

RÔMULO TADEU DIAS DE OLIVEIRA

**EXPRESSÃO DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E SEUS
RECEPTORES EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO
SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM DOENÇA
ARTERIAL CORONARIANA**

CAMPINAS

2006

RÔMULO TADEU DIAS DE OLIVEIRA

**EXPRESSÃO DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E SEUS
RECEPTORES EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO
SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM DOENÇA
ARTERIAL CORONARIANA**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências
Biomédicas.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA HELOISA SOUZA LIMA BLOTTA

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Ol 4e Oliveira, Rômulo Tadeu Dias de
Expressão de citocinas, quimiocinas e seus receptores em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com doença arterial coronariana / Rômulo Tadeu Dias de Oliveira. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Maria Heloisa Souza Lima Blotta
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Imunologia. 2. Inflamação. 3. Citometria de fluxo. 4. PCR (Biochemistry). I. Blotta, Maria Heloisa Souza Lima . II. Coelho, Otávio Rizzi. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Expression of cytokines, chemokines receptors in peripheral blood mononuclear cells from patients with coronary artery disease

Keywords: • Immunology
• Inflammation
• Flow Cytometry
• PCR

Área de concentração : Ciências Médicas

Titulação: Mestrado em Ciências Biomédicas

**Banca examinadora: Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta
Profa. Dra. Lúcia Nassi Castilho
Prof Dr Cristóvão Luiz Manguiera
Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos**

Data da defesa: 23-08-2006

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

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a).

Maria Heloisa Souza Lima Blotta

Membros:

1. Dra Maria Heloisa Souza Lima Blotta

2. Dra. Lúcia Nassi Castilho

3. Dr. Cristóvão Luiz Mangueira

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

Data: 23/08/2006

DEDICATÓRIA

A meus pais, Carlos Roberto de Oliveira e Maria Regina Dias de Oliveira, exemplo de amor, dedicação, honestidade e trabalho. Por todo amor e dedicação destinados a mim. Esta dissertação é para vocês.

À Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta, por me receber em seu laboratório, depositar sua confiança em mim, ter acreditado no meu potencial e ter sido uma grande amiga. Muito obrigado.

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

À minha namorada, Raquel Albiero, que sempre me apoiou em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis.

À Sara de Jesus Oliveira, grande amiga, que depositou sua confiança em mim e permitiu que eu explorasse e expandisse meus horizontes.

A Ronei Luciano Mamoni, pela amizade, apoio, e pelos momentos de descontração e desabafo, que muito me ajudaram na elaboração e desenvolvimento dessa dissertação. Muito obrigado.

Ao meu co-orientador Dr. Otávio Rizzi Coelho por toda a ajuda dispensada no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Fernando Dias Bexiga e Marcelo Dias de Ávila pela amizade e momentos de diversão que tivemos durante esses longos anos.

Aos (as) amigos (as) Lisandra, Priscila, Icléia, Alexandre, Valéria, Márcia, Carol, Fernanda Doné, Érika e Edilma pela amizade e torcida.

Aos (as) amigos (as) do laboratório, Fabiana, Francisco, Camila, Claudia, Lanny e Fernanda, pela ajuda, e paciência em meus momentos de "mau humor".

À José Roberto Matos Souza e Juliano de Lara Fernandes pela grande ajuda dispensada no decorrer de todo o trabalho.

Ào Dr. Magnus Gidlund e seu aluno de doutorado, Francisco J. Rios, pela gentileza em ceder a LDL oxidada.

Ao Prof. Anibal Vercesi, por disponibilizar o uso do citômetro de fluxo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro.

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

A Deus por ter me permitido chegar até aqui.

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

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xxix</i>
ABSTRACT	<i>xxxiii</i>
INTRODUÇÃO	<i>37</i>
OBJETIVOS	<i>53</i>
CASUÍSTICA E MÉTODOS	<i>57</i>
Casuística.....	<i>59</i>
Preparação da lipoproteína de baixa intensidade oxidada (LDLox).....	<i>59</i>
Obtenção e separação das células mononucleares do sangue periférico (CMSP).....	<i>60</i>
Cultura de CMSP para avaliação da cinética de expressão do RNAm para CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL8, IL-10, TGF- β e IFN- γ	<i>61</i>
Extração de RNA	<i>61</i>
Síntese de cDNA	<i>62</i>
RT-PCR.....	<i>62</i>
Preparação do gel de agarose e eletroforese.....	<i>64</i>
Estimulação de CMSP em cultura para citometria de fluxo	<i>65</i>
Imunofluorescência e citometria de fluxo.....	<i>65</i>

Ensaio imunoenzimático para detecção de CCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10, IFN- γ , IL-10 e TGF- β	66
Ensaio imunoenzimático para detecção de IL-10 plasmática	67
Análise estatística.....	67
RESULTADOS	69
DISCUSSÃO	103
CONCLUSÕES	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
ANEXOS	137

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	Angina estável
AI	Angina instável
ApoE	Apolipoproteína E
ApoE ^{-/-}	Deficiência na apolipoproteína E
AVC	Acidente vascular cerebral
BSA	Soroalbumina bovina
CAA	Célula apresentadora de antígeno
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
DAC	Doença arterial coronariana
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxinucleotídeos
DTT	Ditiotreitol
ELC	Ligante de quimiocina induzido pelo Epstein-Barr Vírus
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
ERL	Sequência de ácido glutâmico-leucina-arginina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IP-10	Proteína induzida por Interferon-gama 10

I-TAC	Quimiocina α de linfócito T induzida pelo Interferon
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LDLr	Receptor da Lipoproteína de baixa densidade
LDLr ^{-/-}	Deficiência no Receptor da Lipoproteína de baixa densidade
LOX-1	Receptor Lectina “like” para LDLox
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP	Proteína quimioatrativa para monócitos
M-CSF	Fator de crescimento de colônia de macrófagos
MDC	Quimiocina derivada de macrófagos
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
Mig	Monocina induzida por Interferon-gama
Mip	Proteína inflamatória de macrófago
MMP	Metaloproteinase
MyD88	Fator 88 de diferenciação mielóide
NK	Célula “Natural Killer”
NKT	Linfócito T “Natural Killer”
PARC	Quimiocina regulada/ativada no pulmão
PBS	Salina tamponada com fosfato
PBS-B-A	Salina tamponada com fosfato acrescida de BSA e azida sódica
PCR	Reação em cadeia da polimerase

RANTES	Regulada por ativação, expressa e secretada por células T normais
Rag	Gene ativado na recombinação
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RPM	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação de cadeia da polimerase associada à transcrição reversa
Scid	Deficiência imunológica severa combinada
ScRs	Receptores do tipo “scavenger”
Superscript R/T II	Transcriptase reversa
TAP	Transportador associado ao processamento do antígeno
TARC	Quimiocina regulada-ativada no Timo
TBE	Tampão Tris-ácido bórico-EDTA
T-bet	T-box expresso em células T
TGF	Fator de transformação e crescimento
Th ₁	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th ₂	Linfócito T auxiliar tipo 2
THP-1	Linhagem de células leucêmicas humanas
TIMPs	Inibidor tecidual de metaloproteinases
TLR	Receptores do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral

	<i>Pág.</i>
Figura 1- Infiltração de Lipoproteína de Baixa Densidade e ativação endotelial.....	41
Figura 2- Migração e ativação de monócitos na íntima das artérias.....	43
Figura 3- Migração e ativação de Linfócitos T CD4 ⁺ na íntima das artérias.....	46
Figura 4- Análise semi-quantitativa da expressão do RNAm para CCL2.....	74
Figura 5- Análise da cinética de expressão do RNAm para CCL2.....	75
Figura 6- Concentrações de CCL2 em sobrenadantes de cultura de CMSP.....	76
Figura 7- Análise por citometria de fluxo da expressão constitutiva de CCR2.....	78
Figura 8- Análise semi-quantitativa da expressão do RNAm para CXCL8.....	80
Figura 9- Análise da cinética de expressão do RNAm para CXCL8.....	81
Figura 10- Concentrações de CXCL8 em sobrenadantes de cultura de CMSP.....	82
Figura 11- Análise semi-quantitativa da expressão do RNAm para IFN- γ	84
Figura 12- Análise da cinética de expressão do RNAm para IFN- γ	85
Figura 13- Análise semi-quantitativa da expressão do RNAm para CXCL9.....	87
Figura 14- Análise da cinética de expressão do RNAm para CXCL9.....	88
Figura 15- Análise semi-quantitativa da expressão do RNAm para CXCL10.....	90

Figura 16-	Análise da cinética de expressão do RNAm para CXCL10	91
Figura 17-	Concentrações plasmáticas de CXCL9 e CXCL10.....	92
Figura 18-	Análise por citometria de fluxo da expressão de CXCR3.....	93
Figura 19-	Análise por citometria de fluxo da expressão de CXCR3.....	94
Figura 20-	Análise semi-quantitativa da expressão do RNAm para IL-10.....	96
Figura 21-	Análise da cinética de expressão do RNAm para IL-10.....	97
Figura 22-	Análise por citometria de fluxo da expressão de IL-10 por monócitos.....	98
Figura 23-	Análise por citometria de fluxo da expressão de IL-10 por monócitos.....	99
Figura 24-	Níveis de TGF- β 1 em sobrenadantes de cultura de CMSP.....	101
Figura 25-	Representação esquemática da resposta inflamatória presente nos pacientes com doença arterial coronariana.....	116



RESUMO

Pesquisas recentes têm demonstrado que a aterosclerose é uma doença inflamatória crônica. Diversos componentes que participam da resposta imunológica inata e adaptativa foram descritos nas lesões e estão relacionados com o início e progressão das mesmas. Monócitos/macrófagos, linfócitos e células endoteliais possuem papel central na patogênese da aterosclerose por meio da produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, como a IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-10, TGF- β e quimiocinas. Quimiocinas são citocinas de baixo peso molecular (8-10 kDa) que promovem quimiotaxia e ativação celular no local da lesão. A resposta ao estímulo promovido pelas quimiocinas é resultado de sua ligação a receptores que sinalizam via proteína G trimérica. Este trabalho teve como objetivo analisar a resposta imunológica sistêmica de pacientes com doença arterial coronariana (DAC) comparada a controles saudáveis. Para tal, avaliamos a expressão do RNA mensageiro (RNAm) e a produção *in vitro* das quimiocinas CCL2 (MCP-1), CXCL8 (IL-8), CXCL9 (Mig), CXCL10 (IP-10), dos receptores CCR2 e CXCR3 e das citocinas IFN- γ , IL-10 e TGF- β em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com angina estável (AE), instável (AI) e controles saudáveis estimuladas ou não com LDL oxidada (LDLox) ou lipopolissacarídeo (LPS). Os resultados mostraram que pacientes com DAC apresentam maior expressão constitutiva do RNAm para CCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10, IFN- γ e, após estimulação com LDLox ou LPS, de CCL2 e CXCL8, em comparação ao grupo controle. A análise da expressão protéica (ou de proteínas) revelou maiores concentrações de CCL2 e CXCL8 nos pacientes, em relação aos controles. A expressão dos receptores mostrou que pacientes com DAC apresentam maior porcentagem de células CCR2⁺ de forma constitutiva e de células CXCR3⁺ após estimulação com LDLox ou LPS. As diferenças mais marcantes entre pacientes com AI e AE foram a maior produção da proteína CXCL8 e maior expressão de RNAm para CXCL9 no primeiro grupo, em contrapartida a maior expressão do RNAm para IL-10 e da citocina TGF- β no grupo com AE. Em conjunto, estes dados sugerem que os pacientes com DAC dispõem de mecanismos que possibilitam a contínua migração de células do sangue periférico para o local da placa. Após a migração e ativação, estas células estariam aptas a responder rapidamente ao antígeno (LDLox) produzindo grandes quantidades de mediadores imunológicos, criando um ambiente inflamatório propenso ao desenvolvimento da lesão, com possível influência na ruptura e conseqüente surgimento de eventos isquêmicos.



ABSTRACT

Atherosclerosis is now recognized to involve chronic inflammatory and immune response. Several components of innate and adaptive immune responses were described in the lesions and are involved in the initiation and progression of the atheroma. Monocytes/macrophages and lymphocytes have a key role in the pathogenesis of atherosclerosis through the production of inflammatory and antiinflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-10, TGF- β and chemokines. Chemokines are low molecular mass cytokines (8 – 10 kDa), which promote chemotaxis and cellular activation in the local of the lesion. The response to the stimulus promoted by the chemokines results from its link to receptors that signals through the G protein. This study aimed to analyze the systemic immune response of patients with coronary artery disease (CAD) by comparing them to healthy controls. To this purpose, we evaluated mRNA expression and the *in vitro* production CCL2 (MCP-1), CXCL8 (IL-8), CXCL9 (Mig), CXCL10 (IP-10), IFN- γ , IL-10 and TGF- β , in addition to the expression CCR2 and the CXCR3 in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with stable (SA), unstable angina (UA) and healthy controls stimulated or not with oxidized LDL (LDLox) or with LPS. Our results showed that patients with coronary arterial disease (CAD) present higher constitutive expression of mRNA for CCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10, IFN- γ and, after stimulation with oxidized LDL or LPS, of CCL2 and CXCL8, as compared to the control group. We also detected higher amounts of CCL2 and CXCL8 in the patients, when compared to the controls. The chemokine receptors expression showed that patients with CAD present higher percentage of cells CCR2⁺ in a constitutive manner and CXCR3⁺ cells after stimulation with LDLox or LPS. The main differences between SA and UA were higher expression of CXCL8 (protein) and CXCL9 mRNA in UA patients and higher IL-10 mRNA and TGF- β (protein) in SA. All together our data suggest that PBMC of CAD patients are able to produce chemokines and cytokines involved in the regulation of monocytes and lymphocyte migration and retention into atherosclerotic lesions. After migration and activation, these cells would be ready to quickly respond to the antigen (LDLox) producing high amounts of inflammatory mediators, which may contribute to plaque instability, and the development of acute coronary syndromes.



INTRODUÇÃO

A doença arterial coronariana (DAC) e o acidente vascular cerebral (AVC), principais manifestações clínicas da aterosclerose, constituem a maior causa de morbidade e mortalidade no mundo ocidental atualmente (Milloning et al., 2002). Projeções da Organização Mundial da Saúde para 2020 alertam para o rápido crescimento das doenças cardiovasculares, que se tornarão a maior causa de morte no mundo, com o aumento do número de casos em países do leste europeu e nações em desenvolvimento (World Health Organization, WHO, 2004). No Brasil as doenças cardiovasculares são responsáveis por 27% dos casos de óbitos (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2004) e seu tratamento causa grande impacto econômico (Ribeiro et al., 2005).

A aterosclerose é uma doença progressiva caracterizada pelo acúmulo de lipídeos e células relacionadas à resposta imunológica na íntima das artérias (Becker et al., 2001). A lesão inicial, denominada estria gordurosa, é caracterizada pelo acúmulo subendotelial de macrófagos ricos em lipídeos, sendo comum em recém-nascidos e crianças (Napoli et al., 1997), atingindo a aorta na primeira década de vida e as artérias coronárias e cerebrais, após a segunda década de vida (Lusis, 2000). A lesão não apresenta sintomas clínicos mas pode evoluir, caracterizando-se pela presença de grande quantidade de lipídeos, necrose, infiltração de macrófagos, linfócitos e células musculares lisas ocasionando, eventualmente, a oclusão de artérias com conseqüentes manifestações clínicas (Libby, 2000).

Várias teorias foram propostas para explicar o início do processo inflamatório na aterosclerose; a mais aceita é a união da hipótese de resposta à lesão (Ross, 1976) com a hipótese oxidativa (Witztum e Steinberg, 1991), na qual o endotélio lesado pelo acúmulo de lipoproteínas de baixa densidade oxidada (LDLox) torna-se ativado, expressando moléculas de adesão e promovendo a liberação de mediadores da resposta imunológica (Steinberg, 2002).

Além da oxidação da LDL, outras possíveis causas podem levar à disfunção do endotélio, incluindo radicais livres originados pelo consumo de cigarro, hipertensão, *diabetes mellitus*, alterações genéticas, elevadas concentrações plasmáticas de homocisteína, infecções por microrganismos tais como herpesvírus e *Chlamydia pneumoniae* ou a combinação desses fatores (Ross, 1999).

A atual compreensão dos processos imunológicos que ocorrem na aterosclerose foi possível após o desenvolvimento de trabalhos experimentais com camundongos deficientes em componentes que participam do metabolismo dos lipídeos, como a apolipoproteína E (ApoE^{-/-}), B ou o receptor para LDL (LDLr^{-/-}), combinados ou não com a deficiência de mediadores da resposta imunológica (Breslow, 1996).

