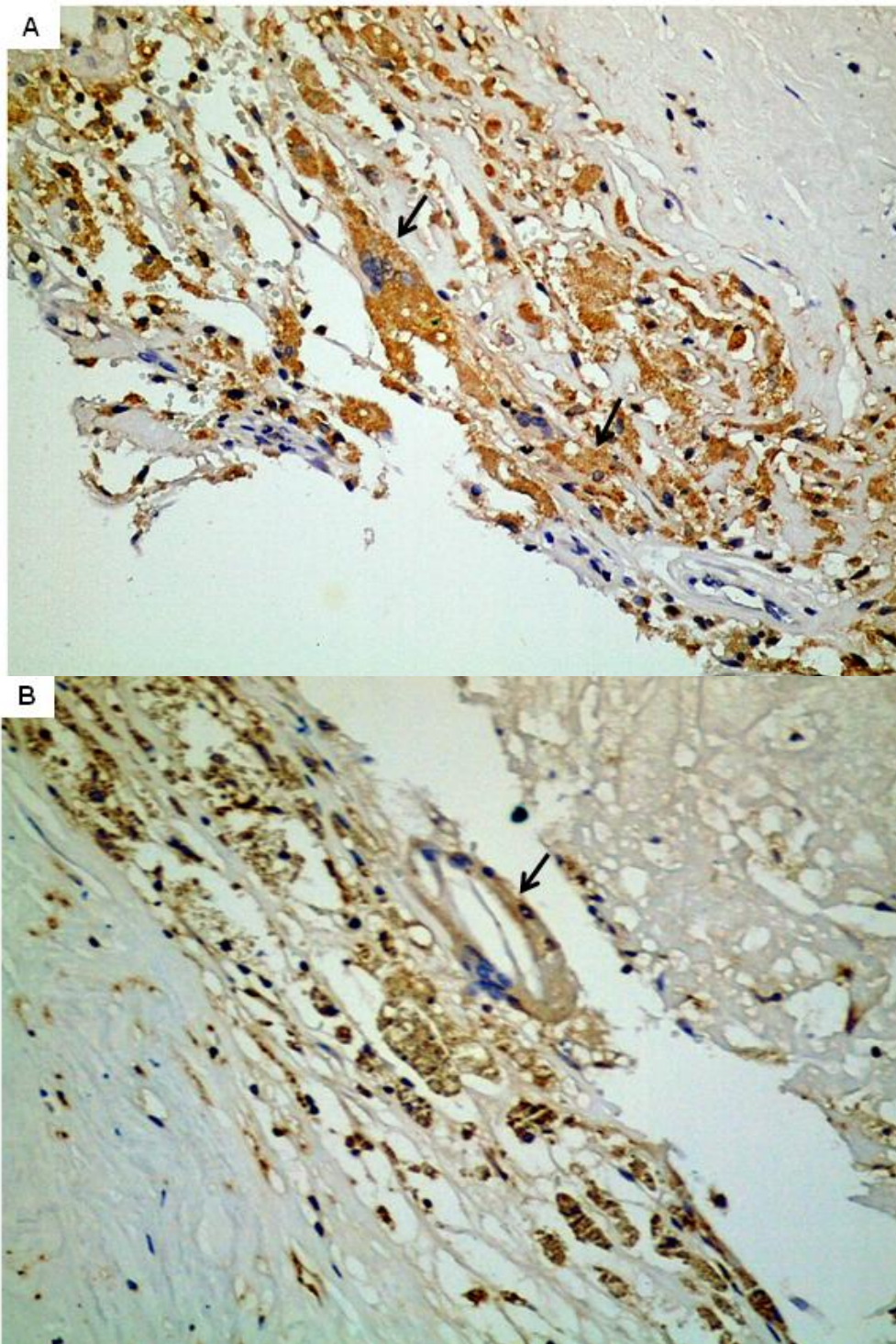


Figura 16. Amostra de lesão aterosclerótica marcada com anti-caspase-1. (A) Marcações positivas (marrom) em macrófagos e células espumosas (setas). (B) Marcações positivas em célula gigante em torno de um cristal de colesterol (seta). Imuno-histoquímica, anticorpo anti-caspase-1, 400x

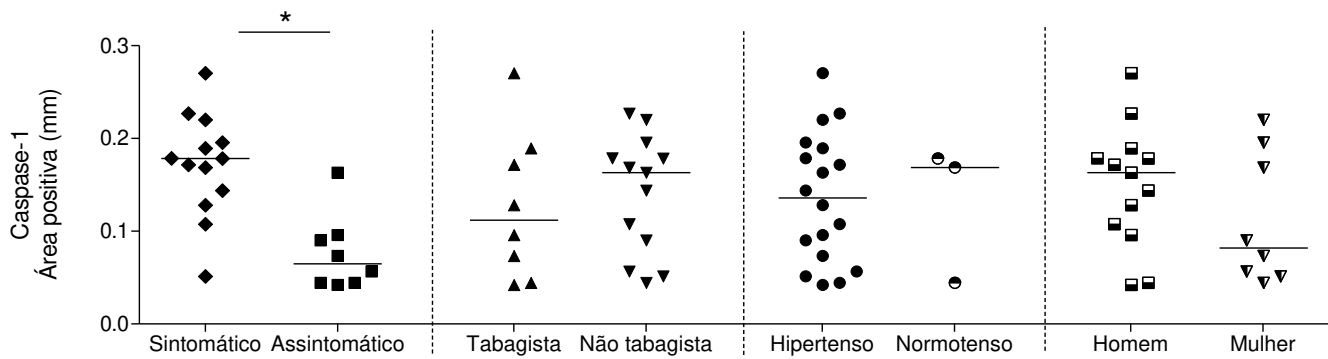


Figura 17. Quantificação da área marcada com o anticorpo anti-caspase-1 em amostras agrupadas por sintomatologia ou fatores de risco. Amostras de ateroma foram agrupadas segundo a presença de sintomatologia e fatores de risco (tabagismo, hipertensão e diferença de gênero) e tiveram sua área de marcação positiva quantificada pelo software GSA Image Analyser®. * $p \leq 0,05$. Mann Whitney.

Nossos dados mostram que lesões de ateroma provenientes de carótida apresentam a expressão do RNAm e proteína para NLRP3. Dados recentes da literatura mostram que antígenos particulados estão diretamente envolvidos com a ativação deste receptor (72-74,110). No contexto da aterosclerose, o principal antígeno particulado presente são os cristais de colesterol (111-113), depositado em grande quantidade em lesões instáveis. Este segundo bloco de experimentos teve por objetivo avaliar a produção de IL-1 β (marcador indireto da ativação do inflamassoma), por monócitos/macrófagos após a estimulação com cristais de colesterol.

4.3. Produção de IL-1 β por monócitos e macrófagos após estimulação com cristais de colesterol

Nessa seção analisamos a produção tanto da citocina IL-1 β quanto de TNF- α por monócitos e macrófagos frente aos estímulos cristal de colesterol e/ou LPS. Nas figuras

que seguem estão representadas todas as diferenças estatísticas encontradas, mas destacamos no texto apenas o que era mais relevante para o trabalho.

Produção de IL-1 β por monócitos de sangue periférico

Inicialmente verificamos a produção de IL-1 β pelos monócitos, precursores dos macrófagos teciduais e, certamente, uma das primeiras células a atingir a íntima arterial. Nossos resultados mostraram que monócitos obtidos do sangue periférico não estimulados ou estimulados apenas com cristais de colesterol produziram uma pequena quantidade de IL-1 β (figura 18A) e TNF- α (figura 18B), embora a estimulação com LPS tenha induzido grande produção de ambas as citocinas (figura 18A e B). Um achado interessante foi o efeito aditivo de LPS e cristais de colesterol sobre a produção de IL-1 β (figura 18A), mas não de TNF- α (figura 18B), embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa.

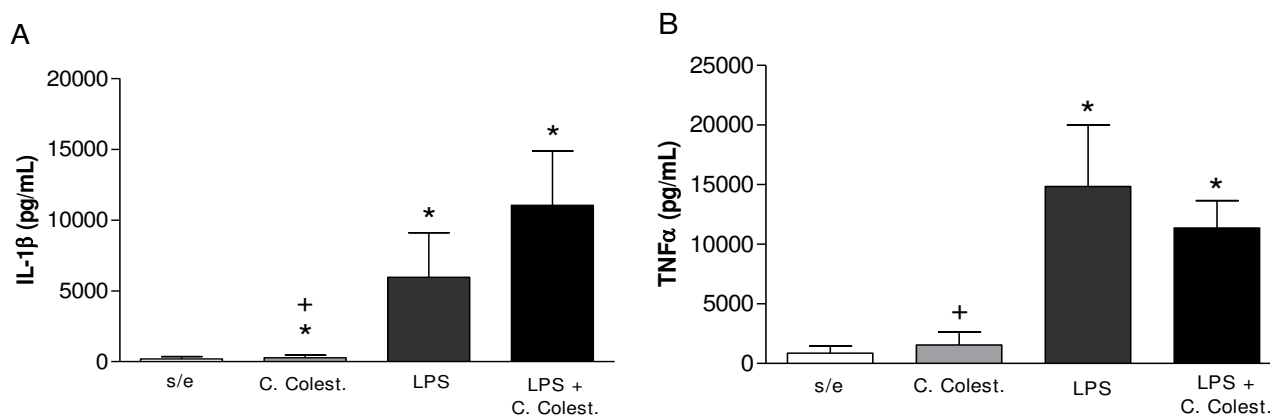


Figura 18. Produção de IL-1 β e TNF- α por monócitos do sangue periférico estimulados. Monócitos isolados do sangue periférico foram cultivados ($0,25 \times 10^6$ células/mL) na presença de LPS (20ng/mL), cristal de colesterol (2mg/mL), ambos ou apenas meio de cultura (s/e). Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 8 horas de estímulo e as citocinas IL-1 β (A) e TNF- α (B) foram avaliadas por ELISA. Resultados representativos de cinco experimentos independentes. Cada barra representa a média \pm SEM. * $p \leq 0,05$ em relação a s/e. + $p \leq 0,05$ em relação a LPS + cristal de colesterol. Teste t pareado.

Produção de IL-1 β por macrófagos M1 e M2 diferenciados *in vitro* a partir de monócitos do sangue periférico

Primeiramente, para verificar se as condições de cultura descritas em materiais e métodos (item 3.5.) foram adequadas para a diferenciação de macrófagos nas subpopulações M1 (macrófago com perfil inflamatório) e M2 (macrófago com perfil imunomodulador) foi feita a fenotipagem por citometria de fluxo.

A figura 19 mostra a diferenciação de macrófagos M1 e M2 confirmada pela expressão diferencial de marcadores de superfície (25-28). Primeiramente, verifica-se maior expressão do marcador CD68 pelas duas populações de macrófagos, quando comparadas aos monócitos. Macrófagos M1 apresentam menor expressão das moléculas CD14, CD206 e CD163, em comparação com os macrófagos M2. Por outro lado, a população M2 apresenta menor expressão de CD1a, MHC de classe II, CD80 e CD86 quando comparada a macrófagos.