Ao analisar as bases moleculares das doenças coronarianas, observa-se que o excesso de LDL na circulação infiltra-se e é retido pela íntima das artérias (Skalén et al., 2002), podendo sofrer oxidação (Kume et al., 1992) ou outro tipo de modificação por enzimas presentes no sub-endotélio (Klouché et al., 1998). A modificação da LDL leva à liberação de fosfolipídeos que promovem a ativação da célula endotelial (Leitinger, 2003), que passa a expressar um receptor “lectina-like” para a LDLox, o LOX-1 (Kume et al., 1998), promovendo dessa forma, a internalização da LDLox pela célula endotelial.

A endocitose da LDLox pelo endotélio, via LOX-1, induz a expressão de moléculas de adesão (Chen et al., 2001), que contribuem para o afluxo de células para a lesão aterosclerótica (Blankenberg et al., 2003). As moléculas de adesão que são induzidas podem ser incluídas em duas famílias principais, as selectinas e as integrinas. Comprovando a importância das moléculas de adesão no mecanismo de migração dos monócitos circulantes e, posteriormente de outras células para o sub-endotélio vascular, estudos em camundongos propensos ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (ApoE^{-/-} ou LDLr^{-/-}), nos quais os genes da selectina P, E e das integrinas ICAM-1 e VCAM-1 foram inativados, demonstraram diminuição no tamanho das lesões (Dong et al., 1998; Collins et al., 2000; Cybulsky et al., 2001).

Além de expressar moléculas de adesão, o endotélio passa a produzir diversos mediadores da resposta imunológica, como a quimiocina CCL2/MCP-1 (proteína quimiotática para monócitos) que promove a migração de monócitos do sangue periférico para as áreas do endotélio lesado (Li e Mehta, 2000) e moléculas de CD40/CD40L que participam na ativação de vias pró-aterogênicas (Li et al., 2003) (Figura 1).

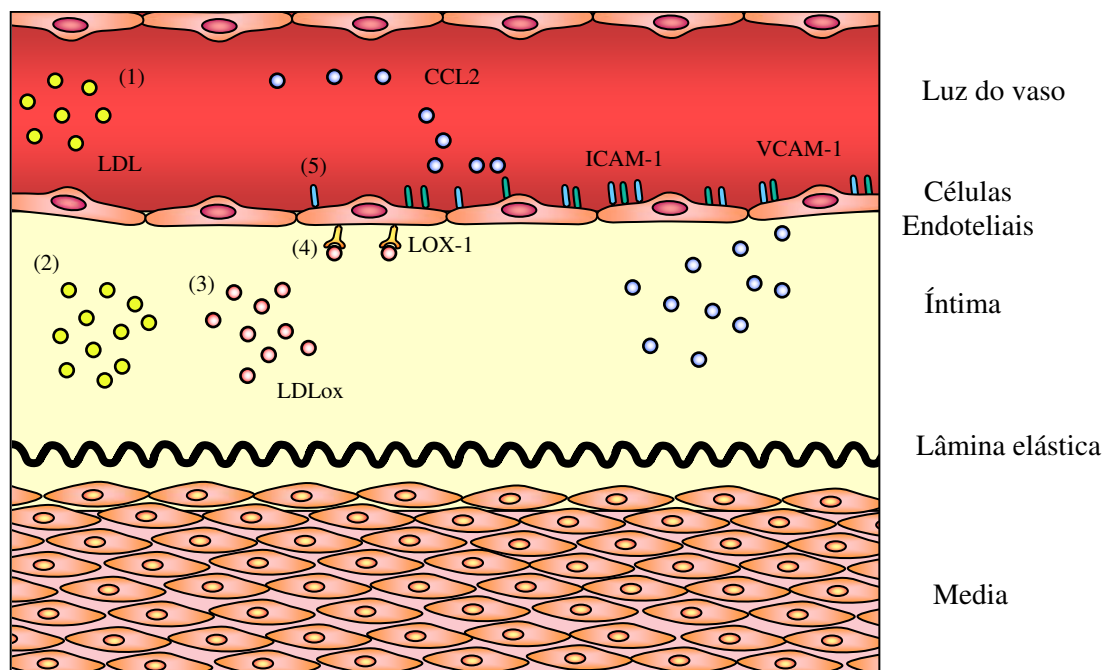


Figura 1- Infiltração de Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) e ativação endotelial. O excesso de LDL na circulação (1) pode sofrer difusão do sangue circulante para a íntima das artérias (2), promovendo a associação com moléculas de proteoglicanos da matrix extracelular, levando a sua retenção na íntima arterial. Moléculas de LDL podem sofrer modificação por enzimas ou radicais de oxigênio formando, entre outras, moléculas de LDL oxidada (LDLox) (3). O reconhecimento de moléculas de LDLox por receptores LOX-1 presentes em células endoteliais (4) promove a expressão de moléculas de adesão, como a ICAM-1 e o VCAM-1, e a liberação de quimiocinas, como a CCL2 (5).

Após a migração para áreas suscetíveis dos vasos, os monócitos entram em contato com o fator de crescimento de colônia de macrófagos (M-CSF) e diferenciam-se em macrófagos (Smith et al., 1995). Esta etapa é crucial no desenvolvimento da aterosclerose e está associada ao aumento da expressão de receptores de reconhecimento de padrão da imunidade inata, como os receptores “scavenger” (ScRs) e os receptores do tipo Toll (TLR) (Hansson et al., 2002). Os ScRs promovem a internalização de um grande

número de moléculas e partículas, tais como a LDLox (promovendo a formação de células espumosas), endotoxinas bacterianas e fragmentos apoptóticos (Han et al., 1998; Peiser et al., 2002), tendo sido demonstrado em estudos experimentais que o ScRA (Suzuki et al., 1997) e o ScRB (CD36) estão associados com desenvolvimento da lesão aterosclerótica (Febraio et al., 2000; Febraio et al., 2004).

Em contraste aos ScRs, os TLRs promovem a ativação dos macrófagos pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (Janeway et al., 2002). Como a lesão aterosclerótica apresenta um grande espectro de expressão de TLR (Edfeldt et al., 2002) é possível que parte da inflamação presente na placa seja promovida pela ativação desses receptores (Xu et al., 2001; Vink et al., 2002). Em suporte a isso, a deleção do gene que codifica o TLR4 ou a MyD88, molécula chave na sinalização dos TLRs, inibe a aterosclerose em camundongos ApoE^{-/-} (Björkbacka et al., 2004; Michelsen et al., 2004).

Após a internalização da LDLox, as células espumosas passam a liberar uma grande quantidade de mediadores pró-inflamatórios como a IL-1, IL-6 e TNF- α , que aumentam a atividade inflamatória atraindo mais monócitos para a lesão e perpetuando a resposta inflamatória (Hansson, 2005). Além da produção de mediadores inflamatórios, os macrófagos da placa apresentam duas funções essenciais para o desenvolvimento e rompimento da placa: a apresentação de antígenos para linfócitos T e a liberação de enzimas que destroem a capa fibrosa, como a metaloproteinase nove (MMP9) (Hansson et al., 2006) (Figura 2).

Os linfócitos migram para a placa aterosclerótica por um mecanismo semelhante ao recrutamento dos monócitos (Figura 3), porém a ativação desta célula ocorre de maneira diferente, envolvendo o processamento do antígeno por vias endossomais, a apresentação via moléculas de MHC de classe II (Complexo Principal de Histocompatibilidade) e a ligação simultânea a moléculas coestimulatórias (Binder et al., 2002).

O papel dos linfócitos no desenvolvimento da lesão aterosclerótica foi demonstrado em trabalhos com camundongos propensos a desenvolver aterosclerose (ApoE^{-/-} e LDLr^{-/-}) e deficientes em linfócitos T e B (Rag-1^{-/-} e Rag-2^{-/-} ou scid/scid). Esses animais apresentaram diminuição da lesão, em comparação com os animais selvagens. (Song et al., 2001; Reardon et al., 2001). Adicionalmente, foi demonstrado que a transferência adotiva de linfócitos TCD4⁺ de camundongos ApoE^{-/-} para animais ApoE^{-/-} e scid/scid promove a formação da lesão (Zhou et al., 2000; Zhou et al., 2006). Além disso, a deficiência no fator de transcrição T-bet, essencial na polarização dos linfócitos para o fenótipo Th₁, protege contra o desenvolvimento da lesão (Buono et al., 2005).

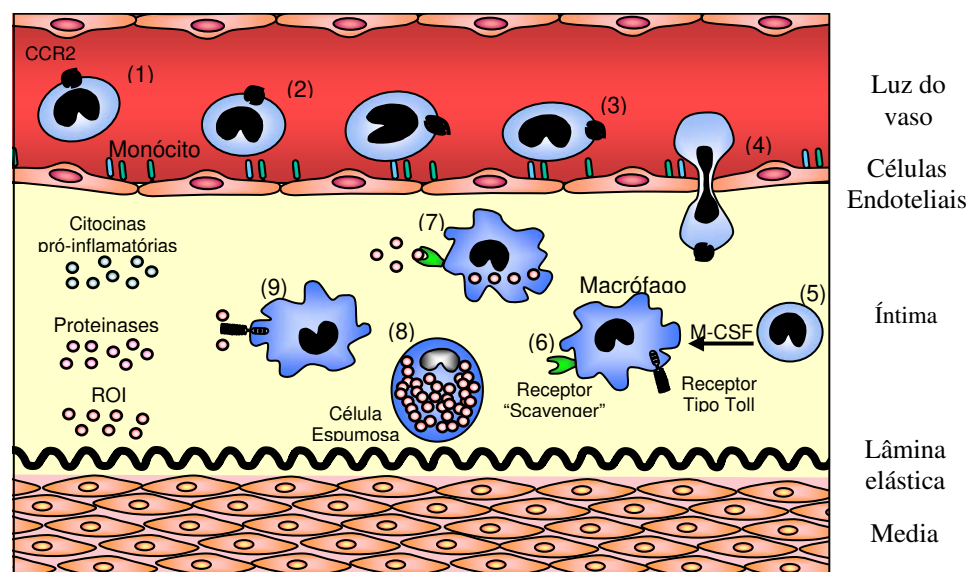


Figura 2- Migração e ativação de monócitos na íntima das artérias. A ativação endotelial promovida por moléculas de LDLox promove o aumento da expressão de moléculas de adesão e a liberação da quimiocina CCL2. Os monócitos circulantes (1), que expressam o receptor CCR2, migram em resposta ao gradiente de CCL2, ocorrendo a adesão ao endotélio ativado (2) o processo de rolamento (3) e diapedese (4) para a íntima da artéria. Na íntima arterial, os monócitos (5) entram em contato com o Fator de Crescimento de Colônias de Monócitos transformando-se em macrófagos (6), que passam a expressar um número elevado de receptores de reconhecimento padrão da imunidade inata, como os receptores "scavenger" e os receptores do tipo Toll. O reconhecimento da LDLox pelos receptores do tipo "scavenger" (7) causa a internalização da molécula de LDLox levando à formação das células espumosas, características da lesão aterosclerótica (8). Por outro lado, o reconhecimento de antígenos presentes na lesão pelos receptores do tipo Toll (9) leva a produção de diversos mediadores da resposta inflamatória como citocinas (IL-1, TNF-α), proteinases (metaloproteinases) e reativos intermediários do oxigênio, que participam tanto do desenvolvimento como das possíveis complicações clínicas provenientes do agravamento da lesão.

Em humanos, a maioria das células T presentes na lesão aterosclerótica apresenta fenótipo $CD3^+CD4^+TCR\alpha\beta$ (Jonasson et al., 1986). Grande parte dessa população celular exibe marcadores de superfície característicos de células de memória (CD45RO), em estágio crônico de ativação (Stemme et al., 1992). Yilmaz et al. (2004) observaram que nas lesões essas células estão em contato com macrófagos e células dendríticas, o que sugere a ocorrência de apresentação de antígeno. A presença de IL-12 (Uyemura et al., 1996) e IL-18 (Gerdes et al., 2002) na placa aterosclerótica promove a

polarização das células T para o fenótipo Th₁ (Frostegard et al., 1999) e dentre as citocinas pró-inflamatórias liberadas pelos linfócitos Th₁, o interferon gama (IFN- γ) parece ter um papel central, tanto no desenvolvimento, como na estabilidade da placa. Em trabalho anterior, verificamos elevada expressão de IFN- γ e IL-12 em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com angina instável, indicando a participação da resposta Th₁ na patogênese da aterosclerose (Fernandes et al., 2004).

O IFN- γ é uma citocina com propriedades pró-inflamatórias produzida por linfócitos Th1 (Mossmann e Coffman, 1989), linfócitos TCD8⁺ ativados (Sad et al., 1995), macrófagos ativados (Munder et al., 1998), células NK (Bancroft et al., 1991) e células musculares lisas (Gerdes et al., 2002). O papel desta citocina no desenvolvimento da lesão pode ser observado no trabalho desenvolvido por Gupta et al. (1997), no qual camundongos deficientes para ApoE^{-/-} e IFN- γ ^{-/-} apresentaram lesões menores com reduzida quantidade de macrófagos, linfócitos, células musculares lisas e maiores quantidades de colágeno. Em concordância, a administração intraperitoneal de IFN- γ em camundongos ApoE^{-/-} promove a exacerbação da lesão (Whitman et al., 2000).

Trabalhos *in vitro* com células endoteliais mostraram que o IFN- γ promove o aumento na expressão de VCAM-1 (Murakami et al., 2001), de quimiocinas como CCL2 (Robbins et al., 1990), CX₃CL1 (Hatakeyama et al., 2004) e CXCL10 (Mach et al., 1999). Em monócitos o IFN- γ induz o aumento da expressão de moléculas do MHC de classe I e II (Pestka et al., 2004) e de moléculas necessárias ao processamento do antígeno, como os transportadores TAP-1 e TAP-2 (Brucet et al., 2004). Por outro lado, em células musculares lisas o IFN- γ exibe atividade anti-proliferativa (Warner et al., 1989) e pró-apoptótica (Geng et al., 1996), o que pode levar à instabilidade da placa aterosclerótica.

Para que o linfócito T possa ser ativado no local da lesão é necessária a ligação de moléculas que promovem o segundo sinal da resposta imunológica, como o B7.1 (CD80) e o B7.2 (CD86) na célula apresentadora de antígeno (CAA) e o CD28 no linfócito (Buono e Lichtman, 2004). Estas moléculas foram detectadas em macrófagos e células T (de Boer et al., 1997) presentes na lesão aterosclerótica e a confirmação definitiva da sua participação na resposta local foi demonstrada pelo trabalho de Buono et al. (2004), no qual camundongos LDLr^{-/-} CD80^{-/-} ou LDLr^{-/-} CD86^{-/-} apresentaram diminuição na progressão da lesão (Figura 3)

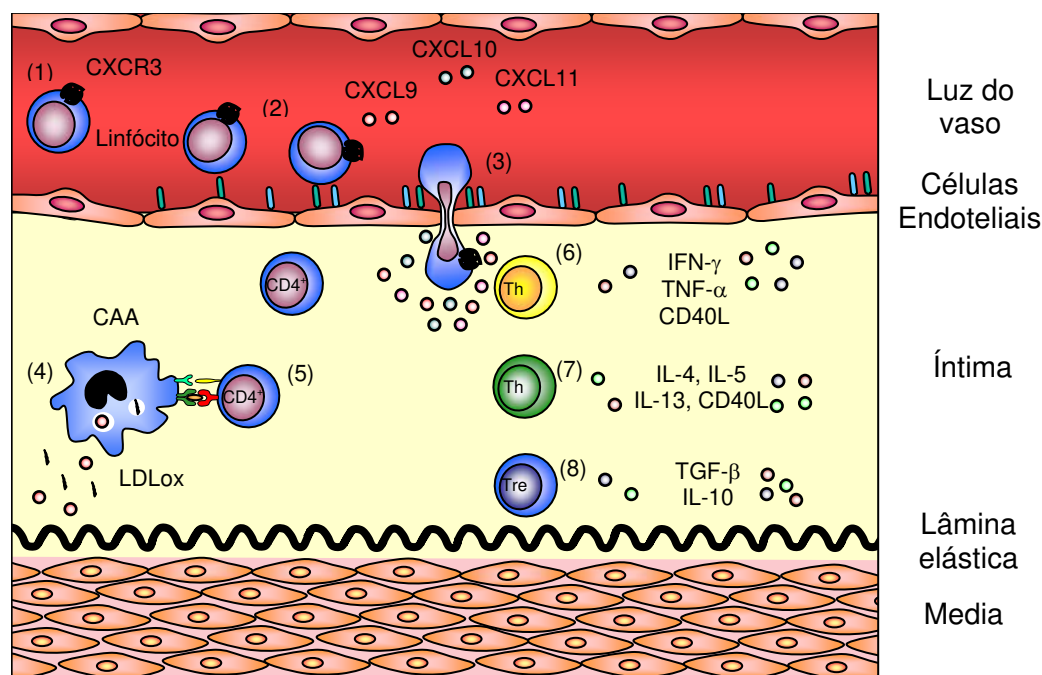


Figura 3- Migração e ativação de Linfócitos T $CD4^+$ na íntima das artérias. Semelhante ao descrito para monócitos, a migração de linfócitos do subtipo T_H1 para o local da lesão é promovida pelas quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11, que se ligam ao receptor CXCR3 presente na célula (1). O reconhecimento do gradiente de quimiocinas promove a adesão (2) e diapedese (3) dos linfócitos T_H1 para a íntima da artéria. No interior da íntima, ocorre a apresentação de antígenos presentes na lesão (4), como a LDLox ou a HSP60, para os linfócitos T_H1 (5) que se tornam ativados (6) liberando grande quantidade de mediadores da resposta inflamatória, como o IFN- γ , TNF- α e CD40L envolvidos nos mecanismos de expansão e ruptura da lesão. Outros subtipos de linfócitos T $CD4^+$ também foram descritos na lesão, como os linfócitos T_H2 (7) produtores de IL-4, IL-5, IL-13 e moléculas de CD40L e os linfócitos T regulatórios (8), envolvidos na resposta antiinflamatória com a produção de IL-10 e TGF- β .

Outra via coestimulatória importante para a ativação de linfócitos T é a interação entre a molécula de CD40 presente na célula T e o seu ligante (CD154 ou CD40L) presente na CAA (Schönenbeck e Libby, 2001). O CD40L está presente em células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos da lesão aterosclerótica (Mach et al., 1997) e em plaquetas ativadas (Henn et al., 1998). O papel funcional do sistema CD40/CD40L na aterogênese foi demonstrado pela deleção do gene que codifica o CD40L em camundongos ApoE^{-/-}, que resulta na progressão da lesão para um fenótipo mais estável, caracterizado por uma menor quantidade de lipídeos e áreas ricas em colágeno (Lutgens et al., 1999).

Outras células envolvidas na resposta imunológica foram detectadas na lesão aterosclerótica de humanos ou camundongos (VanderLaan e Reardon, 2005). Células NK (Whitman et al., 2004), linfócitos NKT (Tupin et al., 2004), mastócitos (Haley et al., 2000) e linfócitos TCD8⁺ (Ludewig et al., 2000) foram relacionados ao aumento da resposta pró-inflamatória, enquanto que células T regulatórias do tipo 1 (Mallat et al., 2003) possivelmente controlem a resposta inflamatória. Por outro lado, o papel dos linfócitos do tipo Th₂ no desenvolvimento da lesão aterosclerótica é bastante controverso (Davenport e Tipping, 2003; Binder et al., 2004).

Para que as células envolvidas na resposta inflamatória possam chegar ao local da lesão, é necessária a presença de moléculas que promovam a migração da circulação para o tecido lesado. Além das moléculas de adesão, as quimiocinas atuam como mediadores fundamentais nesse processo (Sallusto et al., 1998).

Quimiocinas são proteínas de baixo peso molecular (8-10KDa) capazes de atrair e ativar leucócitos no sítio de inflamação. Existem aproximadamente 50 quimiocinas descritas até o momento, agrupadas em 4 famílias de acordo com a posição dos resíduos de cisteína em sua molécula (Luster, 1998).

O primeiro grupo a ser descrito foram as CXC-quimiocinas, que apresentam um aminoácido separando os dois primeiros resíduos de cisteína próxima à extremidade amino-terminal da molécula. Algumas quimiocinas CXC apresentam uma sequência de aminoácidos constituída de ácido glutâmico-leucina-arginina na mesma região, o que as

capacita a promover o recrutamento de neutrófilos. O maior grupo, as CC-quimiocinas, apresentam os dois resíduos de cisteína adjacentes e promovem a migração preferencial de células mononucleares. A terceira família, caracterizada pela presença de três resíduos de aminoácidos quaisquer entre os resíduos iniciais de cisteína, é denominada CX₃C e possui apenas um membro descrito. A última família descrita é a das C quimiocinas com apenas um resíduo de cisteína na porção amino-terminal em sua molécula (Charo e Ransohoff, 2006).

A indução da migração e ativação dos leucócitos pelas quimiocinas se dá por meio da sua ligação a receptores constituídos de proteínas com sete hélices transmembrana ligadas à proteína G trimérica. Até o momento foram descritos 18 receptores de quimiocinas, sendo seis pertencentes à família CXC, dez à família CC, um à família CX₃C e um a família C quimiocinas (Bendall, 2005). A ligação da quimiocina ao seu receptor promove a sinalização via proteína G resultando em diversas respostas biológicas, como a indução de quimiotaxia, alterações no influxo de cálcio e indução de fagocitose (Ribeiro e Horuk, 2005).

Diversas quimiocinas foram detectadas em lesões ateroscleróticas de humanos e camundongos. Dentre as CC-quimiocinas, a que tem maior importância no desenvolvimento da lesão é a CCL2. Esta quimiocina promove preferencialmente a atração de monócitos e, em menor escala, linfócitos T de memória (Carr al., 1994) e células NK (Allavena et al., 1994). Um grande número de evidências tem mostrado o importante papel da CCL2 no início e desenvolvimento da aterosclerose. Herttuala et al. (1991) detectaram RNA mensageiro (RNAm) para CCL2 em áreas ricas em macrófagos de lesões ateroscleróticas, tanto de camundongos, como de humanos. Jiang et al. (1992) demonstraram que a CCL2 induz a produção de moléculas de adesão, quimiocinas e metaloproteinases (Yamamoto et al., 2000), acelera a aterosclerose em animais hipercolesterolêmicos (Namiki et al., 2002) e induz a produção de fator tecidual e citocinas inflamatórias por células musculares lisas das artérias (Schechter et al., 1997). Estudos genéticos têm demonstrado que polimorfismos associados a um aumento na transcrição da CCL2 (2518 A→G) ocorrem com frequência elevada entre pacientes com DAC (Szalai et al., 2001).

Em camundongos propensos a desenvolver aterosclerose ($\text{ApoE}^{-/-}$), a deficiência do gene que codifica a CCL2 leva à inibição do recrutamento de macrófagos e da formação da lesão aterosclerótica (Gosling et al., 1999), ocasionando também redução no remodelamento após infarto (Dewald et al., 2005). Além disso, a deficiência no receptor CCR2 diminui a formação de placas em animais deficientes em ApoE (Boring et al., 1998) e a utilização de um antagonista da CCL2 (CCL2 mutante com deleção da porção N-terminal), que compete pela ligação ao receptor mas não sinaliza, promove a diminuição da progressão da lesão, do número de linfócitos T infiltrados e da quantidade de quimiocinas e citocinas produzidas (Inoue et al., 2002).

Outras CC-quimiocinas foram descritas na lesão, como a CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19 (ELC) e CCL22 (MDC) presentes em áreas ricas em macrófagos (Reape et al., 1999; Reape e Groot, 1999; Greaves et al., 2001). Também foi demonstrada a presença de CC-quimiocinas derivadas de células T, como a CCL3 (Mip-1 α), CCL4 (Mip-1 β), CCL5 (RANTES) e a CCL1 (I-309) (Wilcox et al., 1994; Pattison et al., 1996; Haque et al., 2000) em áreas de aterosclerose. A inibição da CCL5 por um antagonista promove a diminuição da lesão em camundongo $\text{LDLr}^{-/-}$ devido a menor infiltração de macrófagos e linfócitos T (Veillard et al., 2004).

As CXC-quimiocinas também contribuem para a quimiotaxia de monócitos e linfócitos para a placa. Trabalhos com células de linhagem monocítica (THP-1) mostraram a produção de CXCL8 após estimulação com LDLox e áreas ricas em macrófagos da placa aterosclerótica apresentam expressão do RNAm para esta quimiocina (Wang et al., 1996; Apostolopoulos et al., 1996). Estudos realizados com células endoteliais humanas (Gerszten et al., 1999) confirmaram o importante papel da CXCL8 na atração e adesão dos monócitos ao endotélio que expressava a selectina E. Camundongos deficientes no ligante de CXCR2 (KC/GRO α), análoga a CXCL8 humana, apresentam diminuição no desenvolvimento da placa (Boisvert et al., 1998).

Mach et al. (1999) mostraram a expressão da proteína-10 induzida pelo $\text{IFN-}\gamma$ (CXCL10/IP-10), da monocina induzida pelo $\text{IFN-}\gamma$ (CXCL9/Mig) e do quimioatraente- α induzido pelo $\text{IFN-}\gamma$ (CXCL11/I-TAC) por células endoteliais, células musculares lisas e

macrófagos presentes na lesão aterosclerótica e relacionaram à quimiotaxia de linfócitos do subtipo Th₁ pela ligação ao receptor CXCR3 (Xie et al., 2003). Mais recentemente foi demonstrada a presença da CXCL16 (Minami et al., 2001) e CX₃CL1 (Wong et al., 2002) em placas ateroscleróticas de humanos e camundongos. A primeira estaria envolvida nos processos de quimiotaxia e de formação das células espumosas (Wuttge et al., 2004) e a segunda relacionada com a infiltração de monócitos em animais ApoE^{-/-} CX₃CL1^{-/-} (Lesnik et al., 2003), sendo seu polimorfismo em humanos, associado a proteção ao desenvolvimento de DAC (McDermott et al., 2001; McDermott et al., 2003).

Embora um grande número de evidências demonstre o papel central da resposta inflamatória na aterosclerose, informações sobre a participação das citocinas anti-inflamatórias são limitadas.

A interleucina 10 (IL-10) secretada por linfócitos Th₂ e também por macrófagos é uma citocina anti-inflamatória com potente atividade inibidora de macrófagos e linfócitos T (Vries et al., 1995). A IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias por monócitos, como a IL1 β , TNF- α e a quimiocina CXCL8; suprime a expressão de moléculas de adesão e co-estimulação, além de ter função anti-apoptótica (Mallat et al., 1999). Na aterosclerose a deficiência de IL-10, em modelo de camundongo propenso a desenvolver aterosclerose, causou aumento da lesão e um maior infiltrado inflamatório (Mallat et al., 1999). Por outro lado, Namiki et al. (2004) mostraram que a transfecção do gene que codifica a IL-10 no músculo esquelético de camundongos ApoE^{-/-} reduz a formação das lesões nesses animais. Em humanos, concentrações séricas menores de IL-10 foram detectadas em pacientes com angina instável, em relação a pacientes com angina estável (Smith et al., 2001). Além disso, foi observado que após evento isquêmico, os pacientes com maiores concentrações de IL-10 sérica, apresentaram melhor prognóstico (Heeschen et al., 2003).

O papel de outra citocina com ação anti-inflamatória, o Fator de Transformação do Crescimento β (TGF- β) tem sido avaliado na aterosclerose. Camundongos ApoE^{-/-} nos quais o gene para o receptor de TGF- β foi neutralizado apresentam lesões ateroscleróticas bem maiores do que os animais controles, assim como uma maior expressão do RNAm de

IFN- γ (Robertson et al., 2003; Gojova et al., 2003). Por outro lado, pacientes com baixa concentração sérica de TGF- β apresentam pior prognóstico em termos de sobrevivência sem eventos cardiovasculares, do que indivíduos com altos níveis desta citocina (Tashiro et al., 2002; Stefoni et al., 2002).

Analisando o conjunto de dados da literatura, observa-se que em todas as etapas da lesão aterosclerótica ocorre o influxo de células do sangue periférico para o local da lesão e, este influxo de células é promovido, em parte, pelas quimiocinas. Em nosso trabalho procuramos avaliar se ocorre uma estimulação diferencial da produção de quimiocinas e de mediadores anti-inflamatórios em pacientes com angina estável e instável, o que poderia contribuir para uma menor ou maior instabilidade da placa aterosclerótica.



OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi detectar alterações sistêmicas que pudessem refletir a inflamação local na aterosclerose. Para tal avaliamos a expressão e a produção de citocinas, quimiocinas e receptores de quimiocinas em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com angina estável e instável.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a cinética da expressão de RNAm para CCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10, IFN- γ , IL-10 e TGF- β pela técnica de RT-PCR, em CMSP do sangue periférico, após estimulação *in vitro* com LPS ou LDLox.
- Avaliar a produção de CCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10, IFN- γ , IL-10 e TGF- β em CMSP após estimulação em cultura com LPS e LDL oxidada, pela técnica de ELISA.
- Avaliar a expressão dos receptores CCR2 e CXCR3, da quimiocina CCL2 e da citocina anti-inflamatória IL-10 em monócitos e linfócitos do sangue periférico por citometria de fluxo.
- Avaliar os níveis plasmáticos de CCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10, IL-10 e TGF- β pela metodologia de ELISA.



CASUÍSTICA E MÉTODOS

1- Casuística

De março a dezembro de 2005, vinte e quatro pacientes não consecutivos com diagnóstico de doença arterial coronariana foram selecionados para participar deste estudo. Nove pacientes (4 homens, 5 mulheres) com idade média de 57 anos (44 – 86 anos) apresentando diagnóstico de Angina Instável (AI) foram selecionados na Unidade Coronariana do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Angina Instável foi definida pela história de pelo menos um episódio de angina de repouso com duração acima de 20 minutos nas 24 horas anteriores e alteração eletrocardiográfica sugestiva (infradesnívelamento $\geq 1.0\text{mm}$ em derivações contíguas e/ou inversão da onda T $\geq 0,3\text{mm}$ em derivações contíguas). Os pacientes com angina estável (12 homens, 3 mulheres), idade média de 58 anos (46 – 72 anos), foram selecionados na unidade ambulatorial de Cardiologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Esses pacientes não apresentavam síndromes agudas nos últimos 6 meses e tinham doença coronariana comprovada por cinecoronariografia. Os critérios de exclusão utilizados para ambos os grupos foram: gravidez, insuficiência cardíaca congestiva classe III ou IV, doença valvar, história de infarto agudo do miocárdio nas últimas 4 semanas, fibrilação atrial, anormalidade no ECG que invalide a análise do segmento ST, história de cirurgia ou trauma nas últimas 4 semanas, história de doença inflamatória crônica ou aguda e história de cânceres. O grupo controle consistiu de dezesseis indivíduos (11 homens, 5 mulheres) com idade média de 52 anos (40 – 67 anos), sem nenhum histórico prévio de doença cardiovascular ou inflamatória. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas e todos os participantes assinaram o termo de consentimento pós-informação.

2- Preparação da lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox)

A Lipoproteína de Baixa Densidade oxidada (LDLox) foi gentilmente cedida pelo Dr. Magnus Gidlund (ICB-USP) e obtida conforme descrito anteriormente (Fernvik et al., 2004). Em resumo, a LDL foi isolada a partir de “pool” de plasma fresco obtido de voluntários clinicamente saudáveis e normolipêmicos por ultracentrifugação sequencial e a

concentração de proteínas determinadas com a utilização de kit BCA (Pierce) de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação, uma alíquota da LDL foi dialisada em PBS por 24 h a 4 °C. Para o processo de oxidação *in vitro*, uma alíquota da LDL foi incubada com CuSO₄ (20 µM) por 18 h a 37 °C. Após este período, a oxidação foi bloqueada pela adição de EDTA 1 mM e o grau de oxidação foi determinado pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para utilização em culturas, a LDLox foi diluída em meio RPMI para uma concentração de 500 µg/mL e filtrada (Millipore 0,25µm).

3- Obtenção e separação das células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas a partir de 30 mL de sangue coletado em tubos contendo heparina sódica. O material foi centrifugado (1250 r.p.m, 15 minutos, temperatura ambiente) sendo 2 mL do *buffy coat* transferido para um tubo tipo Falcon e suspensos em 8 mL de meio RPMI (Invitrogen, NY, USA). A suspensão foi então centrifugada em gradiente de Ficol-Hipaque (2300 r.p.m, 30 minutos, temperatura ambiente). O anel de células mononucleares foi coletado, transferido para outro tubo e lavado duas vezes com meio RPMI gelado estéril (1250 r.p.m., 10 minutos, 4° C). O “pellet” de células foi ressuscitado em meio RPMI suplementado (soro AB 10% + L-glutamina [2mM] + gentamicina [5µg/mL]) e a concentração ajustada para 2×10^6 cel/mL. O plasma obtido após a centrifugação do sangue total foi coletado, alíquotado e armazenado a -80°C para posterior análise.