Além das moléculas de superfície, esses macrófagos também são distintos quanto ao perfil de citocinas produzidas, sendo que os M1 produzem preferencialmente citocinas inflamatórias e os M2 citocinas anti-inflamatórias (25-28). A análise dos sobrenadantes de cultura das duas populações de macrófagos (figura 20) mostrou que o subtipo M1 produziu quantidades maiores de TNF- α em relação ao M2, que por sua vez apresentou produção aumentada de IL-10. As duas populações produziram níveis semelhantes da citocina IL-6 e não detectamos IL-1 β no sobrenadante de cultura de nenhuma delas.

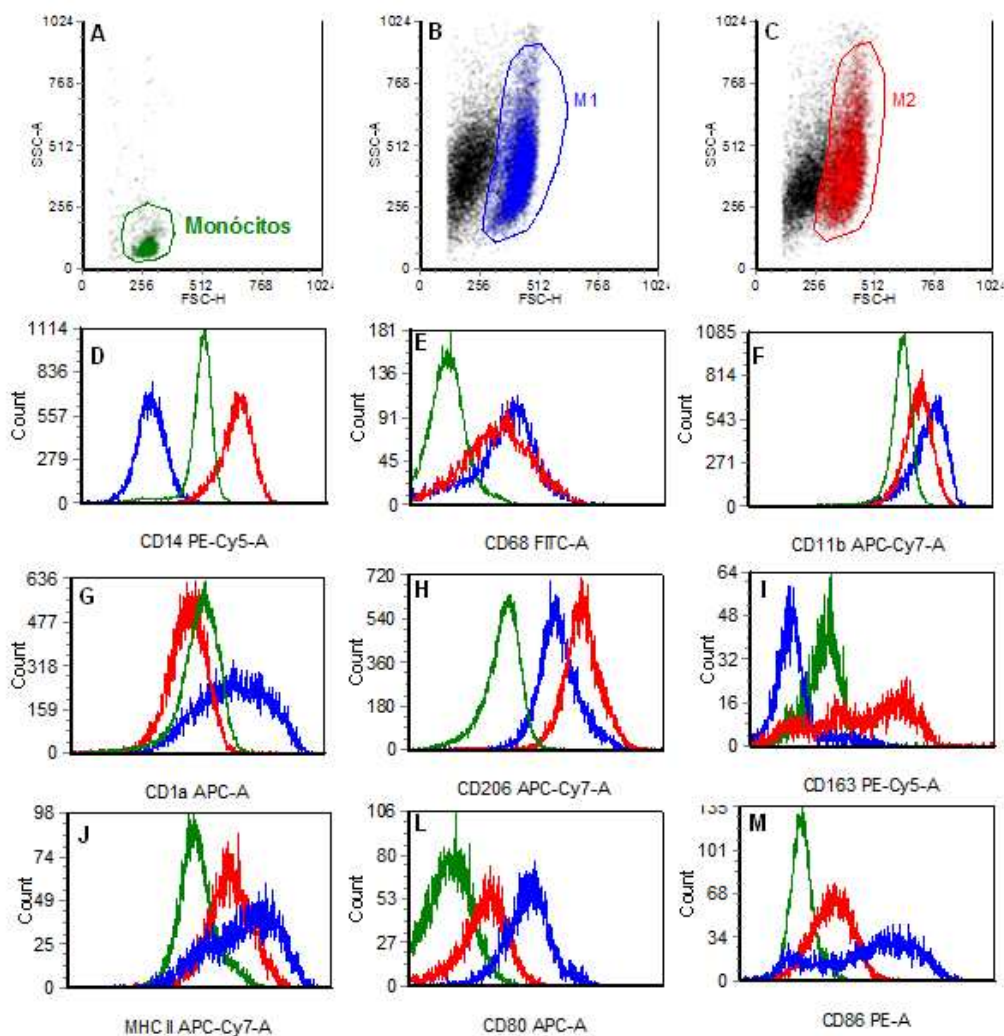


Figura 19. Citometria de fluxo de células CD14+ submetidas às condições de cultura para diferenciação de macrófagos em M1 e M2. A-C: “Dot-plots” representativos da análise por citometria de fluxo da distribuição por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) de monócitos do sangue periférico antes (A) e depois de 5 dias de cultura com GM-CSF (M1 - B) e M-CSF (M2 - C). D-L: Histogramas representativos da marcação de superfície com anticorpos anti-CD14 (D), anti-CD68 (E), anti-CD11b (F), anti-CD1a (G), anti-CD206 (H), anti-CD163 (I), anti-MHC de classe II (J), anti-CD80 (K) e anti-CD86 (L). Os histogramas foram gerados a partir dos gates destacados nos “dot-plots” (monócitos - verde; M1 - azul e M2 - vermelho).

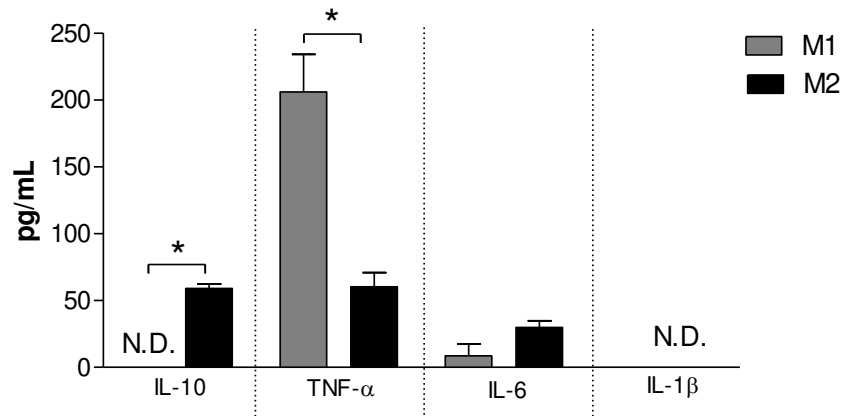


Figura 20. Produção de IL-10, TNF- α , IL-6 e IL-1 β por macrófagos M1 e M2. Macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico foram diferenciados nas subpopulações M1 e M2 após cinco dias de incubação na presença de GM-CSF (50 ng/mL) ou de M-CSF (100 ng/mL), respectivamente. Resultados representativos de três experimentos independentes. Cada barra representa a média \pm SEM, com * $p \leq 0,05$. Teste t. ND=não detectado.

Estabelecidas as condições de diferenciação, os macrófagos M1 e M2 foram estimulados com LPS e/ou cristal de colesterol e o sobrenadante das culturas foi coletado para detecção das citocinas IL-1 β e TNF- α .

Os resultados mostrados na figura 21 (painel A) revelam que a estimulação apenas com os cristais de colesterol induziu uma pequena produção de IL-1 β enquanto que a presença do LPS sozinho levou ao aumento na produção, ainda que em níveis intermediários. Entretanto, da mesma forma como aconteceu na cultura de monócitos, a estimulação conjunta de LPS e cristais de colesterol teve efeito aditivo na produção de IL-1 β . Interessante notar que sob essas condições os macrófagos M2 apresentarem tendência de maior produção de IL-1 β em comparação aos macrófagos M1.

Com relação à produção de TNF- α (figura 21B) observamos que a estimulação com LPS induziu grande aumento na produção dessa citocina e que a presença concomitante de cristal de colesterol não representou efeito aditivo. Além disso, verificamos maior produção de TNF- α por macrófagos M2.

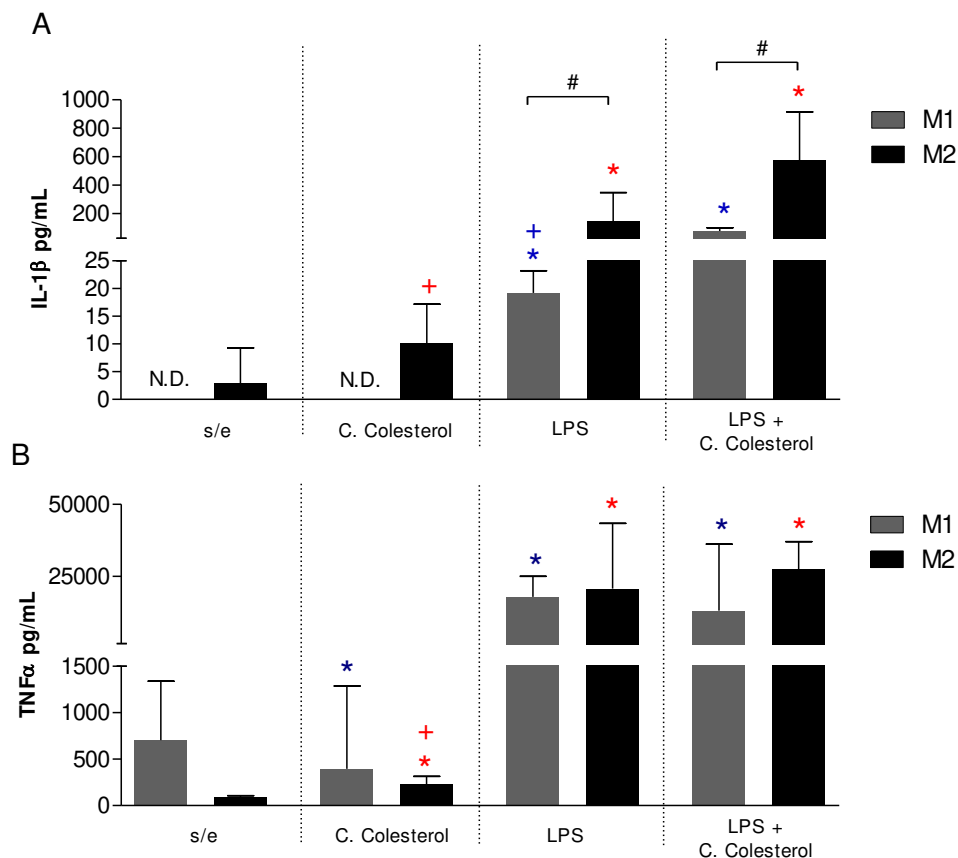


Figura 21. Produção de IL-1 β e TNF- α por macrófagos M1 e M2 derivados de monócitos. Macrófagos derivados de monócitos foram diferenciados na presença de GM-CSF (50ng/mL) ou M-CSF (100ng/mL), respectivamente. Posteriormente foram cultivados ($0,25 \times 10^6$ células/mL) na presença de LPS (20ng/mL), cristal de colesterol (2mg/mL), ambos ou apenas meio de cultura (s/ est). Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 8 horas de estímulo e as citocinas IL-1 β (A) e TNF- α (B) foram avaliadas por ELISA. Resultados representativos de quatro experimentos independentes. Cada barra representa a média \pm SEM. * $p \leq 0,05$ em relação a s/e; $^+ p \leq 0,05$ em relação a LPS + cristal de colesterol. Símbolos de cor azul mostram comparações entre culturas de macrófagos M1; símbolos vermelhos comparam culturas de macrófagos M2 (Teste t pareado). # $p \leq 0,05$, Teste t. ND = não detectado.

Produção de IL-1 β por macrófagos THP/M ϕ , M1a, M2a e M2c derivados de células THP-1

As células THP-1 são células de linhagem monocítica, frequentemente empregadas para investigações *in vitro* do papel de macrófagos humanos (114), já que após estímulo com PMA são capazes de se diferenciar. Além disso, conforme o tipo de citocina adicionada, macrófagos com perfis distintos podem ser gerados, a saber, M1 (inflamatório), M2a e M2c (compõem um continuum de populações imunomoduladoras, além de outras funções).