4- Cultura de CMSP para avaliação da cinética de expressão do RNAm para CCL2 (MCP-1), CXCL9 (Mig), CXCL10 (IP-10), CXCL8 (IL-8), IL-10, TGF- β e IFN- γ

As CMSP (2×10^6 cel/mL) foram transferidas para placas de cultura de 24 cavidades, estimuladas com 10 μ g/mL de LPS (Sigma, St Louis, USA) ou 10 μ g/mL de LDLox e incubadas por 3, 6, 12, 24 ou 48h a 37°C em estufa de CO₂ (5%). Após cada tempo de incubação, o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C e as células centrifugadas (1250 rpm, 10 minutos, 4°C). O “pellet” foi ressuspensionado, transferido para um tubo eppendorf e centrifugado (3000 r.p.m, 6 minutos, temperatura ambiente). Após a remoção do sobrenadante as células foram estocadas a -80°C.

4.1- Extração de RNA

Ao “pellet” de CMSP foi adicionado 0,5 mL de Trizol[®], sob agitação em vórtex, até sua completa dissolução. Em seguida foi adicionado 1,5 μ L de glicogênio [30 μ g] e 100 μ L de clorofórmio seguido de agitação em vórtex por 20 segundos e incubação por 10 minutos no gelo. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (12000 g, 15 minutos, 4°C) e a parte aquosa transferida para outro tubo, no qual foi adicionado igual volume de álcool isopropílico gelado, seguido de incubação a -20°C por 50 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas, o sobrenadante removido e o “pellet” contendo o RNA lavado com 800 μ L de etanol 75%, seguido de centrifugação (12000 g, 15 minutos, temperatura ambiente). Terminada a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o RNA ressuspensionado em água tratada com Dietil-piropiracarbonato (DEPC). A concentração do RNA das amostras foi determinada em espectrofotômetro UltroSpec III (Pharmacia, Upsala, Suécia) com leituras das absorbâncias a 260 nm e 280 nm. Para determinar a pureza das amostras utilizamos a razão das absorbâncias (A260/A280), que deveria estar próxima de 2,0. Após a extração, as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

4.2- Síntese de cDNA

O RNA extraído anteriormente foi ressuspensionado, em água DEPC, na concentração de 1 µg de RNA total por tubo (volume final de 31 µL), ao qual foi adicionado 1,0 µL de um oligonucleotídeo iniciador (oligo dT₁₂₋₁₈ [0,75 µg]) seguido por incubação de 10 minutos a 70°C com transferência rápida para o gelo. Em cada tubo foi adicionado 18 µL de uma solução que continha os seguintes reagentes: 10 µL do tampão de síntese 5x concentrado, 2,5 µL de dNTP (10mM), 5 µL de DTT 0,1M (ditioteitol) e 0,5 µL de Superscript R/T II (200 U/µL). As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente sendo então transferidas para 40°C por 50 minutos com posterior incubação a 90°C por 5 minutos. Após o término, as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

4.3- RT-PCR

Em um eppendorf de 0,2 mL, foi colocado 5 µL das amostras de cDNA obtidas na etapa anterior e adicionado 20 µL de uma solução que continha: 15,1 µL de água deionizada autoclavada, 2,5 µL do tampão de PCR 10x concentrado, 0,5 µL de dNTP 10mM, 0,5 µL do primer sense, 0,5 µL do primer anti-sense (Tabela I), 0,125 µL de Taq polimerase (0,613 U por reação) e 0,75 µL de MgCl₂ (1,5 mM por reação) completando um volume final de 25 µL. Como controle negativo foi utilizada água deionizada autoclavada no lugar da amostra. As amostras foram homogeneizadas e os tubos transferidos para um termociclador (Mastercycler gradient – Eppendorf), onde foram submetidos a condições específicas para cada primer, descritas na Tabela II. Após o término da reação as amostras foram mantidas a -80°C até o momento da análise.

Tabela I – Sequências dos primers utilizados nas reações de RT-PCR.

Primer	Sequência	Referência
	sense – 5' GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG – 3'	
β-actina	antisense – 5' GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG – 3'	1
CCL2	sense - 5' CAA ACT GAA GCT CGC ACT CTC GCC - 3'	
(MCP-1)	antisense – 5' ATT CTT GGG TTG TGG AGT GAG TGT TCA – 3'	2
CXCL8	sense - 5' CCA AGG AAA ACT GGG TGC AGA G - 3'	
(IL-8)	antisense - 5' GGC ACA GGG GAA CAA GGA CTT G - 3'	3
CXCL9	sense – 5' CAGCAGATGTGAAGGAACTG – 3'	
(Mig)	antisense – 5' GCATGATGAAATTCAACTGG – 3'	4
CXCL10	sense – 5' CAGCCTCTGTGTGGTCCATCCTTG – 3'	
(IP-10)	antisense – 5' TGATTTGCTGCCTTATCTTTCTGA – 3'	4
	sense – 5' TTTAATGCAGGTCATTCAGATG – 3'	
IFN-γ	antisense – 5' CTGGGATGCTCTTCGTCCTCGAAAC – 3'	5
	sense – 5' ATCCCCCAAGCTGAGAACCCAAGACCCA – 3'	
IL-10	antisense – 5' TCTCAAGGGGCTGGGTCAGCTATCCCA – 3'	5
	sense – 5' TGGGAAATTGAGGGCTTTCGCCT – 3'	
TGF-β	antisense – 5' GACCTGTGGTTGATAACGAAG – 3'	6

1. Kanda N, et al. (2001); 2. Li D, et al. (2000); 3. Georganas C, et al. (2000); 4. Romagnani P, et al. (2001); 5. Dutra WO, et al. (1997); 6. Flach R, et al. (1998).

Tabela II – Condições da técnica de PCR

Primer	Desnaturação inicial		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Ciclos
	Tempo(min)	Temp (°C)	Tempo(s)	Temp(°C)	Tempo(s)	Temp (°C)	Tempo(s)	Temp(°C)	
β-actina	5	95	45	95	45	55	60	72	35
CCL2									
(MCP-1)	5	95	40	95	60	62	60	72	30
CXCL8									
(IL-8)	5	94	60	94	60	60	60	72	25
CXCL9									
(Mig)	5	95	45	95	45	57	60	72	35
CXCL10									
(IP-10)	5	95	45	95	45	60	60	72	35
IFN-γ	5	92	45	92	45	55	60	72	35
IL-10	5	92	45	92	45	62	60	72	40
TGF-β	10	94	45	95	45	60	60	72	30

4.4- Preparação do gel de agarose e eletroforese

Após a reação de PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%) em presença de brometo de etídio (1µg/mL). Antes da aplicação no gel, foi adicionado um corante composto por azul de bromofenol em glicerol e TBE a 10% do volume final. O gel foi carregado com 20 µL das amostras juntamente com um padrão de peso molecular (pares de bases) e a corrida realizada em voltagem constante de 75v por aproximadamente 1 hora. Após a eletroforese o gel foi analisado em equipamento de foto documentação (Kodak EDAS 290) com software apropriado (Kodak 1D 3.5). O tamanho do fragmento sintetizado e a intensidade da banda foram estimados, sendo a intensidade normalizada em relação a banda formada pelo cDNA de β-actina de cada amostra.

5- Estimulação de CMSP em cultura para citometria de fluxo

Uma alíquota da amostra de CMSP foi mantida sem estímulo (*ex vivo*) em geladeira, enquanto que, 2×10^6 cel/mL foram incubadas em placa de 24 cavidades (24 horas, 37°C, 5% CO₂) na ausência ou presença de 10 µg/mL de LPS ou 50 µg/mL de LDLox. Nas últimas 6 horas de cultura, foi adicionado 1µg/mL de Brefeldina A (Sigma, St. Louis, USA).

5.1- Imunofluorescência e citometria de fluxo

Após o tempo de incubação, a placa foi colocada sobre gelo e mantida em geladeira por 15 minutos seguido de lavagem das cavidades com PBS – azida sódica – 2mM para a remoção dos monócitos. O material foi transferido para tubos tipo FALCON de 15 mL, centrifugado (1250 r.p.m., 10 minutos, a 4°C), o sobrenadante descartado e as células ressuspensas na concentração de 1×10^7 cel/mL em tampão PBS-BSA-azida sódica [2mM] (PBS-B-A). Após esse procedimento, 20 µL da suspensão de células (aproximadamente 2×10^5 células) foram transferidas para placas de microtitulação (96 cavidades) contendo a mistura de anticorpos para a marcação de superfície (tabela III), assim como os controles de isotipo, diluídos em 20 µL de PBS-B-A, incubando-se por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após a incubação, as placas foram centrifugadas (1250 r.p.m., 10 minutos, temperatura ambiente), o sobrenadante descartado e adicionado 200 µL do tampão PBS-B-A seguido de centrifugação. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas (vórtex) e adicionado 200 µL de formaldeído a 2% em PBS a cada cavidade, incubando-se por 15 minutos à temperatura ambiente. Após nova centrifugação as células foram ressuspensas e adicionado 200 µL de tampão de permeabilização (PBS – BSA [0,1%] – Saponina [0,5%]) com incubação da placa por 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram novamente centrifugadas, ressuspensas e adicionado a mistura de anticorpos para marcação intracitoplasmática (tabela III) diluídos em 20 µL de tampão de permeabilização, sendo em seguida submetidas à incubação em temperatura ambiente por 30 minutos. Após a incubação foram adicionados

a cada cavidade 150 µL de tampão de permeabilização e a placa foi centrifugada (1250 r.p.m., 10 minutos, 4°C). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas (vórtex) e adicionado 200 µL de tampão PBS-B-A. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em 250 µL de formaldeído a 2%, transferidas para tubos de microtitulação e analisadas em citômetro de fluxo (FACScalibur – Beckton & Dickinson), por meio de software específico (CellQuest – Beckton & Dickinson). As leituras foram realizadas em um intervalo máximo de 24 horas e os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas e intensidade média de fluorescência.

Tabela III – Anticorpos utilizados na técnica de imunofluorescência.

Anticorpo	Fabricante	Isotipo	Fluorocromo	[] uso (µL/10 ⁶ céls)
Anti-CCR2	R&D Systems	Mouse-IgG2b	PE	3
Anti-CCL2	BD - Pharmigen	M – IgG1	PE	4
Anti-IL-10	BD - Pharmigen	Rat-IgG2a	PE	20
Anti-CXCR3	R&D Systems	Mouse-IgG1	FITC	8

6- Ensaio imunoenzimático para detecção de CCL2 (MCP-1), CXCL8 (IL-8), CXCL9 (Mig), CXCL10 (IP-10), IFN-γ, IL-10 e TFG-β

As amostras de sobrenadante de cultura ou plasma heparinizado foram testadas em duplicata, utilizando-se ensaio imunoenzimático do tipo sanduíche (kit Duo Set – R&D Systems – USA), 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 3 vezes (PBS – Tween[®] 20 0,05%) seguidas da adição de tampão de bloqueio (PBS – BSA 1% - 0,05% NaN₃) e incubação por 1 hora à temperatura ambiente. O procedimento de lavagem foi repetido, seguido da adição das amostras referentes à curva padrão (sete pontos) e das

amostras a serem testadas. Após incubação de 2 horas à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas e o anticorpo de detecção biotilado (diluído em tampão PBS – Tween[®] 20) adicionado, seguindo-se incubação de 2 horas à temperatura ambiente. Completado o tempo de incubação repetiu-se o procedimento de lavagem e adicionou-se o complexo estreptoavidina-peroxidase, seguido de incubação por 20 minutos à temperatura ambiente. A lavagem foi repetida e em seguida foi adicionado o substrato/cromógeno (TMB [200 µg/mL] + H₂O₂ [0,03%], diluído em tampão acetato de sódio/ácido acético – 0,1M – pH 5,5), com incubação por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com a adição de H₂SO₄ [2N]. As absorbâncias foram determinadas em leitora de ELISA (LabSystems Multiskan MS, Finlândia) a 450 nm. O limite de detecção dos ensaios é de 15,6 pg/mL para CCL2, CXCL8 e IFN-γ; 31,2 pg/mL para CXCL10 e TGF-β; 62,5 pg/mL para CXCL9 e IL-10.

7- Ensaio imunoenzimático para detecção de IL-10 plasmática.

Para a dosagem de IL-10 plasmática foi utilizado kit Quantikine HS ELISA da empresa R&D Systems. O limite de detecção do ensaio é de 0,5 pg/mL.

8- Análise estatística

Os resultados foram analisados com o software SigmaStat v1.0 (Jandel Corporation). Para a comparação dos diferentes parâmetros obtidos nos grupos estudados, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. Para a análise dos resultados obtidos dentro dos grupos em diferentes tempos, foi utilizado o teste de Wilcoxon quando comparados dois tipos de estímulos ou o teste de Friedman, com pós teste Student Newman Keuls, quando se comparou os resultados obtidos com 3 ou mais estímulos diferentes. Para a análise de parâmetros não numéricos (categorias e proporções), foi utilizado o teste de χ^2 .



RESULTADOS

1- Casuística

As características clínicas e bioquímicas dos grupos estudados estão descritos na tabela IV. Não foram observadas diferenças significativas entre os três grupos quanto a idade, concentrações séricas de HDL e LDL colesterol, porcentagem de indivíduos fumantes e no diagnóstico de *diabetes mellitus* e dislipidemia. Na comparação entre os grupos de pacientes, observamos diferenças apenas nas concentrações séricas de colesterol total, com o grupo AI apresentando concentrações mais elevadas que o AE. Ainda pudemos observar diferenças entre os pacientes com DAC e o grupo controle na porcentagem de indivíduos com diagnóstico de hipertensão arterial, histórico de infarto agudo do miocárdio, e uso de medicamentos (aspirina, estatina e β -bloqueador). Para finalizar, observamos maiores concentrações séricas de glicose nos pacientes com AI em comparação ao grupo controle.

Tabela IV – Características clínicas e bioquímicas dos grupos estudados

	Controle	AE	AI
Idade, anos	52 (40 – 67)	58 (46 – 72)	57 (44 – 86)
Sexo, homens/mulheres	11/5	12/3	4/5
Colesterol total (mg/dL)	187 (149 – 235)	200 (153 – 242)	260 (224 – 322) ^{•*}
HDL (mg/dL)	46 (28 – 79)	42 (33 – 54)	37 (29 – 52)
LDL (mg/dL)	118 (92 – 166)	123 (102 – 148)	187 (126 – 222)
Glicemia (mg/dL)	88 (78 – 139)	103 (78 – 321)	113 (92 – 418) [•]
Diabetes (%)	7	36	36
Hipertensão (%)	0 [#]	79 [#]	88 [#]
Tabagismo (%)	14	15	25
Dislipidemia (%)	44	71	75
IAM (%)	0 [#]	71 [#]	50 [#]
Aspirina (%)	0 [#]	93 [#]	63 [#]
Estatina (%)	0 [#]	64 [#]	50 [#]
β-bloqueador (%)	0 [#]	57 [#]	50 [#]
Nitrato (%)	0	29	13

Estatística: Kruskal Wallis com pós teste de Dunn ([•] p<0,05 em relação ao grupo controle;

* p<0,05 em relação ao grupo AE); χ^2 ([#] p<0,05).

2- Proteína quimiotática para monócitos-1 (CCL2/MCP-1)

- a) Pacientes com AE e AI expressam concentrações mais elevadas de RNAm para CCL2 em relação ao grupo controle.

A quimiocina CCL2 está envolvida diretamente no processo de formação da lesão aterosclerótica, contribuindo com a formação da lesão inicial (estria gordurosa) pela quimiotaxia de monócitos do sangue periférico para os locais de ativação endotelial e participando dos estágios mais avançados, como nos processos de remodelamento após a ocorrência de evento isquêmico.

A expressão constitutiva do RNAm de CCL2 em CMSP foi maior nos pacientes com DAC (AE e AI), do que no grupo controle (fig. 1A e B, 0h). Após 3h em cultura com LDLox ou LPS ocorreu um aumento significativo na expressão de RNAm para CCL2 nos três grupos estudados mantendo, porém, a diferença entre pacientes com DAC e grupo controle. Em todos os tempos avaliados os pacientes com DAC apresentaram expressão mais elevada de RNAm para CCL2 do que o grupo controle, seja em células estimuladas com LDLox (fig. 1A) ou LPS (fig. 1B). A cinética de expressão do RNAm para CCL2 pode ser melhor visualizada nos gráficos de linha (fig. 2A e B). De maneira geral após três horas de estimulação a produção de CCL2 manteve-se constante até o final do período analisado (48h) e em nenhum dos tempos foi observado diferença entre os pacientes com AE e AI.

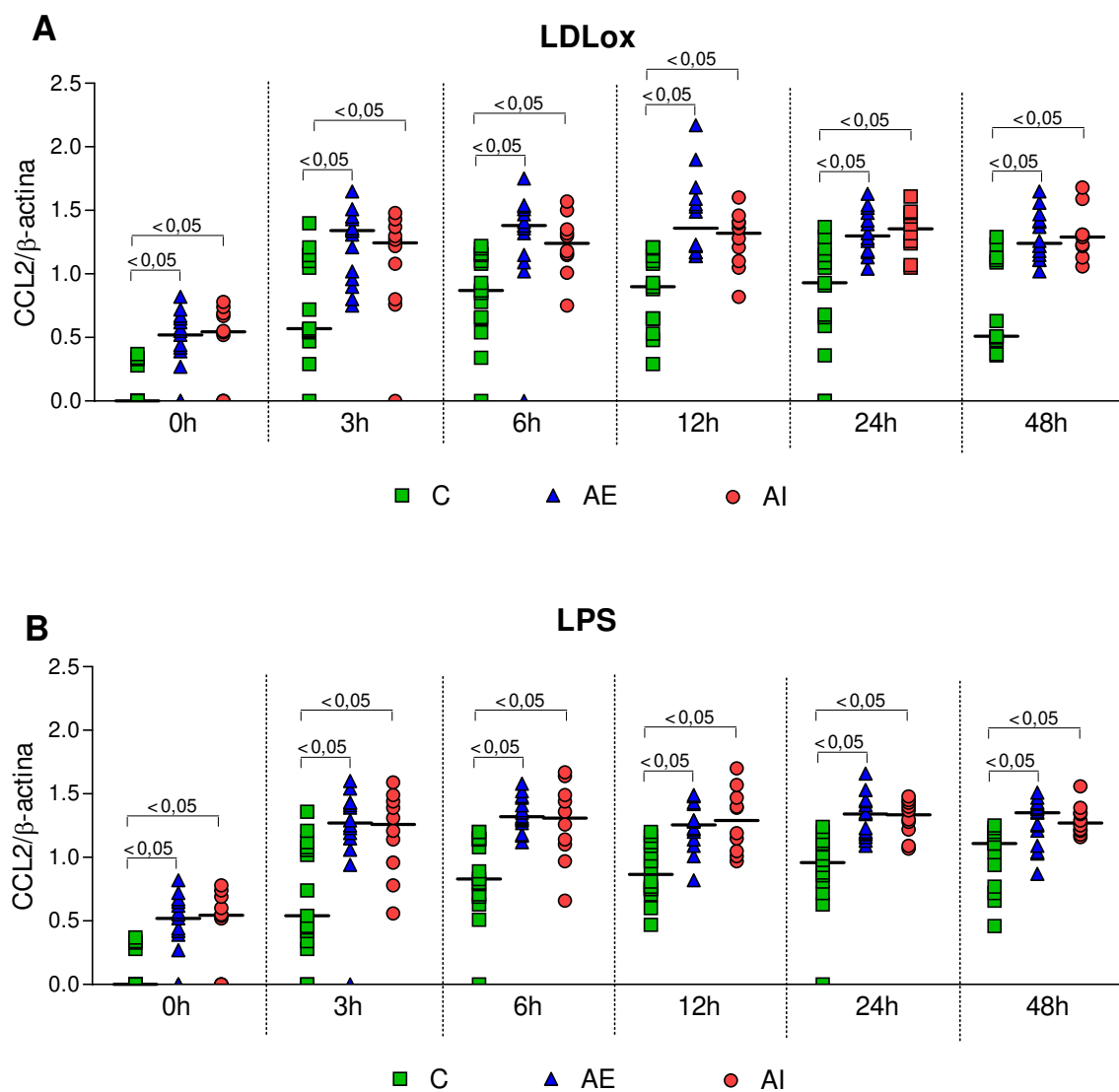


Figura 4 – Análise semi-quantitativa da expressão do RNAm para CCL2 (CCL2/β-actina) por CMSP de indivíduos do grupo controle (C) e de pacientes com angina estável (AE) e angina instável (AI). As células foram analisadas no tempo 0 (ex vivo) ou após estimulação por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10 µg/mL de LDLox (A) ou LPS (B). As linhas horizontais representam a mediana. Os valores de *p* estão indicados sobre os colchetes. Teste estatístico: Kruskal Wallis com pós teste Dunn.

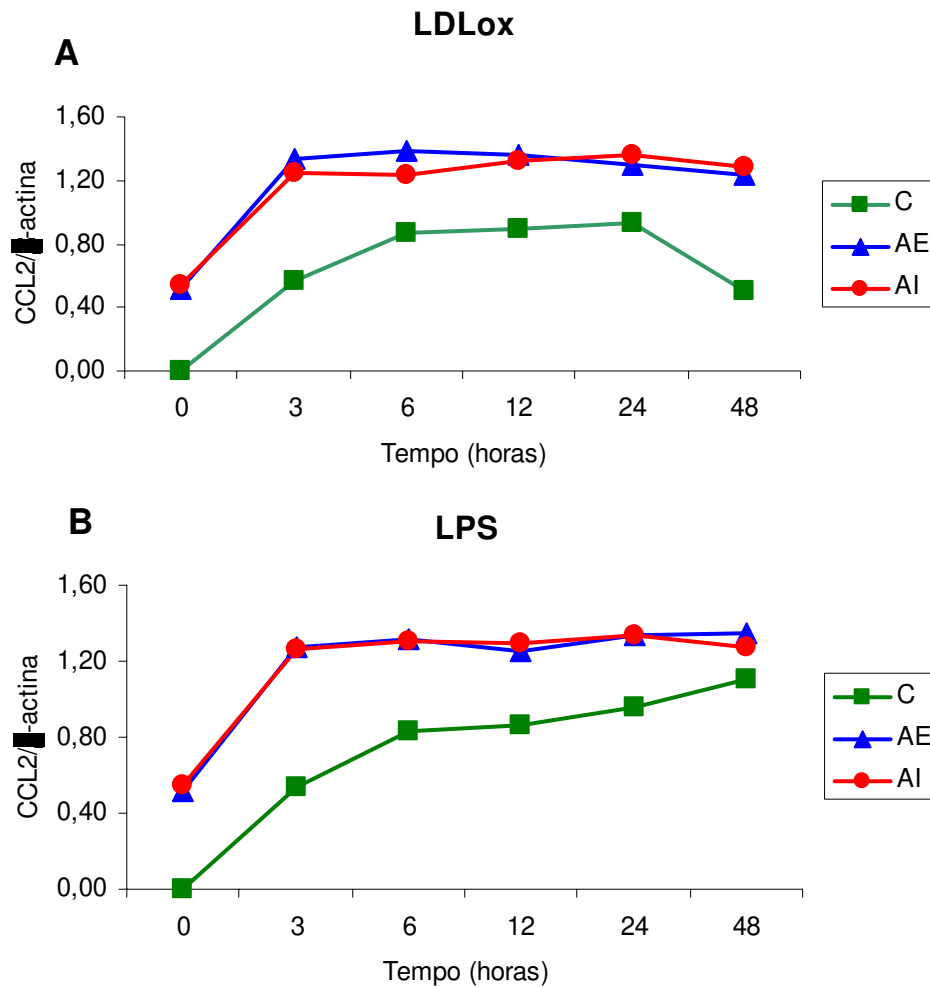


Figura 5 – Análise da cinética de expressão do RNAm para CCL2 (CCL2/ β -actina) por CMSP de indivíduos do grupo controle (C) e de pacientes com angina estável (AE) e angina instável (AI). As células foram analisadas no tempo 0 (ex vivo) ou após estimulação por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10 μ g/mL de LDLox (A) ou LPS (B). Os dados estão expressos como mediana. **LDLox** – C: T0 vs. T3, T6 $p=0,0005$; T0 vs. T12, $p=0,0002$; T0 vs. T24, $p=0,001$; T0 vs. T48, $p=0,0002$. AE: T0 vs. T3, $p=0,0002$; T0 vs. T6, $p=0,0005$; T0 vs. T12, T24, T48, $p=0,0002$; AI: T0 vs. T3, $p=0,007$; T0 vs. T6, T12, T24, T48 $p=0,004$. **LPS** – C: T0 vs. T3, $p=0,003$; T0 vs. T6, T12, T24, T48, $p=0,001$. AE: T0 vs. T3, $p=0,0005$; T0 vs. T6, T12, T24, T48, $p=0,0002$; AI: T0 vs. T3, T6, T12, T24, T48, $p=0,002$. Teste estatístico: Wilcoxon.

b) CMSP de pacientes com DAC produzem mais CCL2 do que o grupo controle em resposta à estimulação com LDLox.

CMSP de pacientes com AE cultivadas na ausência de estímulos por 24h produziram maiores concentrações de CCL2 em relação ao grupo controle, porém não foi observada diferença estatística entre o grupo AI e controle (fig. 3).

Após a estimulação em cultura, observamos que a LDLox induziu uma maior produção de CCL2 pelas células dos grupos com DAC sem, entretanto, haver diferença entre os grupos AI e AE. Já a estimulação com LPS resultou em produção mais elevada pelos pacientes do grupo AI, quando comparado com o controle (fig. 3).

A análise da concentração plasmática de CCL2 não mostrou diferenças estatísticas entre os três grupos estudados (dados não apresentados).

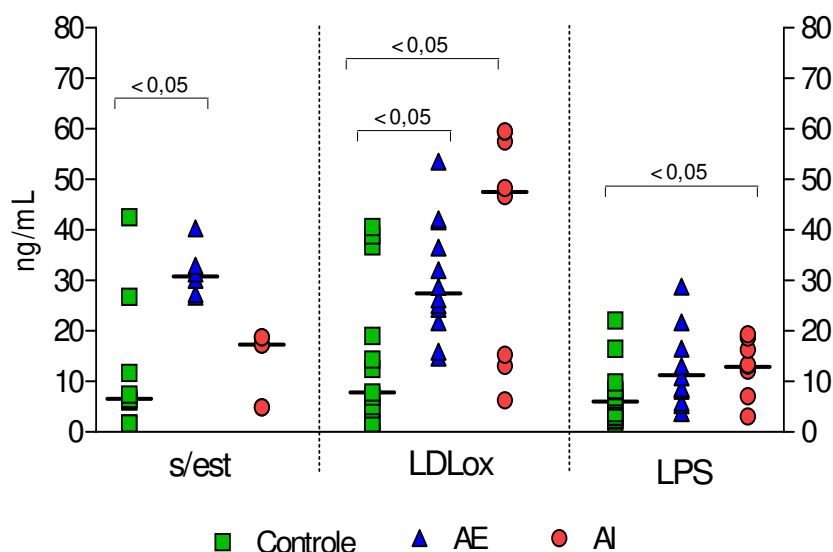


Figura 6 – Concentrações de CCL2 em sobrenadantes de cultura de CMSP de indivíduos do grupo controle e de pacientes com angina estável (AE) e angina instável (AI), estimuladas ou não com 10 µg/mL de LDLox ou LPS por 24h. As linhas horizontais representam a mediana. Os valores de p estão indicados sobre os colchetes. Teste estatístico: Kruskal Wallis com pós teste Dunn.

c) Pacientes com DAC apresentam maior porcentagem de monócitos CCR2⁺ do que o grupo controle

Para que a quimiocina CCL2 exerça o seu efeito é imprescindível a sua ligação ao receptor CCR2 presente em monócitos e outras células alvo.

A análise da expressão constitutiva de CCR2 em CMSP mostrou uma porcentagem maior de monócitos positivos no grupo DAC em relação ao grupo controle ($p=0,006$) (fig. 4A), não ocorrendo diferenças na análise dos linfócitos (fig. 4B). Nos pacientes com DAC ocorreu uma diminuição acentuada na porcentagem de monócitos e linfócitos CCR2⁺ após manutenção em cultura por 24h na ausência de estímulos ou na presença de LDLox ou LPS, o mesmo não ocorrendo no grupo controle (fig. 4A e B).

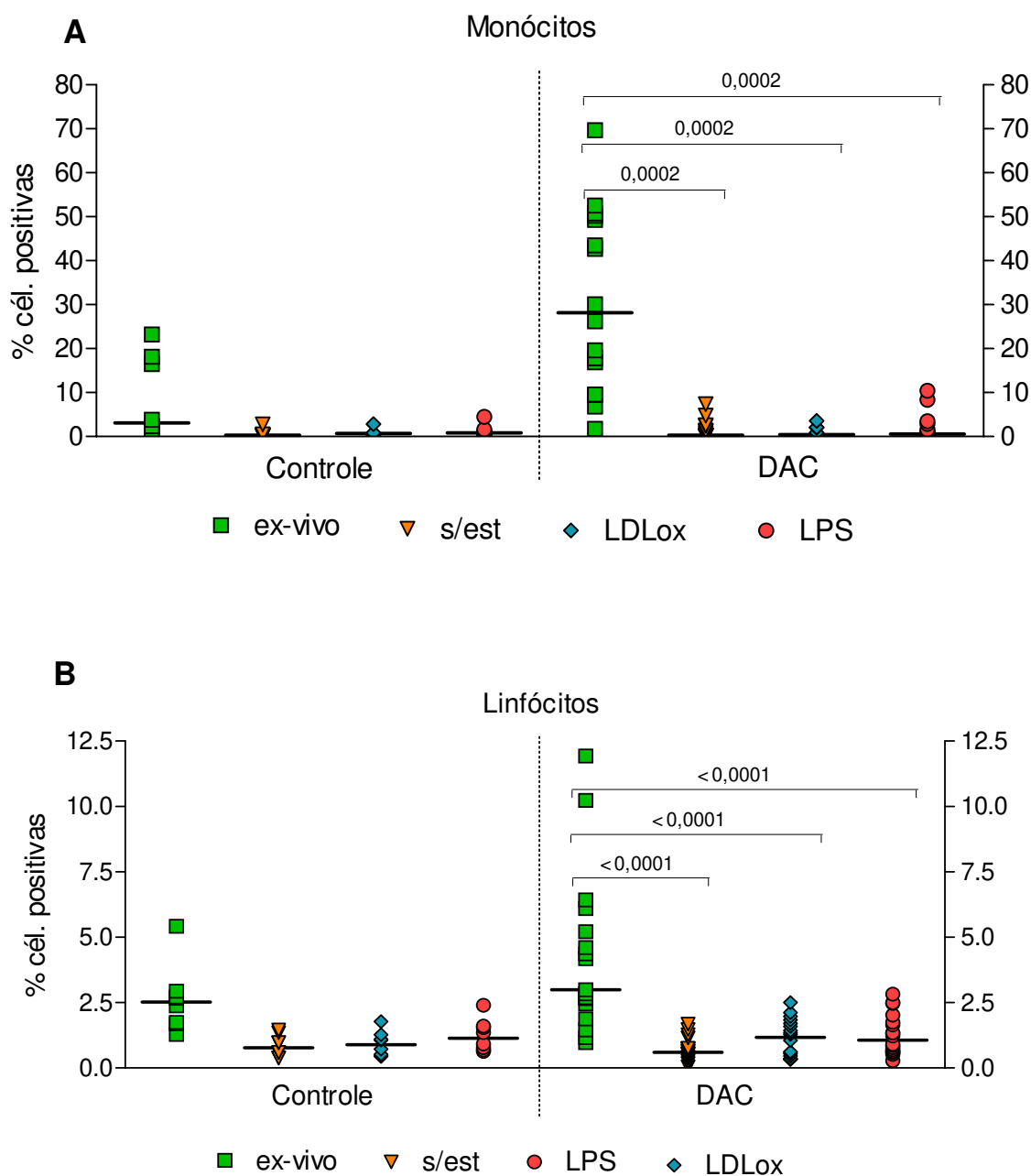


Figura 7 – Análise por citometria de fluxo da expressão constitutiva de CCR2 por monócitos (A) e linfócitos (B) de indivíduos do grupo controle e de pacientes com DAC. Resultados referentes a porcentagem de células positivas. As linhas horizontais representam a mediana. Os valores de p estão indicados sobre os colchetes. Teste estatístico: Mann Whitney.