Após diferenciação *in vitro*, as subpopulações celulares foram estimuladas da mesma forma como aquela procedida com monócitos e macrófagos M1 e M2 derivados de monócitos. A estimulação apenas com cristal de colesterol ou LPS induziu produção de níveis relativamente baixos de IL-1 β em todas as populações avaliadas. Há que se observar, todavia, que M1, após estímulo com cristal de colesterol, produziu muito mais IL-1 β que os outros subtipos de macrófagos (figura 22A). A presença de cristais de colesterol e LPS teve um efeito aditivo notável em todas as culturas, resultando em grande produção da citocina em questão (figura 22A), o mesmo observado no sobrenadante de cultura de monócitos (figura 18A) e macrófagos M1 e M2 (figura 21A).

A produção de TNF- α foi fortemente estimulada por LPS e a presença concomitante de cristal de colesterol não representou aumento na produção dessa citocina por nenhuma das populações de macrófagos (figura 22B). Curiosamente, as células M1 foram as únicas produtoras de TNF- α frente ao estímulo com cristal de colesterol ou mesmo na ausência de qualquer estímulo.

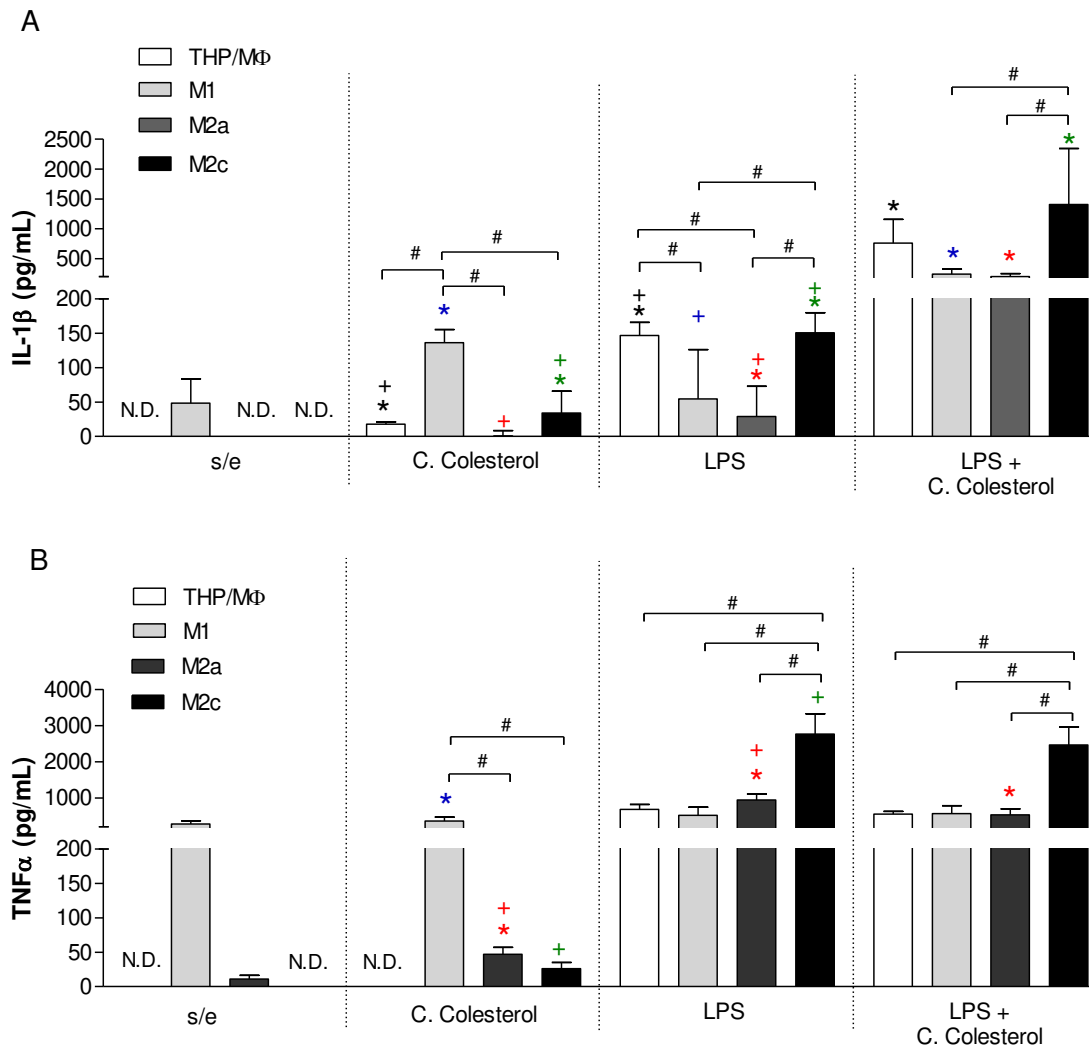


Figura 22. Produção de IL-1 β e TNF- α por macrófagos THP/M ϕ , M1, M2a e M2c derivados de células THP-1. Células THP-1 foram diferenciadas em macrófagos na presença de PMA por 24 horas. Os subtipos de macrófagos THP/M ϕ , M1, M2a, e M2c foram obtidos após adição apenas de meio de cultura suplementado, LPS (20ng/mL) + IFN- γ (20ng/mL), IL-4 (20ng/mL) ou IL-10 (20ng/mL), respectivamente. Cada população foi cultivada ($0,25 \times 10^6$ células/mL) na presença de LPS (20ng/mL), cristal de colesterol (2mg/mL), ambos ou apenas meio de cultura (s/ est). Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 8 horas de estímulo e as citocinas IL-1 β (A) e TNF- α (B) foram avaliadas por ELISA. Resultados representativos de cinco experimentos independentes. Cada barra representa a média \pm SEM. * $p \leq 0,05$ em relação a s/e; + $p \leq 0,05$ em relação a LPS + cristal de colesterol. Símbolos em preto mostram comparações entre culturas de células THP/M ϕ ; símbolos na cor azul comparam macrófagos M1; símbolos em vermelho comparam macrófagos M2a; símbolos verdes comparam macrófagos M2c (Teste t pareado). # $p \leq 0,05$, ANOVA com pós-teste de Bonferroni. ND = não detectado.

Avaliação do efeito de inibidores específicos na produção de IL-1 β por macrófagos derivados de células THP-1

Para tentar identificar a via de sinalização envolvida na ativação do NLRP3 em nosso modelo celular, células THP/M ϕ foram geradas e estimuladas com LPS + cristais de colesterol na presença ou ausência de diversos inibidores: 1) citocalasina D, metabólito fúngico com potente capacidade de inibir a polimerização da actina, impedindo a fagocitose; 2) CA074, inibidor de catepsina B; 3) Bafilomicina, inibidor de H⁺-ATPase vacuolar, que atua impedindo a acidificação de fagossomo; 4) N-acetil-L-cisteína, agente antioxidante que inibe a produção de reativos intermediários de oxigênio.

Além disso, tentamos inibir diretamente o NLRP3 usando Bay 11-7082 e Partenolida. Ainda que originalmente descritos como inibidores do fator de transcrição NF-kB [29], trabalho recente mostrou que Bay 11-7082 provoca inibição do NLRP3 e Partenolida pode promover a inibição de vários inflamassomas [29]. Finalmente, foi utilizado o composto Z-WEHD-FMK, que inibe as caspases inflamatórias de maneira específica, promovendo a inibição da produção de IL-1 β .

Após 8 horas de cultura na presença do inibidor o sobrenadante foi coletado para avaliação dos níveis de IL-1 β e TNF- α . A figura 23A mostra que, ainda que em diferentes níveis, a maioria dos inibidores testados foi capaz de inibir a produção da citocina IL-1 β . A única exceção foi N-acetil-L-cisteína que aumentou a produção dessa citocina.

Para averiguar a especificidade da interferência dos inibidores na produção de IL-1 β , medimos também os níveis de TNF- α no sobrenadante, já que, após estimulação com LPS, a via de ativação necessária é a do NF-kB. Verificamos que os inibidores Citocalasina,

CA074, Bafilomicina e Z-WEHD-FMK atuaram de forma específica, já que a produção de TNF- α nas culturas em que estavam presentes não foi significativamente diferente da produção dessa citocina na cultura controle (LPS+cristal) (figura 23B). Além disso, conforme esperado, observamos efeito bastante significativo dos inibidores Partenolida e Bay-7082. Verificamos ainda que a N-acetil-L-cisteína também foi capaz de inibir consideravelmente a produção de TNF- α (figura 23B).

Como os inibidores testados foram diluídos em DMSO, foi realizado experimento controle no qual estimulamos macrófagos derivados de células THP-1 com LPS+cristal na presença do solvente, com o objetivo de excluir a ocorrência de morte celular. Os resultados mostraram produção normal de IL- β confirmando a viabilidade celular (dados não mostrados).