Em conjunto observamos que pacientes com DAC, tanto com AE como AI, apresentaram maior expressão do RNAm para CCL2, tanto de maneira constitutiva como após estimulação. Além disso, quando analisamos as concentrações da proteína no sobrenadante de cultura de CMSP, as células do grupo DAC, estimuladas com LDLox, continuaram a produzir quantidades maiores da quimiocina em relação ao grupo controle. Entretanto, quando o estímulo utilizado foi o LPS, somente as células do grupo AI apresentaram o mesmo resultado. Em relação à expressão do receptor CCR2, encontramos maior porcentagem de monócitos ex vivo positivos nas amostras do grupo DAC e, após estimulação em cultura, observamos diminuição na expressão do receptor em monócitos e linfócitos do grupo de pacientes.

3- Interleucina-8 (CXCL8/IL-8)

- a) Pacientes com AE e AI expressam concentrações mais elevadas de RNAm para CXCL8 em relação ao grupo controle.

Várias evidências sugerem a participação da CXCL8 no recrutamento de linfócitos T e monócitos para a lesão aterosclerótica.

Em nosso estudo, observamos expressão constitutiva do RNAm para CXCL8 mais elevados no grupo AE em relação aos outros grupos. Após 3h em cultura com LDLox ocorreu um aumento significativo na expressão de RNAm para CXCL8 nos três grupos estudados mantendo, porém, a diferença entre pacientes com AE e o grupo controle e tornando significativa também a diferença entre o grupo AI e o controle (fig. 5A). Em todos os tempos avaliados os pacientes com DAC apresentaram expressão mais elevada de RNAm para CXCL8 do que o grupo controle na presença de LDLox (fig. 5A). De maneira geral após três horas, a produção de CXCL8 manteve-se constante até o final do período analisado (48h) e em nenhum dos tempos foi observado diferença entre os pacientes com AE e AI (fig. 6A).

A estimulação com LPS (fig. 5B) resultou em expressão maior do RNAm em relação ao grupo controle em todo o período avaliado para o grupo AE e somente no tempo de três horas para o grupo AI. A cinética de expressão do RNAm foi constante durante todo o tempo avaliado nos três grupos estudados (fig. 6B).

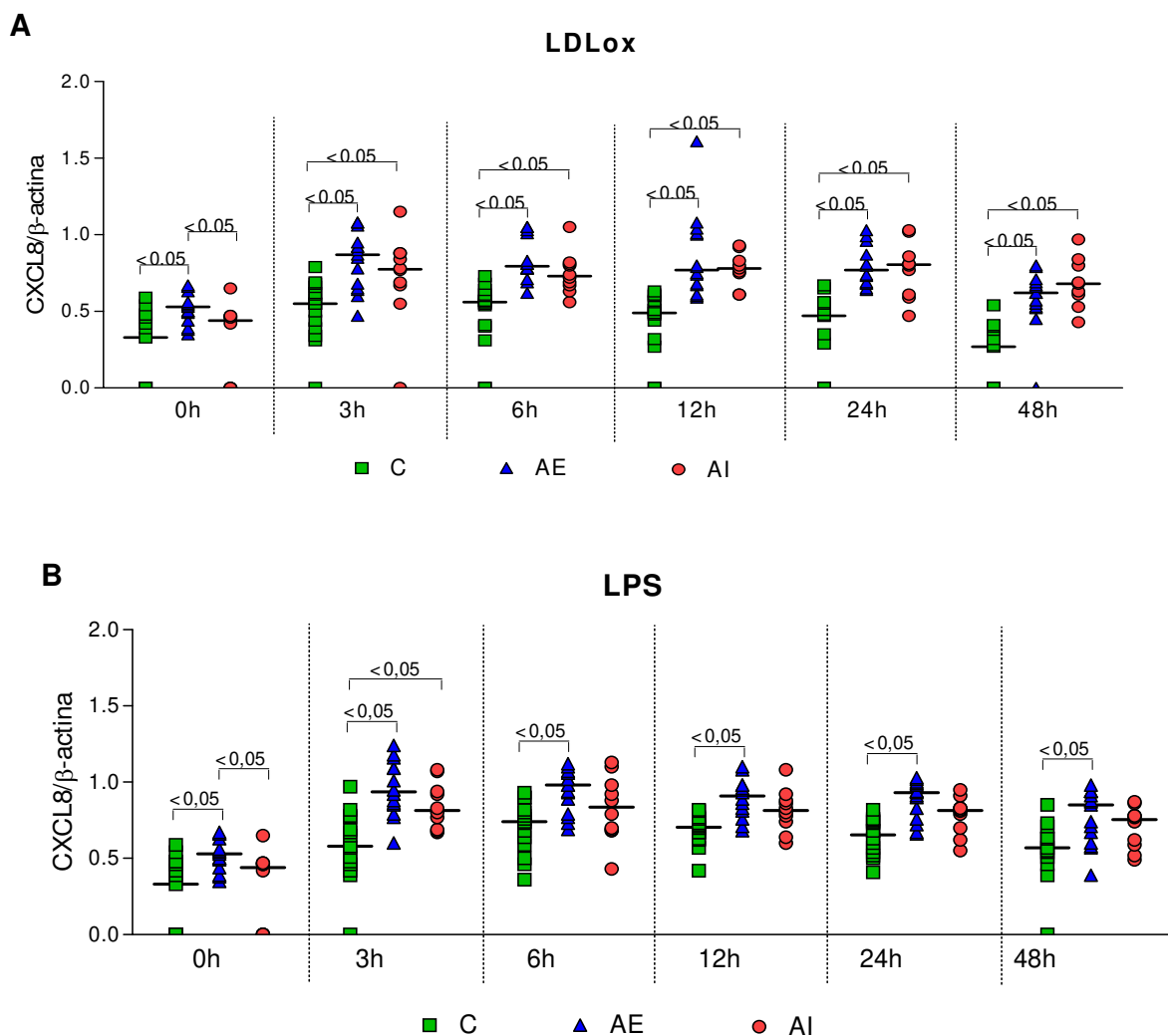


Figura 8 – Análise semi-quantitativa da expressão do RNAm para CXCL8 (CXCL8/ β -actina) por CMSP de indivíduos do grupo controle (C) e de pacientes com angina estável (AE) e angina instável (AI). As células foram analisadas no tempo 0 (ex vivo) ou após estimulação por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10 μ g/mL de LDLox (A) ou LPS (B). As linhas horizontais representam a mediana. Os valores de p estão indicados sobre os colchetes. Teste estatístico: Kruskal Wallis com pós teste Dunn.

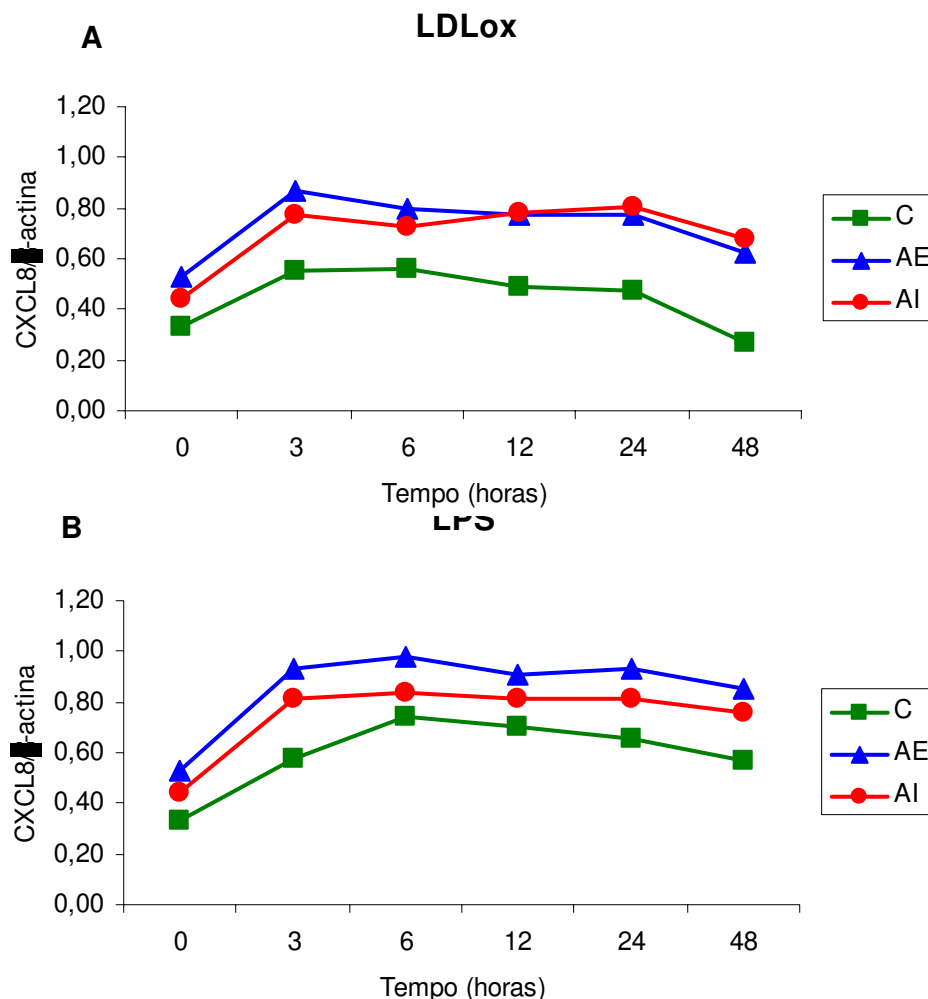


Figura 9 – Análise da cinética de expressão do RNAm para CXCL8 (CXCL8/β-actina) por CMSP de indivíduos do grupo controle (C) e de pacientes com angina estável (AE) e angina instável (AI). As células foram analisadas no tempo 0 (ex vivo) ou após estimulação por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10 µg/mL de LDLox (A) ou LPS (B). Os dados estão expressos como mediana. **LDLox** – C: T0 vs. T3, $p=0,001$; T0 vs. T6, $p=0,02$; T0 vs. T12, $p=0,04$. AE: T0 vs. T3, $p=0,0005$; T0 vs. T6, $p=0,0002$; T0 vs. T12, $p=0,001$; T0 vs. T24, $p=0,0002$. AI: T0 vs. T3, $p=0,01$; T0 vs. T6, T12, T24, T48, $p=0,007$. **LPS** – C: T0 vs. T3, $p=0,002$; T0 vs. T6, T12, T24, T48, $p=0,001$; T0 vs. T48, $p=0,003$. AE: T0 vs. T3, T6, T12, T24, $p=0,0002$; T0 vs. T48, $p=0,001$. AI: T0 vs. T3, T6, T12, $p=0,002$; T0 vs. T24, $p=0,003$; T0 vs. T48, $p=0,002$. Teste estatístico: Wilcoxon.

b) Pacientes com AI produzem mais CXCL8 *in vitro* do que indivíduos do grupo AE e controle em resposta à estimulação com LDLox.

CMSP do grupo AE, cultivadas na ausência de estímulos, produziram maiores concentrações de CXCL-8 em relação ao grupo controle. Após a estimulação das CMSP em cultura com LDLox por 24h, observamos que os dois grupos de pacientes produziram quantidades maiores desta quimiocina *in vitro* em relação ao grupo controle. Além disso, o grupo de pacientes com AI apresentou concentrações mais elevadas em relação aos outros grupos. A estimulação com LPS mostrou diferença significativa apenas entre os pacientes com AI em relação ao grupo controle (fig. 7). A análise da concentração plasmática de CXCL8 não mostrou diferenças estatísticas entre os grupos analisados (dados não apresentados).

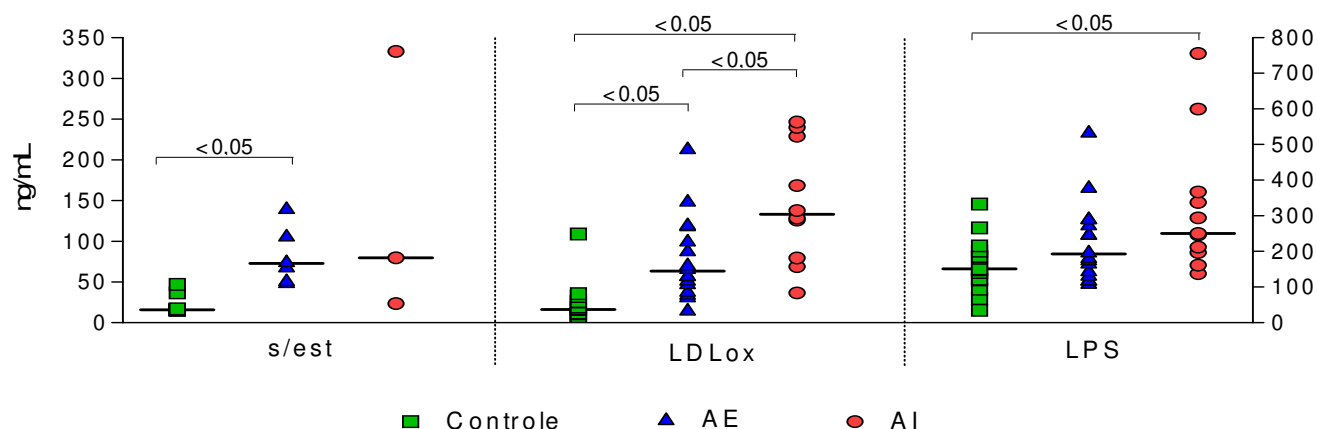


Figura 10 – Concentrações de CXCL8 em sobrenadantes de cultura de CMSP de indivíduos do grupo controle e de pacientes com angina estável (AE) e angina instável (AI), estimuladas ou não com 10 µg/mL de LDLox ou LPS por 24h. As linhas horizontais representam a mediana. A escala da esquerda refere-se as condições: sem estímulo e estímulo com LDLox. Os valores de *p* estão indicados sobre os colchetes. Teste estatístico: Kruskal Wallis com pós teste Dunn.

Em conjunto, a análise da CXCL8 mostrou que as CMSP dos pacientes com DAC, estimuladas com LDLox, apresentaram maior expressão do RNAm e da proteína em comparação ao grupo controle. Adicionalmente a análise da produção *in vitro* de CXCL8 revelou maiores concentrações no grupo AI em relação ao grupo AE.

4. Interferon- γ (IFN- γ)

a) Pacientes com DAC apresentaram maior expressão constitutiva de IFN- γ em relação aos indivíduos controles.

A citocina pró-inflamatória IFN- γ é o principal mediador sintetizado por linfócitos Th₁ e está diretamente relacionado aos mecanismos moleculares envolvidos na ruptura da placa.

Ao analisar a expressão do RNAm para IFN- γ , observamos que as CMSP dos pacientes com DAC apresentaram produção constitutiva maior em relação ao grupo controle. Após o estímulo com LDLox (fig. 8A) notamos que o grupo AE expressou quantidades maiores do RNAm até o tempo 12 horas e o grupo AI nos tempos 12 e 24 horas de estímulo, quando comparado ao grupo controle. Na cinética de expressão observamos um pequeno, porém significativo, aumento na expressão do RNAm pelas células do grupo AE após 3 horas de estimulação ($p=0,02$) que começa a decair após 6 horas chegando a concentrações significativamente menores do que o observado no início da cultura nos tempos de 24 e 48 horas. Por outro lado, foi inexpressiva a elevação da expressão de RNAm para IFN- γ nas células dos pacientes com AI e grupo controle em relação ao tempo 0 (fig. 9A).

Quando o estímulo utilizado foi o LPS, encontramos expressão maior apenas nas CMSP do grupo AE (até o tempo de 24 horas), quando comparado ao grupo controle (fig. 8B). Em relação à cinética de expressão do RNAm, notamos uma pequena elevação na expressão do RNAm em todos os grupos, com queda após 6 horas de estimulação, para o grupo AE, e 12 horas para os grupos AI e controle (fig. 9B).

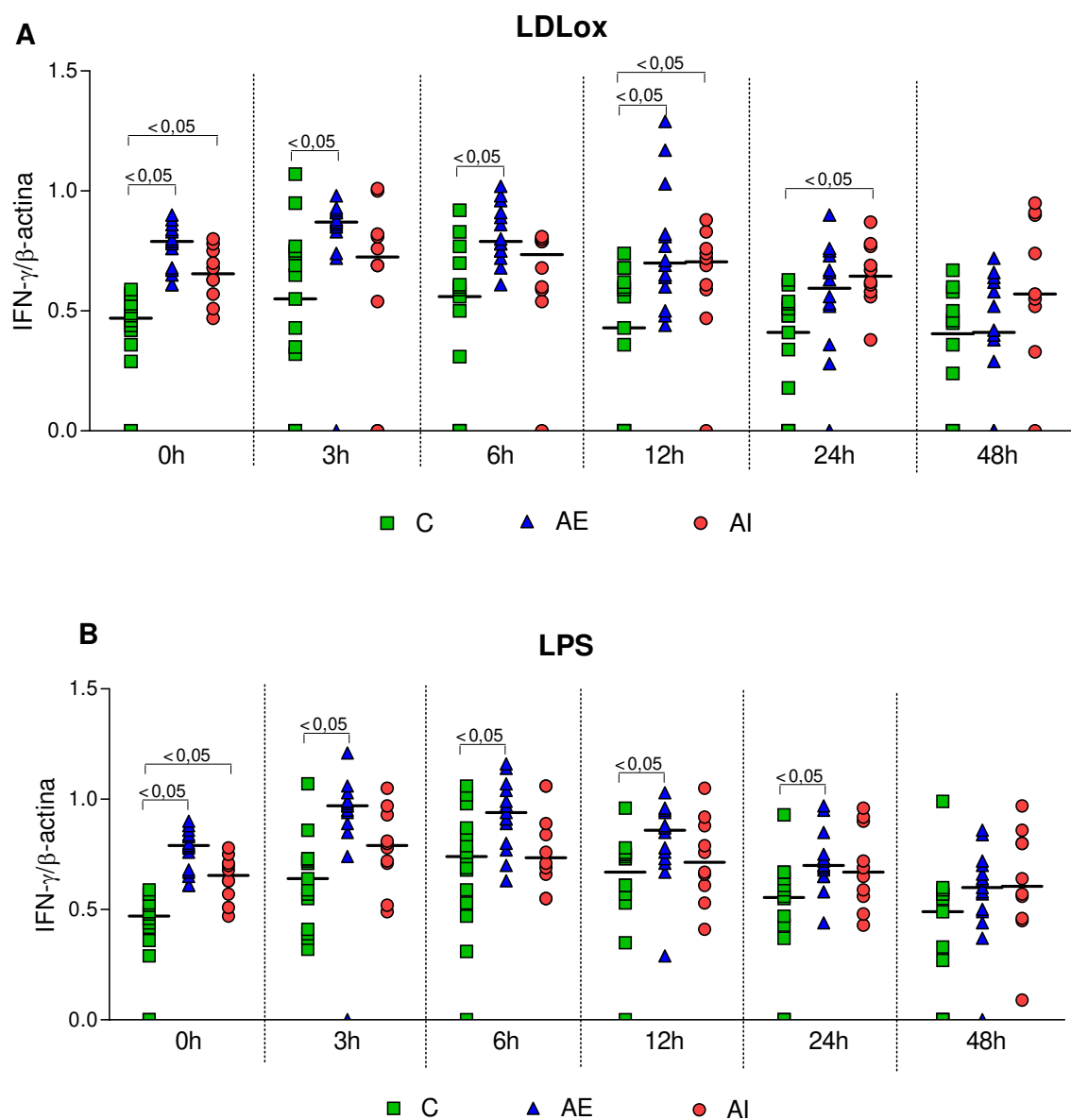


Figura 11 – Análise semi-quantitativa da expressão do RNAm para IFN- γ (IFN- γ / β -actina) por CMSP de indivíduos do grupo controle (C) e de pacientes com angina estável (AE) e angina instável (AI). As células foram analisadas no tempo 0 (ex vivo) ou após estimulação por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10 μ g/mL de LDLox (A) ou LPS (B). As linhas horizontais representam a mediana. Os valores de p estão indicados sobre os colchetes. Teste estatístico: Kruskal Wallis com pós teste Dunn.

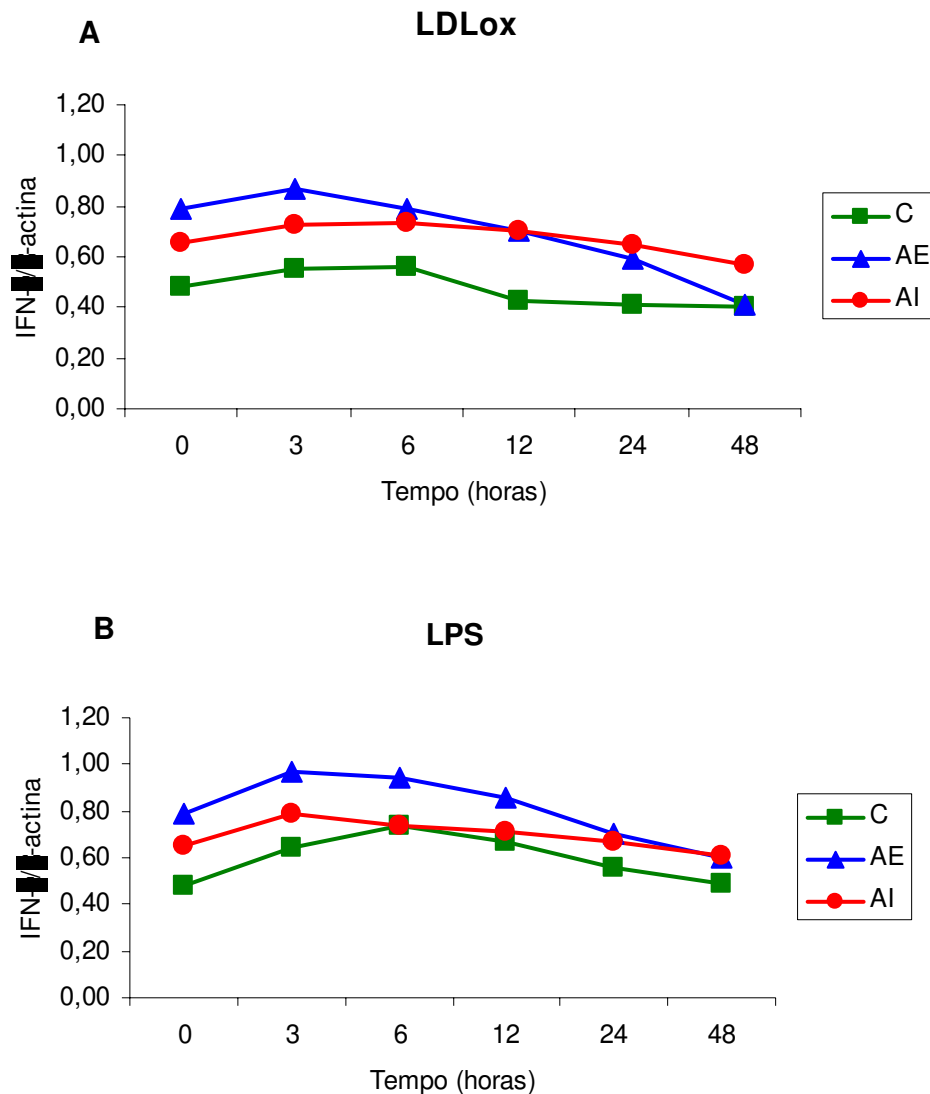


Figura 12 – Análise da cinética de expressão do RNAm para IFN- γ (IFN- γ / β -actina) por CMSP de indivíduos do grupo controle (C) e de pacientes com angina estável (AE) e angina instável (AI). As células foram analisadas no tempo 0 (ex vivo) ou após estimulação por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10 μ g/mL de LDLox (A) ou LPS (B). Os dados estão expressos como mediana. **LDLox** – C: T0 vs. T24, $p=0,02$; T0 vs. T48, $p=0,04$. AE: T0 vs. T3, $p=0,02$; T0 vs. T24, $p=0,01$; T0 vs. T48, $p=0,0004$. **LPS** - C: T0 vs. T3, T6, $p=0,0009$; T0 vs. T12, $p=0,003$. AE: T0 vs. T3, T6, $p=0,0002$. AI: T0 vs. T3, $p=0,005$; T0 vs. T6, $p=0,009$; T0 vs. T12, $p=0,04$. Teste estatístico: Wilcoxon.

A análise da produção de IFN- γ por CMSP dos diferentes grupos na ausência ou presença de LDLox ou LPS não mostrou diferenças estatísticas entre os grupos (dados não apresentados).

Em conjunto, a análise da citocina IFN- γ mostrou que as CMSP dos pacientes com DAC apresentaram maior expressão constitutiva do RNAm em comparação ao grupo controle. Após a estimulação com LDLox ou LPS, observamos diferença estatisticamente significativa somente nos pacientes do grupo AE em comparação aos controles.

5- Monocina induzida por interferon- γ (CXCL9/Mig) e proteína induzida por interferon- γ de 10 kDa (CXCL10/IP-10)

a) Pacientes com AI apresentam maior expressão constitutiva de CXCL9 e CXCL10.

A presença de linfócitos Th₁ na placa aterosclerótica está intimamente relacionada com a instabilidade da mesma. Quimiocinas do tipo CXC (não ERL) promovem a quimiotaxia de linfócitos para os sítios de inflamação e representantes deste grupo como CXCL9 e CXCL10 foram detectados nos locais de lesão aterosclerótica.

Em nosso estudo, a análise da expressão constitutiva do RNAm para CXCL9 mostrou uma maior produção nos pacientes com AI em relação ao grupo AE e de ambos em relação ao grupo controle (fig. 10). Após três horas de estimulação com LDLox ocorreu um aumento significativo da expressão desta quimiocina apenas nas células do grupo controle tornando similares as concentrações de RNAm para CXCL9 nos três grupos (fig. 10A). Após 24 horas de estimulação as CMSP do grupo AE apresentaram uma queda significativa na expressão desta quimiocina. (fig. 11A).

Na estimulação com LPS (fig. 10B), notou-se um padrão semelhante de expressão, com os grupos AE e AI apresentando maiores concentrações do RNAm nos tempos de 3 e 6 horas, em relação ao grupo controle, embora a diferença fosse estatisticamente significativa apenas em relação ao grupo AE (fig. 11B).

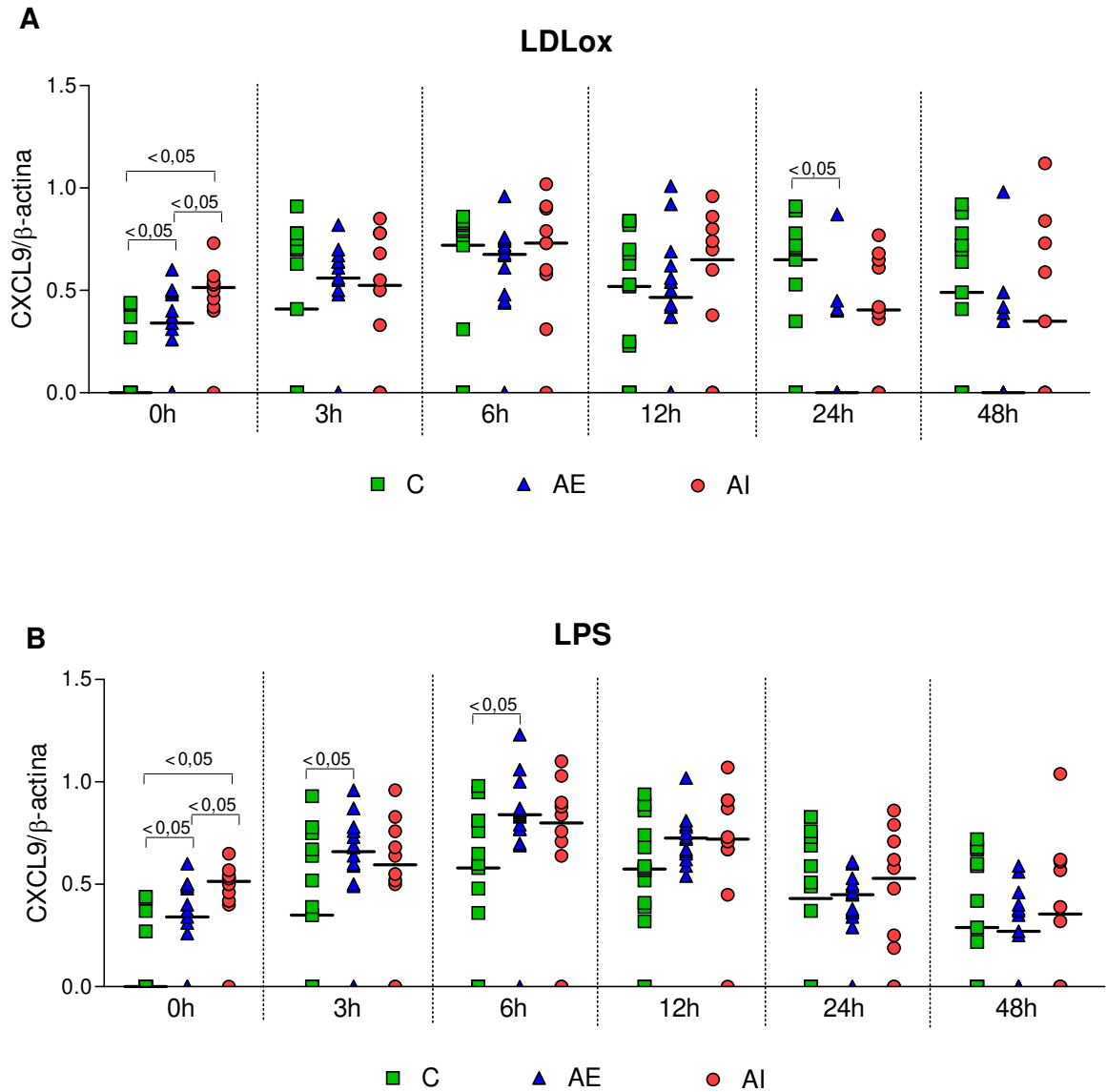


Figura 13 – Análise semi-quantitativa da expressão do RNAm para CXCL9 (CXCL9/ β -actina) por CMSP de indivíduos do grupo controle (C) e de pacientes com angina estável (AE) e angina instável (AI). As células foram analisadas no tempo 0 (ex vivo) ou após estimulação por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10 μ g/mL de LDLox (A) ou LPS (B). As linhas horizontais representam a mediana. Os valores de p estão indicados sobre os colchetes. Teste estatístico: Kruskal Wallis com pós teste Dunn.

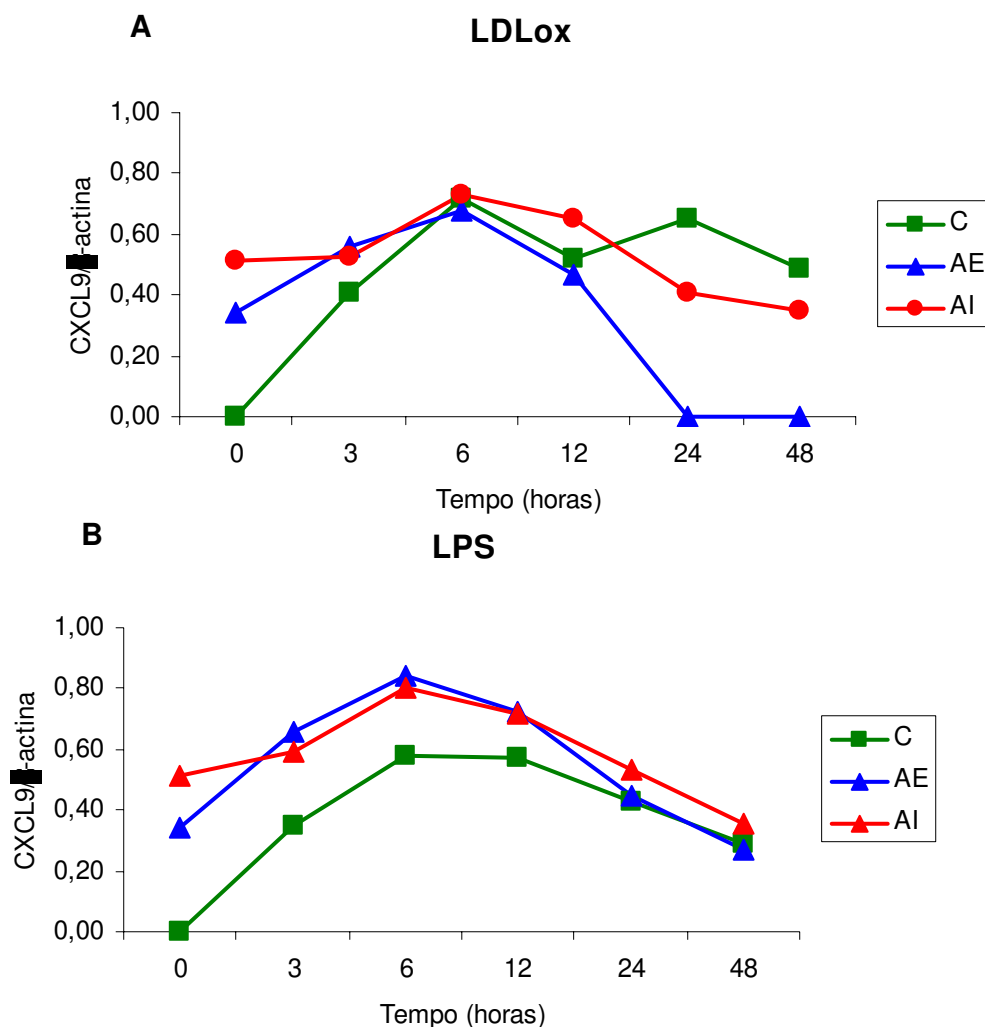


Figura 14 – Análise da cinética de expressão do RNAm para CXCL9 (CXCL9/β-actina) por CMSP de indivíduos do grupo controle (C) e de pacientes com angina estável (AE) e angina instável (AI). As células foram analisadas no tempo 0 (ex vivo) ou após estimulação por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10μg/mL de LDLox (A) ou LPS (B). Os dados estão expressos como mediana. **LDLox** – C: T0 vs. T3, $p=0,01$; T0 vs. T6, $p=0,007$; T0 vs. T12, T24, $p=0,003$; T0 vs. T48, $p=0,007$. **LPS** - C: T0 vs. T3, $p=0,01$; T0 vs. T6, $p=0,007$. T0 vs. T12, $p=0,002$; T0 vs. T24, $p=0,007$; T0 vs. T48, $p=0,03$. AE: T0 vs. T3, $p=0,0005$; T0 vs. T6, $p=0,0002$; T0 vs. T12, $p=0,0005$. Teste estatístico: Wilcoxon.