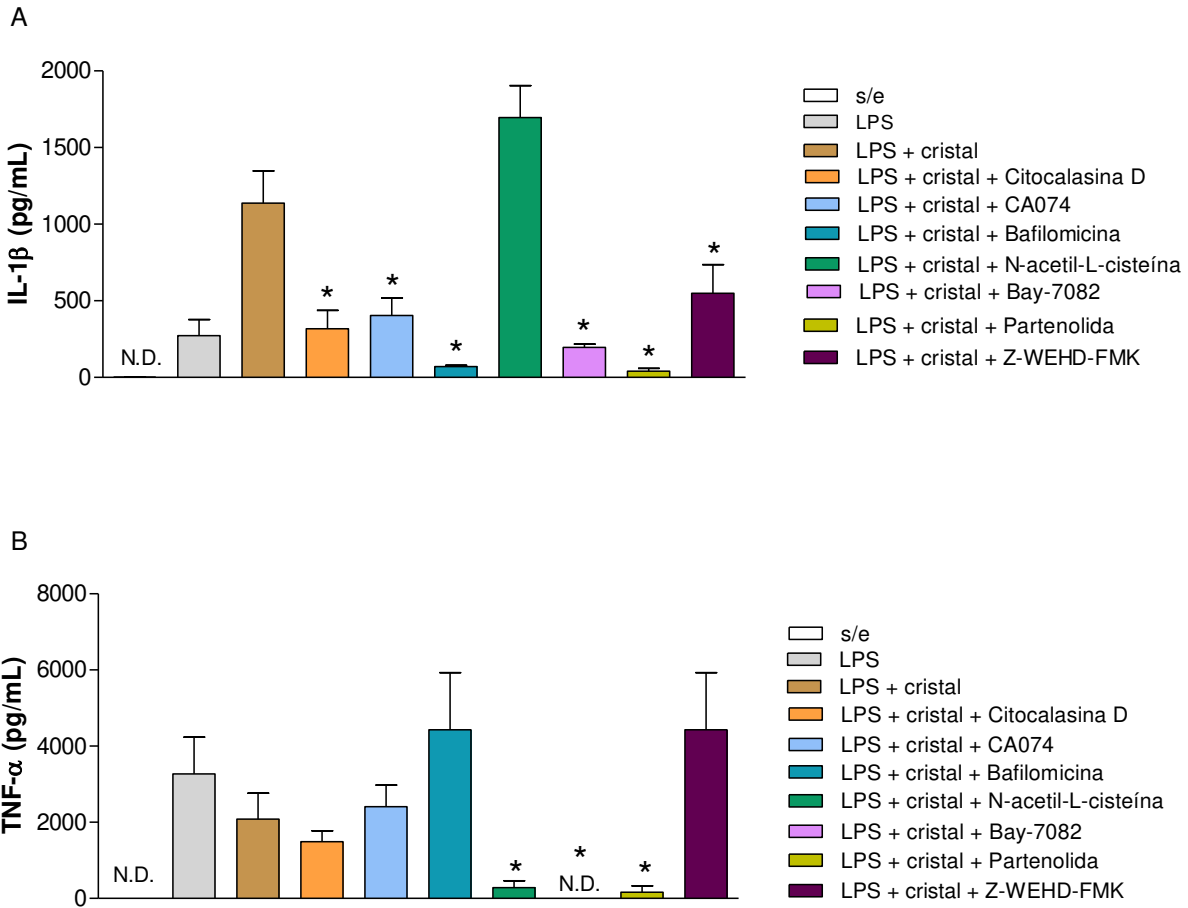


Figura 23. Produção de IL-1 β e TNF- α por células THP/M ϕ na presença de diversas classes de inibidores. Células THP-1/M ϕ foram cultivadas ($0,25 \times 10^6$ células/mL) na presença apenas de meio de cultura (s/e), LPS (20ng/mL), LPS (20ng/mL) + cristal de colesterol (2mg/mL) ou LPS (20ng/mL) + cristal de colesterol (2mg/mL) e inibidor (Citocalasina D [2 μ M], CA074 [20 μ M], Bafilomicina [20 μ M], N-acetil-L-cisteína [20 μ M], Bay 11-7082 [24 μ M], Partenolida [20 μ M], Z-WEHD-FMK [10 μ M]). Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 8 horas de estímulo e as citocinas IL-1 β (A) e TNF- α (B) foram avaliadas por ELISA. Resultados representativos de cinco experimentos independentes. Cada barra representa a média \pm SEM, com * $p \leq 0,05$ em relação a LPS + cristal. Teste t pareado. ND=não detectado

4.4. Avaliação da atividade da citocina IL-1 β na produção de mediadores inflamatórios por células musculares lisas e células endoteliais

Estudos experimentais mostraram menor desenvolvimento da placa aterosclerótica em camundongos deficientes em IL-1 β e aumento da lesão em animais expostos ao excesso dessa citocina (82). Em humanos, IL-1 β foi detectada em concentrações mais elevadas em artérias coronárias com lesão aterosclerótica quando compara a artérias normais (115-118). Macrófagos, após reconhecerem cristais de colesterol e outros estímulos aterogênicos, como a LDL oxidada, passam a produzir IL-1 β ativa (clivada). Essa citocina, além da ação autócrina, modifica o microambiente da lesão pela ativação de outros grupos celulares, como células endoteliais e células musculares lisas (7,96).

Tendo em vista a participação fundamental da IL-1 β na aterogênese e no agravamento do processo inflamatório na lesão já instalada, procuramos avaliar a ação dessa citocina na produção de mediadores inflamatórios - metaloproteinases, catepsinas e quimiocinas - sobre células musculares lisas e células endoteliais.

Produção de catepsinas e metaloproteinases por células musculares lisas após estímulo com IL-1 β

Primeiramente, avaliamos a produção *in vitro* das catepsinas S e L e das metaloproteinases 3 (MMP3), 6 (MMP6) e 9 (MMP9) por células musculares lisas de aorta humana (HVSMSs) após estímulo com a citocina recombinante IL1- β . A adição de IL-1 β teve efeito significativo na produção de catepsina S (figura 24B) e a MMP3 (figura D) por HVSMSs estimuladas, quando comparado às células não estimuladas, que produziram

níveis muito baixos dessas proteases. Em relação a catepsina L e MMP1 os níveis basais (HVSMCs não estimuladas) já estavam elevados e não observamos incremento nessa produção após estímulo com IL-1 β (figura 24A e C). Em nossos experimentos não conseguimos detectar MMP9, mesmo após estimulação com IL-1 β (dados não mostrados).

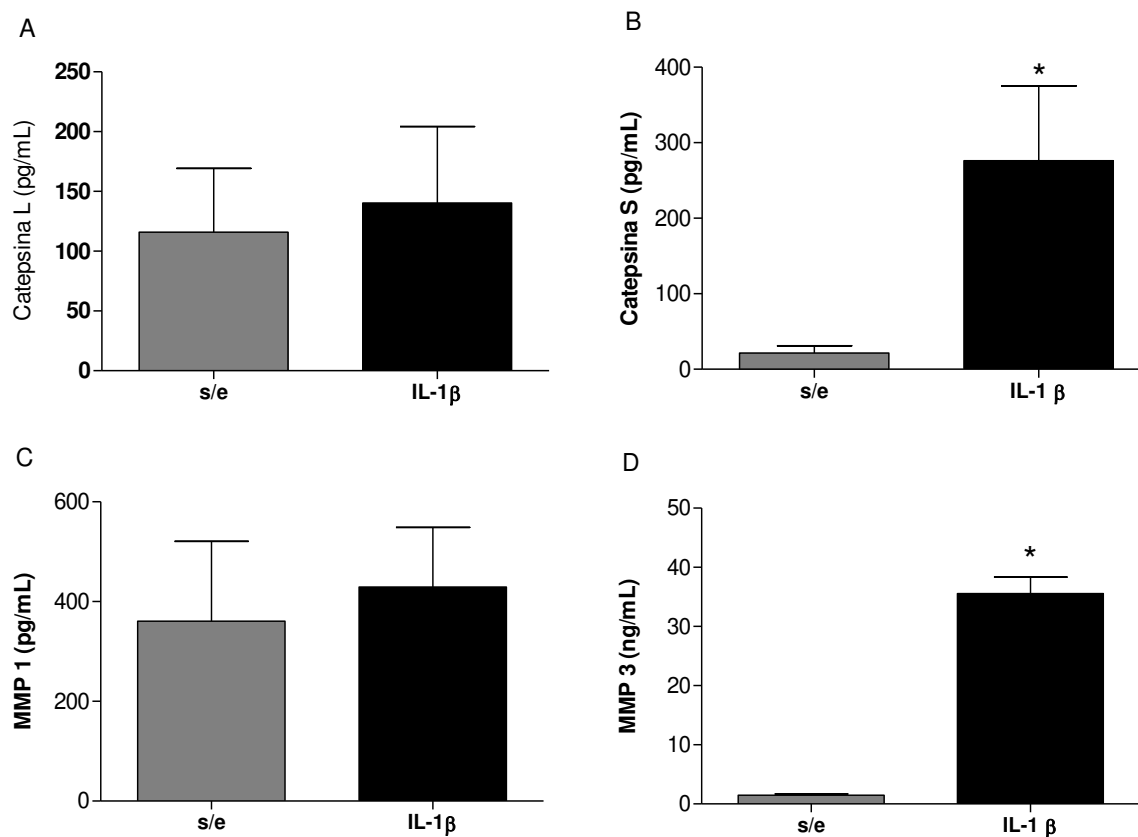


Figura 24. Produção de catepsinas e metaloproteinases por células HVSMCs estimuladas com IL-1 β . HVSMCs foram cultivadas na presença apenas de meio de cultura (s/e) ou IL-1 β (1ng/mL). Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 24 horas de estímulo e os níveis de catepsina L (A), S (B), MMP1 (C) e MMP3 (D) foram avaliados por ELISA. Resultados representativos de seis experimentos independentes. Cada barra representa a média \pm SEM, com * $p \leq 0,05$ em relação a s/e. Teste t pareado.

Produção de quimiocinas por células musculares lisas e células endoteliais após estímulo com IL-1 β

Células musculares lisas de aorta humana (HVSMCs) e células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs) foram usadas para avaliação do efeito da IL-1 β na produção de quimiocinas. As quimiocinas avaliadas foram CCL2, CXCL8 e CCL5, importantes na quimiotaxia de monócitos, CXCL10, CXCL9 e CXCL16, quimioatraentes principalmente de linfócitos, e CX₃CL1, quimiocina tanto de monócitos quanto de linfócitos. Com relação à produção de CCL2 (figura 25A), CXCL8 (figura 25B) e CCL5 (figura 25C) observamos que tanto as HVSMCs como as HUVECs responderam à presença de IL-1 β , aumentando a produção das quimiocinas. É interessante notar que a produção de CXCL8 foi muito maior que a das outras quimiocinas (figura 25B). CXCL10 e CXCL16 foram produzidas apenas por células endoteliais e após estimulação (figura 25D e E). Verificamos que a quimiocina CXCL16 é produzida espontaneamente por HUVECs em níveis consideráveis e que a adição de IL-1 β aumenta sua produção, mas não significativamente (Figura 25E). A quimiocina CXCL9 não foi detectada no sobrenadante de nenhum dos tipos celulares, mesmo após estimulação com IL-1 β (dados não mostrados)

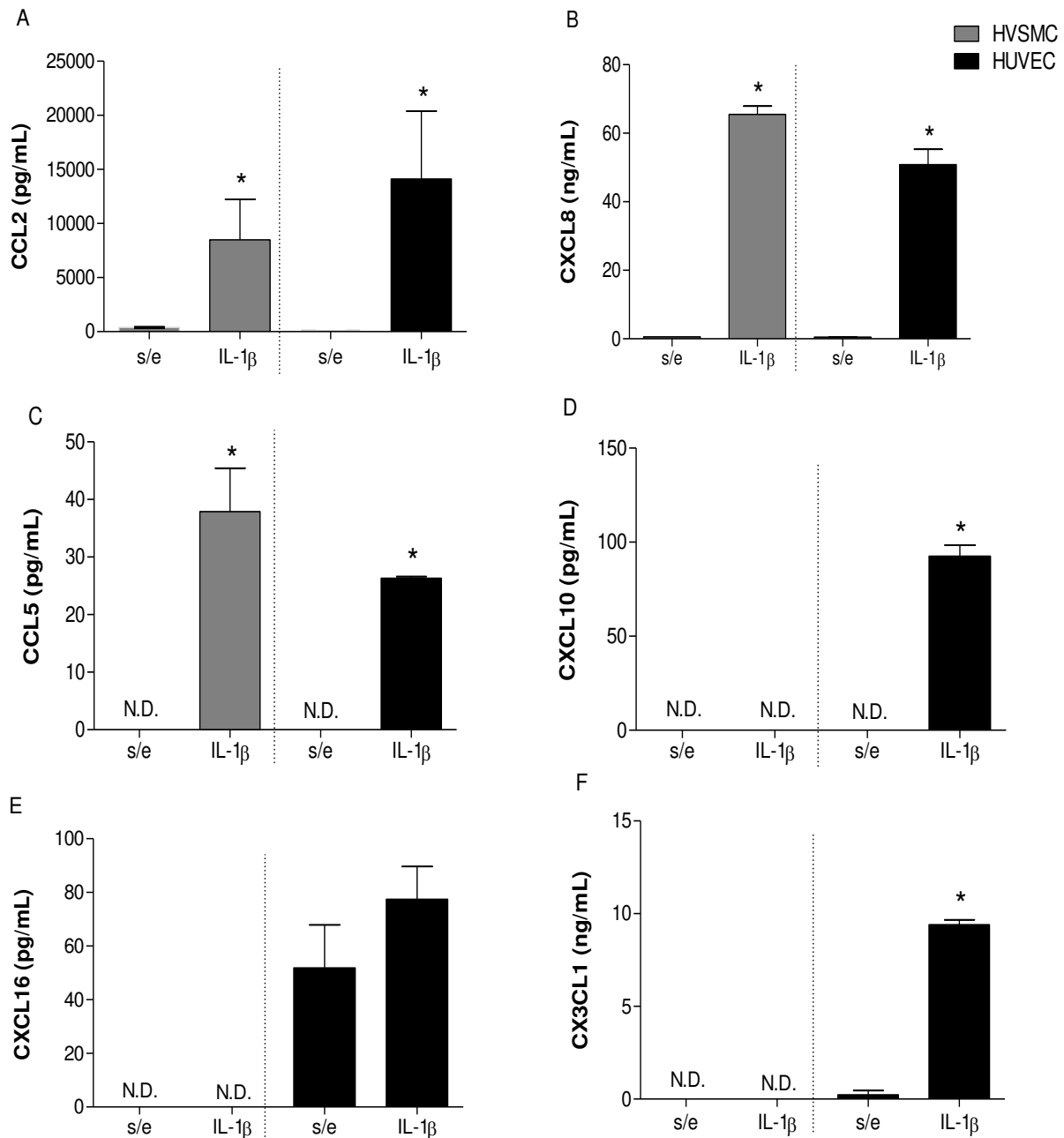


Figura 25. Produção de quimiocinas por células HVSMCs e HUVECs estimuladas com IL-1 β .

HVSMCs e HUVECs foram cultivadas na presença apenas de meio de cultura (s/e) ou IL-1 β (1ng/mL). Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 24 horas de estímulo e os níveis de CCL2 (A), CXCL8 (B), CCL5 (C), CXCL10 (D), CXCL16 (E) e CX3CL1 (F) foram avaliados por ELISA. Resultados representativos de seis experimentos independentes. Cada barra representa a média \pm SEM, com * $p \leq 0,05$ em relação a s/e. Teste t pareado. ND= não detectado.

5. Discussão



Diversos trabalhos mostram o papel crucial da resposta inflamatória nos eventos iniciais e no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas. Além disso, também é claro o envolvimento da inflamação nos mecanismos responsáveis pela desestabilização e ruptura das placas, que podem culminar, por exemplo, em infarto agudo do miocárdio ou acidente vascular cerebral (6,7,96).

A ativação da resposta imunológica inata na aterogênese é um evento em que a participação de macrófagos é preponderante, sendo essas células as mais abundantes na lesão (23). Os macrófagos presentes na íntima arterial expressam uma variedade de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), dentre eles os receptores do tipo NOD (NLRs) (8,31). Proteínas NLRs são sensores citoplasmáticos e estão envolvidos na ativação do fator de transcrição NF- κ B, morte celular por piroptose, regulação da sinalização de vias inflamatórias, transcrição do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) e processamento de caspase-1 com consequente liberação de potentes citocinas inflamatórias como IL-1 β e IL-18 através da formação de inflamassomas (42,43,60).

Os inflamassomas estão relacionados ao desenvolvimento de diversas doenças de caráter inflamatório, como doença inflamatória intestinal, vitiligo, gota e diabetes do tipo 1 e 2 (119-122).

Em estudo anterior, observamos a presença de macrófagos positivos para IL-18 ao redor de cristais de colesterol em amostra de lesão aterosclerótica proveniente de endarterectomia carotídea (95). Tendo em vista estudos recentes que apontam o papel crucial da ativação de receptores do tipo NOD para promover a clivagem e liberação da forma biologicamente ativa da IL-18 (assim como IL-1 β) (60,62,77), nosso achado

representou um indicativo da presença dessa plataforma multiproteica nas lesões de ateroma. A fim de aprofundar a investigação, nesse trabalho avaliamos a expressão de RNAm e proteína de alguns NLRs formadores de inflamassomas em amostras de lesões humanas. As proteínas estudadas foram NLRP1, NLRP3, NLRC4 e NAIP. AIM2, membro da família HIN200 de proteínas que reconhecem DNA, também foi incluída nesse grupo já que é capaz de oligomerizar, formar inflamassoma e promover processamento de IL-1 β e IL-18 (65).

Nossos resultados de expressão gênica revelaram a presença de NLRP1, P3, C4 e NAIP, além de AIM2 nas lesões de ateroma humano. Entretanto, pacientes assintomáticos apresentaram maior expressão relativa de NLRP1, NLRP3, NLRC4 e NAIP quando comparados ao grupo sintomático. Esses achados contrastaram com as expectativas, uma vez que expressão elevada de NLRs tem sido associada a doenças inflamatórias (123). As diferenças observadas entre as amostras de pacientes sintomáticos e assintomáticos podem estar associadas a polimorfismos nos genes codificadores de NLRs. Hermansson *et al.* (124) encontraram baixa expressão do RNAm para NLRP3 em tecido cardíaco isquêmico em comparação ao tecido controle associando tal achado à presença de polimorfismos no gene para NLRP3, que poderia contribuir para o aumento da resposta inflamatória nesse tecido.

Ao avaliar a presença da proteína, observamos grande quantidade de marcações positivas para NLRP1, NLRP3 e AIM2 em macrófagos células gigantes e células espumosas. Não encontramos diferenças na área total de marcação com NLRP3 e AIM2, mas a presença desses receptores indica seu possível envolvimento no processo de ativação de

macrófagos a antígenos presentes no microambiente das lesões. A única exceção foi maior área marcada por NLRP3 em pacientes tabagistas, sugerindo ação nociva do tabaco.

Uma característica em comum dos inflamassomas é a necessidade da proteína adaptadora ASC, que tem a função de recrutar caspase-1 (109). Trabalhos experimentais mostram que camundongos C57BL/6 ASC^{-/-} apresentam menor desenvolvimento de lesões na íntima vascular após injúria, com diminuição da expressão de IL-1 β e IL-18, resultando em diminuição da inflamação vascular (102). A análise dos dados de expressão gênica mostraram que lesões de ateroma humano expressam RNAm para ASC, sendo ela maior em amostras provenientes de pacientes assintomáticos. Esse dado está em acordo com os achados anteriores e, de forma geral, indicam a presença e ativação de inflamassomas em lesão de ateroma.

A ativação de inflamassomas pode promover o recrutamento e ativação da caspase-1 (125). A caspase-1 está presente no citoplasma de células fagocíticas como um zimógeno inativo e, após estimulação por sinais microbianos ou endógenos, sofre autoativação proteolítica tornando-se um heterodímero enzimaticamente ativo (63). Essa protease é essencial para a clivagem da pró-IL-1 β e pró-IL-18 nas suas formas biologicamente ativas (58). Nossos dados mostraram a presença do RNAm de caspase-1 e IL-1 β em todas as lesões analisadas, embora não tenha sido observado diferenças na expressão entre pacientes sintomáticos e assintomáticos. Também foi detectada grande quantidade de caspase-1 em macrófagos e células gigantes presentes em lesões ateroscleróticas por imuno-histoquímica. Em alguns casos foram observadas células gigantes positivas para caspase-1 envolvendo cristais de colesterol sugerindo um possível

mecanismo de ativação e produção desta protease por macrófagos. As amostras de lesões de pacientes sintomáticos apresentaram maior área marcada para caspase-1, quando comparado às placas de pacientes assintomáticos. Embora não tenham sido observadas diferenças quanto a expressão gênica, a detecção de maiores quantidades da proteína em pacientes sintomáticos poderia estar relacionada à maior gravidade do quadro clínico, tendo em vista o papel crucial da caspase-1 na geração de IL-1 β e IL-18 e consequente aumento da resposta inflamatória.

NLRC1 e NLRC2 foram os primeiros membros da família dos NLRs a serem identificados e estudados, sendo esses receptores capazes de detectar fragmentos da parede bacteriana (53-55,57,89). Antes mesmo da hipótese do envolvimento dos lipídeos, patologistas acreditavam que a aterosclerose podia ter origem infecciosa baseado nas características micro e macroscópicas das lesões. Entre os agentes que promovem aterosclerose em modelos animais e têm associação com a patologia em humanos estão: *C. pneumoniae*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans*, *H. pylori* e citomegalovirus (126). Diversos autores mostraram a presença de agentes infecciosos nas lesões e sugerem que isso possa levar à formação e agravamento de lesões ateroscleróticas por disfunção endotelial e ativação de cascatas de sinalização inflamatórias. Por exemplo, *Chlamydomphila pneumoniae* foi detectada em estrias gordurosas e placas ateroscleróticas (127) e Opitz *et. al.* (2005) (89) mostraram que células endoteliais humanas reconhecem essa bactéria via NLRC1 e passam a produzir CXCL8. Outros estudos mostram que periodontite aumenta de forma significativa o risco

de aterosclerose (128), sendo *Treponema denticola* associada à doença periodontal e injúria cardiovascular graças a indução da expressão de HSP70 e hemoxigenase 1 (129).

Nossos dados mostram a expressão do RNAm para NLRC1 e NLRC2 em todas as amostras avaliadas, com maior expressão relativa do NLRC2 em amostras de pacientes assintomáticos em relação às amostras de sintomáticos. A presença desses dois receptores indica que macrófagos de lesão de ateroma estão mais suscetíveis à ativação por antígenos microbianos provenientes de infecções adquiridas durante o processo de aterogênese. A pesquisa do NLRC2 por imuno-histoquímica mostrou grande expressão dessa proteína em macrófagos presentes nas lesões, dado em acordo com trabalho publicado por Mokhtari et al (2007). Além disso, a presença do polimorfismo Leu1007fsinsC no NLRC2 está associada com aumento do risco de desestabilização das lesões em pacientes com doença aterosclerótica (130). Dessa forma, seria interessante investigar se lesões com maior quantidade de marcação positiva são provenientes de pacientes com altos títulos de anticorpos para doenças infecciosas, como citomegalovírus e clamídia o que iria corroborar nossos achados de expressão de NLRC1 e C2 em lesões de ateroma.

Identificamos também a expressão do RNAm para NLRC3, NLRC5 e NLRP2 que podem ter funções imunorreguladoras (44,62,109). A análise desses dados mostrou que as amostras de ateroma apresentam expressão do RNAm de NLRC3, NLRC5 e NLRP2, mas, novamente, observamos maior expressão em pacientes assintomáticos. Além disso, detectamos intensa marcação para NLRC3 em macrófagos e células espumosas, mas baixa quantidade de marcação para NLRC5 em lesões de ateroma. Este é o primeiro relato da

presença desse grupo de NLRs em lesões de ateroma humano. Schneider et. al. (131) mostraram experimentalmente que NLRC3 inibe a sinalização de TLR6 pela modificação da proteína sinalizadora TRAF6. NLRC5 parece ser importante regulador da resposta inata antiviral e também pode atuar como um regulador negativo da resposta inflamatória ao impedir a ativação do fator de transcrição NF- κ B (49,132). NLRP2, também foi encontrado com maior expressão relativa em pacientes assintomáticos comparado aos sintomáticos NLRP2. Inicialmente associado à inibição da via de sinalização de NF- κ B (133), também foi encontrado sendo expresso durante a diferenciação de progenitores hematopoiéticos e células-tronco (134). Entretanto, trabalho recente associou a presença de NLRP2 em astrócitos humanos à inflamação e danos no sistema nervoso central (135). Esses achados contraditórios evidenciam a necessidade de mais estudos envolvendo envolvam NLRP2.

Pouco é conhecido sobre a atividade desses receptores na ativação e controle da resposta imunológica inata, especialmente no contexto da aterosclerose, mas a expressão aumentada de NLRC3, NLRC5 e, parcialmente, NLRP2 em lesões de ateroma de pacientes assintomáticos pode estar associada a algum mecanismo de *feedback* negativo acionado para conter a ativação excessiva do fator de transcrição NF- κ B, reduzindo a resposta inflamatória no ambiente aterosclerótico e, conseqüente, promovendo estabilidade das lesões.

A expressão relativa de NLRP3, NLRC4, NLRC2, NLRC3 e caspase-1 foi maior em amostras de lesão na comparação com amostras controle, mas esses resultados devem ser analisados com cautela, tendo em vista o pequeno número de amostras controle (n=3). O agrupamento dos pacientes segundo fatores de risco (hipertensão arterial,

consumo de tabaco e gênero) também não revelou diferença estatística na expressão de nenhum RNAm analisado, mostrando não haver uma correlação direta entre eles.

A participação de macrófagos na ativação da resposta inata na aterogênese é preponderante, sendo essas células responsáveis pelo reconhecimento de antígenos como a LDLox e a HSP60 presentes na íntima arterial (6,7). Em trabalho anterior mostramos que a LDLox estimula a produção de grande quantidade de CCL2 por CMSPs de pacientes com doença aterosclerótica documentada (angina estável e instável). Essa quimiocina recruta monócitos e, provavelmente, está envolvida no aumento da quantidade de macrófagos nas lesões. Conforme já comentado, um achado interessante de nosso grupo foi a presença de macrófagos positivos para IL-18 ao redor de cristais de colesterol (95), aos quais tem sido atribuído importante papel na aterosclerose (31,109-111). Partindo deste achado, foram realizados experimentos para identificar o potencial de cristais de colesterol em induzir a produção de IL-1 β por monócitos humanos e por subpopulações de macrófagos. Diferenciamos macrófagos humanos *in vitro* nos subtipos M1 ou M2, e também utilizamos células da linhagem THP-1, as quais foram diferenciadas em quatro populações de macrófagos - THP/M ϕ , M1, M2a e M2c. O estímulo de monócitos humanos, macrófagos M1 ou M2 e células derivadas da linhagem THP-1 apenas com cristais de colesterol não levou a produção aumentada de IL-1 β . Entretanto, a associação de LPS e cristais de colesterol induziu grande produção da citocina em todos os tipos celulares investigados. Esses resultados estão de acordo com dados recentes da literatura que indicam um papel importante dos cristais de colesterol na indução da produção de IL-1 β por macrófagos [20, 38].

Após estimulação com LPS, os macrófagos anti-inflamatórios (subtipo M2 humano e M2c derivado da linhagem THP-1) apresentaram grande capacidade produtora de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β . Diversos trabalhos têm mostrado que as populações de macrófagos apresentam plasticidade fenotípica, moldando-se ao microambiente em que estão presente [39, 40]. Nesse contexto, uma célula altamente inflamatória (M1), necessária para os estágios iniciais da resposta imunológica a patógenos, pode tornar-se uma célula anti-inflamatória após a eliminação do estímulo inflamatório e a necessidade de processos de reparo tecidual. O inverso também pode ocorrer e nossos resultados sugerem que, após estímulo com LPS os macrófagos M2 podem ter se tornado células inflamatórias, do subtipo M1, passando a promover resposta inflamatória intensa.

A produção diferencial de IL-1 β e TNF- α no sobrenadante das culturas de monócitos e macrófagos evidenciou a independência das vias de ativação dessas citocinas. A produção de TNF- α foi estimulada pelo reconhecimento do LPS por TLR4 e consequente ativação de NF- κ B (31,46). Por outro lado, a liberação de IL-1 β ativa necessita, além desse primeiro estímulo, de um antígeno particulado (no caso, cristal de colesterol) que irá disparar a formação do inflamassoma NLRP3 (110,111,113).

O estudo da participação dos inflamassomas no processo aterosclerótico ainda é muito incipiente, com resultados mostrando apenas a participação e ativação do NLRP3. Em trabalho pioneiro Duewell *et al* (2010) (110) mostraram que a presença de cristais de colesterol nas lesões ateroscleróticas coincide com a migração das primeiras células inflamatórias em camundongos submetidos a dieta hipercolesterolêmica. Além disso,

utilizando um modelo de transplante de células de medula óssea em camundongos propensos a desenvolver aterosclerose ($LDLR^{-/-}$), os autores mostraram que a deficiência de NLRP3 ou ASC promove diminuição da formação precoce de ateromas nesses animais. Também foi demonstrado que o estímulo com cristais de colesterol induz a produção de IL-1 β em macrófagos humanos dependente do inflamassoma formado pelo NLRP3 (113). Por outro lado, trabalho no qual se utilizou camundongos ApoE $^{-/-}$ e NLRP3 deficientes não foi observada redução na formação da lesão (136). Embora os resultados relacionados à progressão do ateroma em modelos experimentais sejam contraditórios, não há dúvida de os cristais de colesterol presentes nas lesões funcionam como um sinal de perigo, ativando macrófagos via NLRP3. Além disso, propõe-se que esse inflamassoma possa ser ativado por mecanismos que envolvem aumento do efluxo de potássio, produção de reativos intermediários do oxigênio (geradas na mitocôndria e por NADPH oxidases residentes nos fagócitos) e liberação de catepsina B como consequência da ruptura de lisossomos após fagocitose de material particulado (76-80).

Alguns experimentos foram realizados na tentativa de identificar a via de ativação do NLRP3, responsável pela produção de IL-1 β em células THP-1/M ϕ estimuladas com cristais de colesterol. Nesses experimentos utilizamos diferentes classes de inibidores, testando dois mecanismos atualmente propostos para ativação indireta de NLRP3: produção de ROS e liberação de catepsina B. CA074, inibidor de catepsina B, foi capaz de inibir a produção de IL1- β . Isso pode ser indicativo que sua presença é importante para a montagem do inflamassoma e liberação de IL1- β . Citocalasina D, um potente inibidor da polimerização de actina e Bafilomicina, inibidor de acidificação de fagossoma, também

foram capazes de inibir a produção da citocina em questão. Esses achados estão em acordo com a literatura, pois já está bem estabelecido que a fagocitose de antígenos particulados promove ruptura de fagossoma, com consequente liberação de catepsina B (79).

Também avaliamos o papel da inibição direta de NLRP3 e do produto da sua ativação, a caspase-1. A utilização de Partenolida, Bay-11-7082 e inibidor de caspase-1 foram capazes de impedir a produção de IL-1 β . Entretanto, os inibidores de NLRP3 utilizados também interferem com a via de sinalização do NF-kB, de forma que não podemos afirmar que os cristais de colesterol estão ativando de maneira direta o NLRP3. Por outro lado, a inibição da caspase-1 fornece um dado concreto da ativação do NLRP3 por inibir justamente a principal via de sinalização deste receptor.

Para finalizar, testamos outra via de ativação do NLRP3, a produção de reativos intermediários do oxigênio. Para nossa surpresa, o tratamento com N-acetil-L-cisteína, agente antioxidante que impede a produção de reativos intermediários do oxigênio (ROS), não foi capaz de reduzir a liberação da citocina. Em conjunto, esses achados indicam a importância da fagocitose e liberação de catepsina B para ativação de NLRP3 e consequente produção de IL-1 β frente ao estímulo com cristais de colesterol.

A aterosclerose é fortemente influenciada em todas as fases por mediadores inflamatórios produzidos pelas células do microambiente da lesão e, certamente, a IL-1 β ativa produzida por macrófagos pode ser destacada como um importante ativador de outros tipos celulares presentes no ateroma (6,58,96). Sob interferência dessa citocina,

células endoteliais e musculares lisas adquirem um caráter inflamatório e passam a produzir mediadores da inflamação, como proteases e quimiocinas (6,58,96).

Enzimas proteolíticas como metaloproteinases de matriz (MMPs) e catepsinas podem degradar matriz extra-celular e contribuir para a desestabilização da placa (137,138). Vários trabalhos mostram a presença de catepsinas em modelos experimentais e ateroma humano, sendo as diversas classes (S, K, L e V) detectadas em células musculares lisas, células endoteliais e macrófagos (138,139). Além disso, MMPs já foram extensivamente estudadas na aterosclerose com camundongos *knockout*, modelos de superexpressão ou análises genéticas relacionando polimorfismos a tendência de desestabilização de placas (137,140-143).

Nosso trabalho enfatizou a investigação *in vitro* da influência da IL-1 β sobre a produção de catepsinas e metaloproteínas por células musculares lisas (HVSMCs). Nossos achados mostraram que as células adquiriram caráter inflamatório após estimulação, já que detectamos níveis elevados de catepsina L, S, MMP1 e MMP3 no sobrenadante. A ação colagenolítica e elastinolítica dessas proteínas com certeza tem papel preponderante na desestabilização da placa.

A presença de quimiocinas no microambiente da lesão representa constante recrutamento de monócitos, linfócitos e perpetuação de todo o processo inflamatório corrente na lesão (144). Diversas classes de quimiocinas são expressas em modelos murinos e placas ateroscleróticas humanas, sendo a maior expressão de quimiocinas pro-inflamatórias e seus receptores correlacionada com a progressão das lesões em camundongos hiperlipidêmicos (144). Estudos com camundongos ApoE^{-/-} ou LDLr^{-/-}

deficientes para quimiocinas ou receptores de quimiocinas elucidaram o papel de várias desses mediadores no recrutamento de leucócitos para as lesões. Por exemplo, camundongos propensos a desenvolver aterosclerose e que também são deficientes em CCL2 ou CCR2 revelaram redução na formação da lesão. Em alguns desses modelos a atenuação da lesão também foi acompanhada de redução do número de macrófagos no arco aórtico (145-147).

Ao estimular células endoteliais e células musculares com IL-1 β observamos incremento na produção de quimiocinas importantes no recrutamento tanto de monócitos quanto de linfócitos. As HVSMEs produziram apenas CCL2, CXCL8 e CCL5, mas as HUVECs, além dessas quimiocinas, produziram também CXCL10, CX₃CL1 e CXCL16. Essa diferença pode representar uma maior importância das células endoteliais no recrutamento dos leucócitos ou mesmo maior sensibilidade à citocina IL-1 β . De qualquer forma, o recrutamento controlado de leucócitos é crucial para a geração da resposta imune, mas o tráfego inapropriado pode levar ao desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas, como a própria aterosclerose.

Em conjunto, nossos resultados mostraram que as lesões ateroscleróticas humanas expressam NLRs associados a diversas funções biológicas, entre eles o NLRC3, associados à modulação da resposta inflamatória, cuja presença foi relatada na aterosclerose até o momento. Além disso, ficou claro o papel-chave dos cristais de colesterol na ativação de monócitos e macrófagos, que passaram a produzir grandes quantidades da citocina inflamatória IL-1 β . Essa produção provavelmente se dá pela ativação de NLRP3, detectado em grande quantidade nas lesões ateroscleróticas analisadas. Os experimentos de

estimulação das células musculares lisas e endoteliais ressaltaram a importância da IL-1 β como agente inflamatório e desestabilizador das lesões.

Os avanços no entendimento da patogênese inflamatória da aterosclerose ainda são pouco traduzidos para a prática clínica. Abordagens terapêuticas que visam inibir a resposta inflamatória ainda não mostraram, de forma efetiva, um efeito na diminuição de eventos cardiovasculares. Nesse contexto, um estudo clínico em andamento está avaliando se a inibição da IL-1 β comparada com placebo pode reduzir as taxas de infarto do miocárdio recorrente, AVC e morte em pacientes com diabetes tipo 2, com alto risco vascular. Resultados parciais mostram diminuição de biomarcadores de inflamação como PCR, IL-6 e fibrinogênio (148).

6. Conclusão



Nosso trabalho mostrou a presença de RNAm e proteína de diversos NLRs em placas de ateroma humano, incluindo o NLRC3, relacionado à regulação resposta inflamatória, cuja presença foi descrita de forma inédita. Além disso, mostramos o papel dos cristais de colesterol na ativação de monócitos e macrófagos produtores de IL-1 β , provavelmente via NLRP3, expresso em grande quantidade nas placas analisadas. Finalmente, os experimentos de estimulação de células musculares lisas e endoteliais ressaltaram a importância da IL-1 β como agente inflamatório e desestabilizador das lesões, confirmando seu potencial como alvo terapêutico visando a contenção do processo inflamatório que caracteriza a aterosclerose.

7. Referências Bibliográficas



1. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol.* 2011; 12 (3): 204-12.
2. Medzhitov R, Shevach EM, Trinchieri G, Mellor AL, Munn DH, Gordon S et al. Highlights of 10 years of immunology in *Nature Reviews Immunology.* *Nat Rev Immunol.* 2011; 11 (10): 693-702.
3. Hosseinpoor AR, Bergen N, Mendis S, Harper S, Verdes E, Kunst A et al. Socioeconomic inequality in the prevalence of noncommunicable diseases in low- and middle-income countries: results from the World Health Survey. *BMC Public Health.* 2012; 12: 474.
4. Mendis S, Lindholm LH, Anderson SG, Alwan A, Koju R, Onwubere BJ et al. Total cardiovascular risk approach to improve efficiency of cardiovascular prevention in resource constrained settings. *J Clin Epidemiol.* 2011; 64 (12): 1451-62.
5. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB et al. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2013; 127 (1): e6-e245.
6. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6 (7): 508-19.
7. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol.* 2010; 12 (3): 204-12.
8. Lundberg AM, Yan ZQ. Innate immune recognition receptors and damage-associated molecular patterns in plaque inflammation. *Curr Opin Lipidol.* 2011; 22 (5): 343-9.
9. Hansson GK, Nilsson J. Introduction: atherosclerosis as inflammation: a controversial concept becomes accepted. *J Intern Med.* 2008; 263 (5): 462-3.
10. Swirski FK, Nahrendorf M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science.* 2013; 339 (6116): 161-6.
11. Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hulten LM, Wiklund O, Innerarity TL et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature.* 2002; 417 (6890): 750-4.
12. Lee JY, Lim S, Park S, Moon MH. Characterization of oxidized phospholipids in oxidatively modified low density lipoproteins by nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2013; 1288: 54-62.
13. Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2003; 14 (5): 421-30.
14. Dai G, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S, Zhang Y, Vaughn S, Blackman BR et al. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101 (41): 14871-6.
15. 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.
16. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18 (5): 842-51.
17. Zernecke A, Shagdarsuren E, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28 (11): 1897-908.
18. Zernecke A, Weber C. Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2010; 86 (2): 192-201.
19. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J et al. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 2007; 117 (1): 185-94.

20. 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) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*. 2008; 117 (13): 1649-57.
21. Saederup N, Chan L, Lira SA, Charo IF. Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2^{-/-} mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis. *Circulation*. 2008; 117 (13): 1642-8.
22. 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.
23. Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med*. 2002; 8 (11): 1235-42.
24. Ziegler-Heitbrock L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007; 81 (3): 584-92.
25. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008; 13: 453-61.
26. Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG et al. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol*. 2008; 18 (5): 349-55.
27. Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity*. 2005; 23 (4): 344-6.
28. Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol*. 2008; 181 (6): 3733-9.
29. Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, Compain C, Gaston AT, Clement M et al. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One*. 2010; 5 (1): e8852.
30. Hirata Y, Tabata M, Kurobe H, Motoki T, Akaike M, Nishio C et al. Coronary atherosclerosis is associated with macrophage polarization in epicardial adipose tissue. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 58 (3): 248-55.
31. Lundberg AM, Hansson GK. Innate immune signals in atherosclerosis. *Clin Immunol*. 2010; 134 (1): 5-24.
32. Manning-Tobin JJ, Moore KJ, Seimon TA, Bell SA, Sharuk M, Alvarez-Leite JJ et al. Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29 (1): 19-26.
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. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010; 11 (5): 373-84.
35. Curtiss LK, Tobias PS. Emerging role of Toll-like receptors in atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2009; 50 Suppl: S340-5.
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. Mullick AE, Soldau K, Kiosses 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.
38. 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.
39. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 1991; 88 (6): 1785-92.
 40. Miller YI, Choi SH, Bae YS. The SYK side of TLR4: signalling mechanisms in response to LPS and minimally oxidized LDL. *British Journal of Pharmacology.* 2012; 167: 990 - 9.
 41. 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.
 42. Kersse K, Bertrand MJ, Lamkanfi M, Vandenabeele P. NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011; 22 (5-6): 257-76.
 43. Kufer TA, Sansonetti PJ. NLR functions beyond pathogen recognition. *Nat Immunol.* 2011; 12 (2): 121-8.
 44. Ting JP, Duncan JA, Lei Y. How the noninflammasome NLRs function in the innate immune system. *Science.* 2010; 327 (5963): 286-90.
 45. Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis BK et al. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity.* 2008; 28 (3): 285-7.
 46. Monie TP, Bryant CE, Gay NJ. Activating immunity: lessons from the TLRs and NLRs. *Trends Biochem Sci.* 2009; 34 (11): 553-61.
 47. Hong M, Yoon SI, Wilson IA. Structure and functional characterization of the RNA-binding element of the NLRX1 innate immune modulator. *Immunity.* 2012; 36 (3): 337-47.
 48. Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, Jagirdar R et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol.* 2006; 7 (6): 576-82.
 49. Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI et al. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol.* 2006; 7 (6): 569-75.
 50. Miao EA, Mao DP, Yudkovsky N, Bonneau R, Lorang CG, Warren SE et al. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107 (7): 3076-80.
 51. Laroui H, Yan Y, Narui Y, Ingersoll SA, Ayyadurai S, Charania MA et al. L-Ala-gamma-D-Glu-meso-diaminopimelic acid (DAP) interacts directly with leucine-rich region domain of nucleotide-binding oligomerization domain 1, increasing phosphorylation activity of receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 and its interaction with nucleotide-binding oligomerization domain 1. *J Biol Chem.* 2011; 286 (35): 31003-13.
 52. Mo J, Boyle JP, Howard CB, Monie TP, Davis BK, Duncan JA. Pathogen sensing by nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2) is mediated by direct binding to muramyl dipeptide and ATP. *J Biol Chem.* 2011; 287 (27): 23057-67.
 53. Bonardi V, Cherkis K, Nishimura MT, Dangl JL. A new eye on NLR proteins: focused on clarity or diffused by complexity? *Curr Opin Immunol.* 2011; 24 (1): 41-50.
 54. Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science.* 2003; 300 (5625): 1584-7.
 55. Chamailard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol.* 2003; 4 (7): 702-7.

56. Opitz B, Puschel A, Beermann W, Hocke AC, Forster S, Schmeck B et al. *Listeria monocytogenes* activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells. *J Immunol.* 2006; 176 (1): 484-90.
57. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem.* 2003; 278 (11): 8869-72.
58. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 519-50.
59. Latz E. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. 2010; *Curr Opin Immunol.* 22 (1): 28-33.
60. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.* 2002; 10 (2): 417-26.
61. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ.* 2007; 14 (1): 10-22.
62. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 2010; 140 (6): 821-32.
63. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature.* 1992; 356 (6372): 768-74.
64. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature.* 2009; 458 (7237): 509-13.
65. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature.* 2009; 458 (7237): 514-8.
66. Kanneganti TD, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Whitfield J, Franchi L et al. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J Biol Chem.* 2006; 281 (48): 36560-8.
67. Kanneganti TD, Ozoren N, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Franchi L et al. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature.* 2006; 440 (7081): 233-6.
68. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature.* 2006; 440 (7081): 228-32.
69. Marina-Garcia N, Franchi L, Kim YG, Miller D, McDonald C, Boons GJ et al. Pannexin-1-mediated intracellular delivery of muramyl dipeptide induces caspase-1 activation via cryopyrin/NLRP3 independently of Nod2. *J Immunol.* 2008; 180 (6): 4050-7.
70. Muruve DA, Petrilli V, Zaiss AK, White LR, Clark SA, Ross PJ et al. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature.* 2008; 452 (7183): 103-7.
71. Yamasaki K, Muto J, Taylor KR, Cogen AL, Audish D, Bertin J et al. NLRP3/cryopyrin is necessary for interleukin-1beta (IL-1beta) release in response to hyaluronan, an endogenous trigger of inflammation in response to injury. *J Biol Chem.* 2009; 284 (19): 12762-71.
72. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science.* 2008; 320 (5876): 674-7.

73. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* 2008; 9 (8): 847-56.
74. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature.* 2006; 440 (7081): 237-41.
75. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol.* 2008; 9 (8): 857-65.
76. Haneklaus M, O'Neill LA, Coll RC. Modulatory mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome in inflammation: recent developments. *Curr Opin Immunol.* 2013; 25 (1): 40-5.
77. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol Rev.* 2009; 227 (1): 95-105.
78. Hoegen T, Tremel N, Klein M, Angele B, Wagner H, Kirschning C et al. The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release. *J Immunol.* 2011; 187 (10): 5440-51.
79. Niemi K, Teirila L, Lappalainen J, Rajamaki K, Baumann MH, Oorni K et al. Serum amyloid A activates the NLRP3 inflammasome via P2X7 receptor and a cathepsin B-sensitive pathway. *J Immunol.* 2011; 186 (11): 6119-28.
80. Rubartelli A. Redox control of NLRP3 inflammasome activation in health and disease. *J Leukoc Biol.* 2012; 92 (5): 951-8.
81. Isoda K, Sawada S, Ishigami N, Matsuki T, Miyazaki K, Kusuha 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.
82. Kiri H, Niwa T, Yamada Y, Wada H, Saito K, Iwakura Y et al. Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23 (4): 656-60.
83. de Nooijer R, von der Thusen JH, Verkleij CJ, Kuiper J, Jukema JW, van der Wall EE et al. Overexpression of IL-18 decreases intimal collagen content and promotes a vulnerable plaque phenotype in apolipoprotein-E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24 (12): 2313-9.
84. Elhage R, Jawien J, Rudling M, Ljunggren HG, Takeda K, Akira S et al. Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res.* 2003; 59 (1): 234-40.
85. 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-1beta:interleukin-1 receptor antagonist balance in atherosclerosis. *Circ J.* 2009; 73 (8): 1531-6.
86. Francis SE, Camp NJ, Dewberry RM, Gunn J, Syrris P, Carter ND et al. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and coronary artery disease. *Circulation.* 1999; 99 (7): 861-6.
87. 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.

88. 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.
89. Opitz B, Forster S, Hocke AC, Maass M, Schmeck B, Hippenstiel S et al. Nod1-mediated endothelial cell activation by *Chlamydomphila pneumoniae*. *Circ Res*. 2005; 96 (3): 319-26.
90. El Mokhtari NE, Ott SJ, Nebel A, Schafer A, Rosenstiel P, Forster M et al. Role of NOD2/CARD15 in coronary heart disease. *BMC Genet*. 2007; 8: 76.
91. Papaspyridonos M, Smith A, Burnand KG, Taylor P, Padayachee S, Suckling KE et al. Novel candidate genes in unstable areas of human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26 (8): 1837-44.
92. Andersson J, Libby P, Hansson GK. Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol*. 2010; 134 (1): 33-46.
93. Mallat Z, Ait-Oufella H, Tedgui A. Regulatory T cell responses: potential role in the control of atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2005; 16 (5): 518-24.
94. Taleb S, Tedgui A, Mallat Z. Adaptive T cell immune responses and atherogenesis. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10 (2): 197-202.
95. Oliveira RT, Silva RM, Teo FH, Mineiro MF, Ferreira MC, Altemani A et al. Detection of TCD4+ subsets in human carotid atheroma. *Cytokine*. 2013; 62 (1): 131-40.
96. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005; 352 (16): 1685-95.
97. Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*. 2006; 1: 297-329.
98. Fernandes JL, de Oliveira RT, Mamoni RL, Coelho OR, Nicolau JC, Blotta MH et al. Pentoxifylline reduces pro-inflammatory and increases anti-inflammatory activity in patients with coronary artery disease--a randomized placebo-controlled study. *Atherosclerosis*. 2008; 196 (1): 434-42.
99. Lopez-Franco O, Hernandez-Vargas P, Ortiz-Munoz G, Sanjuan G, Suzuki Y, Ortega L et al. Parthenolide modulates the NF-kappaB-mediated inflammatory responses in experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26 (8): 1864-70.
100. Krishnan N, Bencze G, Cohen P, Tonks NK. The anti-inflammatory compound BAY-11-7082 is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases. *FEBS J*. 2013; 280(12):2830-41
101. Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Datta P, Solorzano L, Yu JW et al. Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. *J Biol Chem*. 2010; 285 (13): 9792-802.
102. Yajima N, Takahashi M, Morimoto H, Shiba Y, Takahashi Y, Masumoto J et al. Critical role of bone marrow apoptosis-associated speck-like protein, an inflammasome adaptor molecule, in neointimal formation after vascular injury in mice. *Circulation*. 2008; 117 (24): 3079-87.
103. Knutson JA, Morse CJ, Eldrup-Jorgensen J, Estee M, Hayworth L, Herman TA et al. Carotid artery endarterectomy: A multidisciplinary approach to improving resource utilization and quality assurance. *J Vasc Nurs*. 2013; 31 (2): 84-91.
104. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29 (9): e45.
105. Flynn GL, Shah Y, Prakongpan S, Kwan KH, Higuchi WI, Hofmann AF. Cholesterol solubility in organic solvents. *J Pharm Sci*. 1979; 68 (9): 1090-7.
106. Breitling LP. Current Genetics and Epigenetics of Smoking/Tobacco-Related Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33(7):1468-72

107. Hsu S, Ton VK, Dominique Ashen M, Martin SS, Gluckman TJ, Kohli P et al. A Clinician's Guide to the ABCs of Cardiovascular Disease Prevention: The Johns Hopkins Ciccarone Center for the Prevention of Heart Disease and American College of Cardiology Cardiosource Approach to the Million Hearts Initiative. *Clin Cardiol.* 2013; 36(7):383-93
108. Winchester DE, Cooper-Dehoff RM, Gong Y, Handberg EM, Pepine CJ. Mortality Implications of Angina and Blood Pressure in Hypertensive Patients With Coronary Artery Disease: New Data From Extended Follow-up of the International Verapamil/Trandolapril Study (INVEST). *Clin Cardiol.* 2013; *Epub ahead of print*
109. Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29: 707-35.
110. 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.
111. Grebe A, Latz E. Cholesterol crystals and inflammation. *Curr Rheumatol Rep.* 2013; 15 (3): 313.
112. Ordovas-Montanes JM, Ordovas JM. Cholesterol, Inflammasomes, and Atherogenesis. *Curr Cardiovasc Risk Rep.* 2012; 6 (1): 45-52.
113. Rajamaki K, Lappalainen J, Oorni K, Valimaki E, Matikainen S, Kovanen PT et al. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One.* 2010; 5 (7): e11765.
114. Jeannesson E, Siest G, Zaiou M, Berrahmoune H, Masson C, Visvikis-Siest S. Genetic profiling of human cell lines used as in vitro model to study cardiovascular pathophysiology and pharmacotoxicology. *Cell Biol Toxicol.* 2009; 25 (6): 561-71.
115. Goldhammer E, Tanchilevitch A, Maor I, Beniamini Y, Rosenschein U, Sagiv M. Exercise training modulates cytokines activity in coronary heart disease patients. *Int J Cardiol.* 2005; 100 (1): 93-9.
116. Heinisch RH, Zanetti CR, Comin F, Fernandes JL, Ramires JA, Serrano CV, Jr. Serial changes in plasma levels of cytokines in patients with coronary artery disease. *Vasc Health Risk Manag.* 2005; 1 (3): 245-50.
117. Nijm J, Wikby A, Tompa A, Olsson AG, Jonasson L. Circulating levels of proinflammatory cytokines and neutrophil-platelet aggregates in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2005; 95 (4): 452-6.
118. Rueda-Clausen CF, Lopez-Jaramillo P, Luengas C, del Pilar Oubina M, Cachofeiro V, Lahera V. Inflammation but not endothelial dysfunction is associated with the severity of coronary artery disease in dyslipidemic subjects. *Mediators Inflamm.* 2009; 2009: 469169.
119. Banerjee M, Saxena M. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: role in type 2 diabetes. *Clin Chim Acta.* 2012; 413 (15-16): 1163-70.
120. Bauer C, Duewell P, Lehr HA, Endres S, Schnurr M. Protective and aggravating effects of Nlrp3 inflammasome activation in IBD models: influence of genetic and environmental factors. *Dig Dis.* 2012; 30 Suppl 1: 82-90.
121. Levandowski CB, Mailloux CM, Ferrara TM, Gowan K, Ben S, Jin Y et al. NLRP1 haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity increase interleukin-1beta processing via the NLRP1 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110 (8): 2952-6.
122. Zaki MH, Lamkanfi M, Kanneganti TD. The Nlrp3 inflammasome: contributions to intestinal homeostasis. *Trends Immunol.* 2011; 32 (4): 171-9.
123. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature.* 2012; 481 (7381): 278-86.

124. Hermansson C, Lundqvist A, Wasslavik C, Palmqvist L, Jeppsson A, Hulten LM. Reduced expression of NLRP3 and MEFV in human ischemic heart tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 430 (1): 425-8.
125. Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R, Nunez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol.* 2009; 10 (3): 241-7.
126. Rosenfeld ME, Campbell LA. Pathogens and atherosclerosis: update on the potential contribution of multiple infectious organisms to the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2011; 106 (5): 858-67.
127. Taylor-Robinson D, Thomas BJ. Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic tissue. *J Infect Dis.* 2000; 181 Suppl 3: S437-40.
128. Inaba H, Amano A. Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases--from molecular mechanisms to clinical cases: Implication of periodontal diseases in development of systemic diseases. *J Pharmacol Sci.* 2010; 113 (2): 103-9.
129. Bernardini C, Gaibani P, Zannoni A, Vocale C, Bacci ML, Piana G et al. Treponema denticola alters cell vitality and induces HO-1 and Hsp70 expression in porcine aortic endothelial cells. *Cell Stress Chaperones.* 2010; 15 (5): 509-16.
130. Galluzzo S, Patti G, Dicuonzo G, Di Sciascio G, Tonini G, Ferraro E et al. Association between NOD2/CARD15 polymorphisms and coronary artery disease: a case-control study. *Hum Immunol.* 2011; 72 (8): 636-40.
131. Schneider M, Zimmermann AG, Roberts RA, Zhang L, Swanson KV, Wen H et al. The innate immune sensor NLR3 attenuates Toll-like receptor signaling via modification of the signaling adaptor TRAF6 and transcription factor NF-kappaB. *Nat Immunol.* 2012; 13 (9): 823-31.
132. Cui J, Zhu L, Xia X, Wang HY, Legras X, Hong J et al. NLR5 negatively regulates the NF-kappaB and type I interferon signaling pathways. 2010; *Cell.* 141 (3): 483-96.
133. Bruey JM, Bruey-Sedano N, Newman R, Chandler S, Stehlik C, Reed JC. PAN1/NALP2/PYPAF2, an inducible inflammatory mediator that regulates NF-kappaB and caspase-1 activation in macrophages. *J Biol Chem.* 2004; 279 (50): 51897-907.
134. Fontalba A, Gutierrez O, Fernandez-Luna JL. NLRP2, an inhibitor of the NF-kappaB pathway, is transcriptionally activated by NF-kappaB and exhibits a nonfunctional allelic variant. *J Immunol.* 2007; 179 (12): 8519-24.
135. Minkiewicz J, de Rivero Vaccari JP, Keane RW. Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia.* 2013; 61(7):1113-21
136. Menu P, Pellegrin M, Aubert JF, Bouzourene K, Tardivel A, Mazzolai L et al. Atherosclerosis in ApoE-deficient mice progresses independently of the NLRP3 inflammasome. *Cell Death Dis.* 2011; 2: e137.
137. Lijnen HR. Metalloproteinases in development and progression of vascular disease. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003; 33 (5-6): 275-81.
138. Lutgens SP, Cleutjens KB, Daemen MJ, Heeneman S. Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. *FASEB J.* 2007; 21 (12): 3029-41.
139. Sjoberg S, Shi GP. Cysteine Protease Cathepsins in Atherosclerosis and Abdominal Aortic Aneurysm. *Clin Rev Bone Miner Metab.* 2011; 9 (2): 138-47.
140. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994; 94 (6): 2493-503.
141. Johnson JL. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2007; 5 (2): 265-82.

142. Johnson JL, George SJ, Newby AC, Jackson CL. Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102 (43): 15575-80.
143. Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev*. 2005; 85 (1): 1-31.
144. Braumersreuther V, Mach F, Steffens S. The specific role of chemokines in atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2007; 97 (5): 714-21.
145. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 1998; 394 (6696): 894-7.
146. Dawson TC, Kuziel WA, Osahar TA, Maeda N. Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 1999; 143 (1): 205-11.
147. Guo J, Van Eck M, Twisk J, Maeda N, Benson GM, Groot PH et al. Transplantation of monocyte CC-chemokine receptor 2-deficient bone marrow into ApoE3-Leiden mice inhibits atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23 (3): 447-53.
148. Ridker PM, Howard CP, Walter V, Everett B, Libby P, Hensen J et al. Effects of interleukin-1beta inhibition with canakinumab on hemoglobin A1c, lipids, C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen: a phase IIb randomized, placebo-controlled trial. *Circulation*. 2012; 126 (23): 2739-48.