Na análise da expressão do RNAm para CXCL10, observamos que os pacientes com DAC (AE e AI) expressaram concentrações mais elevadas desta quimiocina de forma constitutiva (tempo 0) em relação ao grupo controle. Após a estimulação com LDLox (fig. 12A), não houve diferença significativa na expressão do RNAm entre os grupos analisados. De maneira geral após 3 horas de estimulação todos os grupos apresentaram expressão maior em relação ao tempo 0. A partir de 6 horas os grupos controle e AI produziram concentrações constantes de CXCL10 até o final do período analisado (48 horas). Entretanto, no grupo AE ocorreu queda significativa na expressão após 24 horas de estimulação. (Fig. 13A)

Quando o estímulo utilizado foi o LPS (fig. 12B), pudemos observar que os pacientes do grupo AE produziram quantidades maiores do RNAm nos tempos 3 e 6 horas, quando comparados com o controle. Na cinética de expressão, todos os grupos expressaram quantidades comparáveis do RNAm (fig. 13B), com aumento após 3 horas e queda após 12 e 24 horas (grupos com DAC e controle, respectivamente, fig. 13 B).

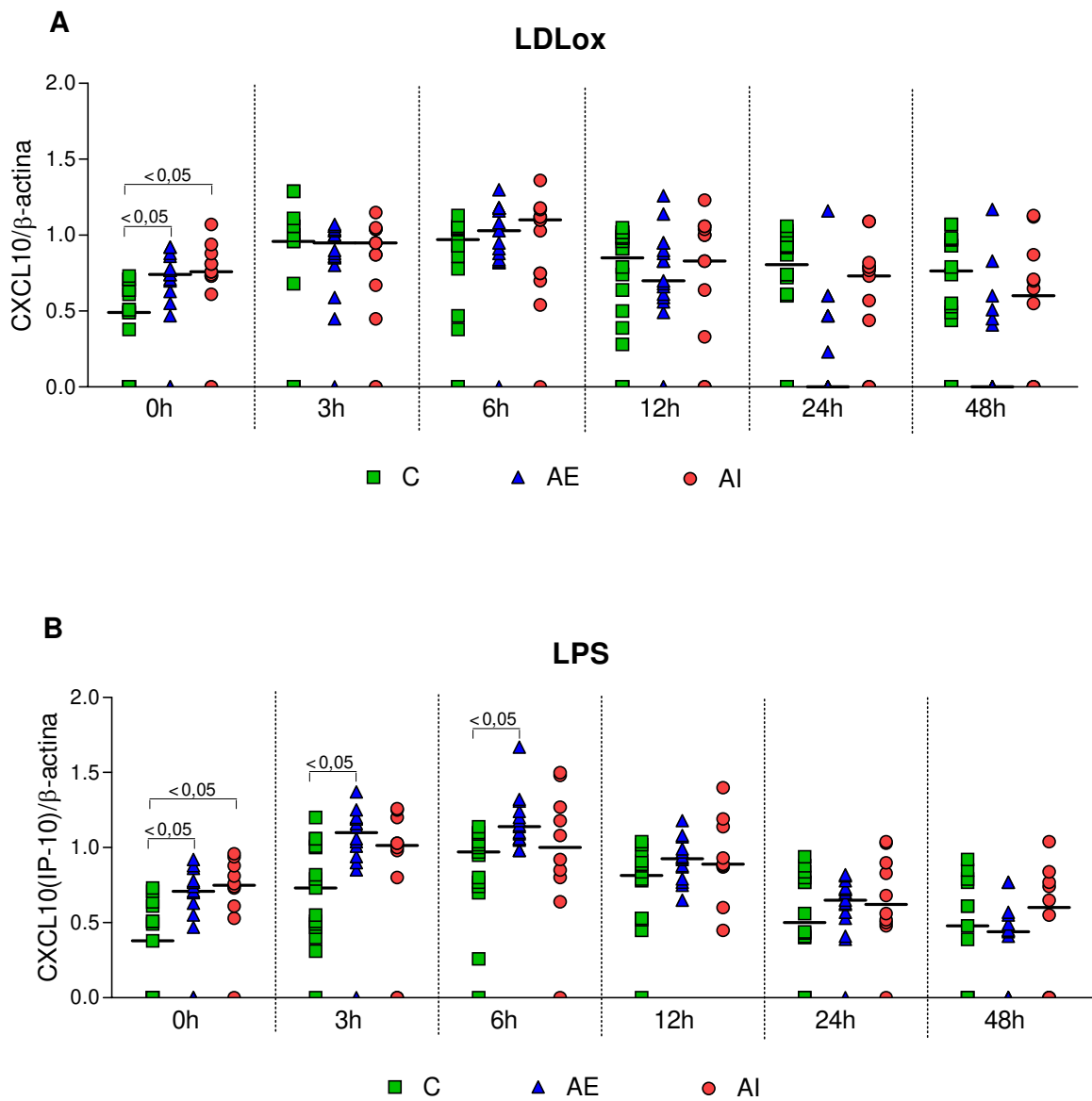


Figura 15 – Análise semi-quantitativa da expressão do RNAm para CXCL10 (CXCL10/β-actina) por CMSP de indivíduos do grupo controle (C) e de pacientes com angina estável (AE) e angina instável (AI). As células foram analisadas no tempo 0 (ex vivo) ou após estimulação por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10 µg/mL de LDLox (A) ou LPS (B). As linhas horizontais representam a mediana. Os valores de *p* estão indicados sobre os colchetes. Teste estatístico: Kruskal Wallis com pós teste Dunn.

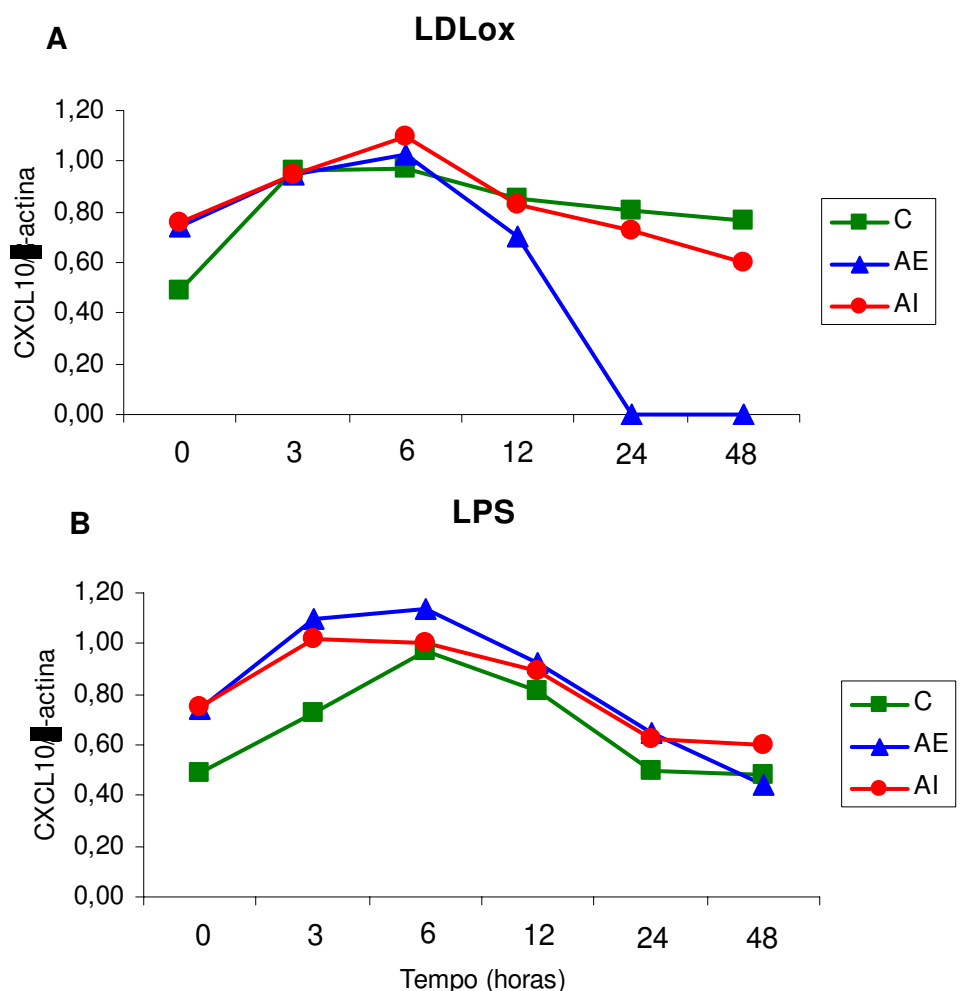


Figura 16 – Análise da cinética de expressão do RNAm para CXCL10 (CXCL10/β-actina) por CMSP de indivíduos do grupo controle (C) e de pacientes com angina estável (AE) e angina instável (AI). As células foram analisadas no tempo 0 (ex vivo) ou após estimulação por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10 µg/mL de LDLox (A) ou LPS (B). Os dados estão expressos como mediana. **LDLox** – C: T0 vs. T3, $p=0,007$; T0 vs. T6, T12, $p=0,001$; T0 vs. T24, T48, $p=0,002$. AE: T0 vs. T3, $p=0,01$; T0 vs. T6, $p=0,004$; T0 vs. T24, $p=0,01$; T0 vs. T48, $p=0,03$. AI: T0 vs. T6, $p=0,03$. **LPS** – C: T0 vs. T3, $p=0,002$; T0 vs. T6, $p=0,001$; T0 vs. T12, $p=0,002$; T0 vs. T24, $p=0,01$. AE: T0 vs. T3, T6, $p=0,0002$; T0 vs. T12, $p=0,001$; T0 vs. T48, $p=0,03$. AI: T0 vs. T6, T12, $p=0,007$. Teste estatístico: Wilcoxon.

b) Concentrações plasmáticas de CXCL9 e CXCL10 estão mais elevadas em pacientes com AI em relação ao grupo AE e controle

A análise dos sobrenadantes de cultura de CMSP estimuladas ou não com LDLox ou LPS não apresentou diferenças estatísticas significativas na produção das quimionas CXCL9 e CXCL10 entre os diferentes grupos (dados não apresentados). Por outro lado, a dosagem plasmática mostrou concentrações mais elevadas das duas quimionas em pacientes do grupo AI e uma tendência de maior produção de CXCL9 no grupo AE ($p=0,054$), comparados ao grupo controle (fig. 14).

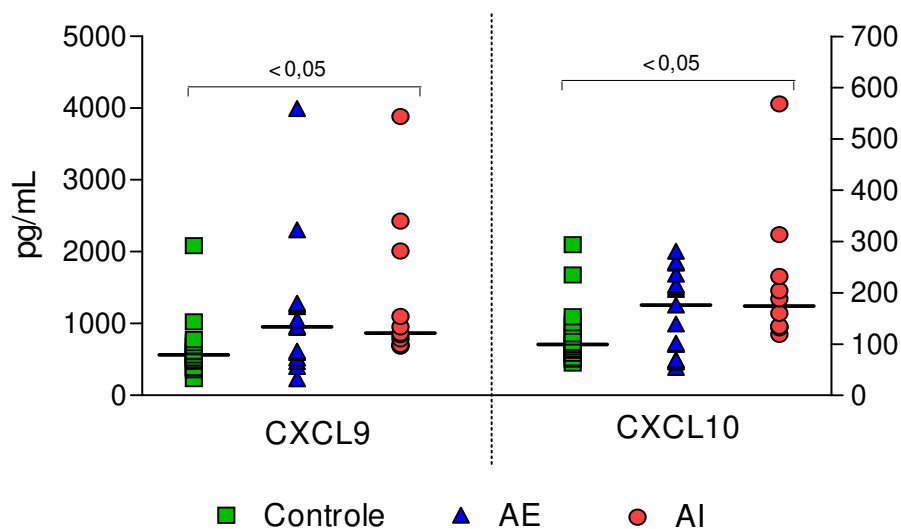


Figura 17 – Concentrações plasmáticas de CXCL9 e CXCL10 em indivíduos do grupo controle e em pacientes com angina estável (AE) e angina instável (AI), determinados por ELISA. As linhas horizontais representam a mediana. Os valores de p estão indicados sobre os colchetes. Teste estatístico: Kruskal Wallis com pós teste Dunn.

c) Após estimulação, as CMSP dos pacientes com DAC apresentaram maior expressão do receptor CXCR3.

As quimiocinas CXCL9 e CXCL10 promovem o recrutamento de linfócitos Th₁ para a placa aterosclerótica, por meio da sua ligação a receptores do tipo CXCR3.

A análise da expressão constitutiva de CXCR3 em linfócitos não mostrou diferença significativa entre pacientes com DAC e o grupo controle. Entretanto, nos pacientes com DAC ocorreu um aumento da porcentagem de células CXCR3⁺ após a manutenção em cultura por 24h na ausência de estímulos ou na presença de LDLox ou LPS. Por outro lado, no grupo controle a porcentagem de células CXCR3⁺ não se alterou significativamente nas condições estudadas (fig. 15).

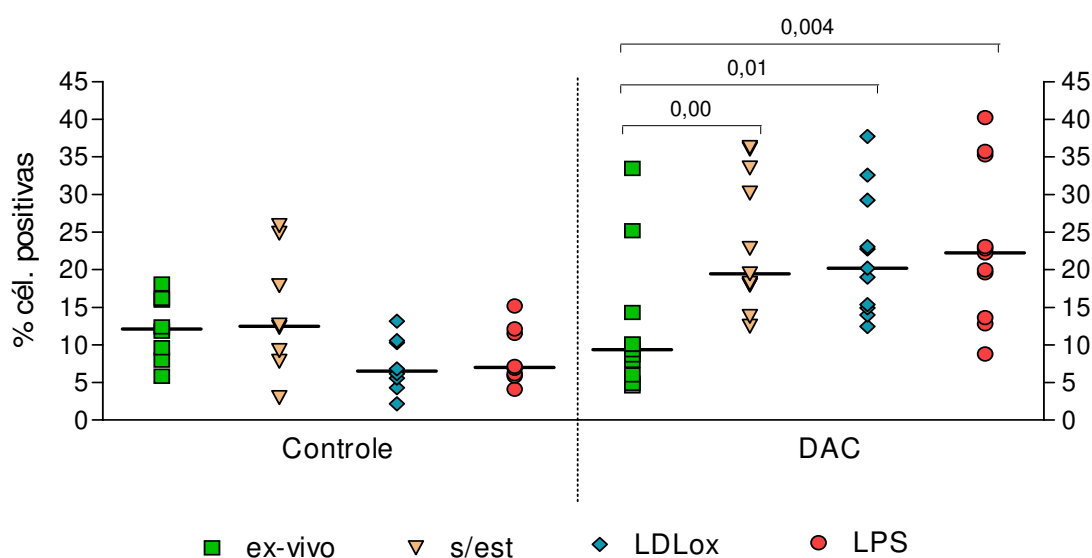


Figura 18 – Análise por citometria de fluxo da expressão de CXCR3 por linfócitos de controles e pacientes com DAC, cultivadas por 24 horas na ausência ou presença de 50 µg/mL de LDLox ou 10 µg/mL LPS com brefeldina A (1µg/mL). Resultados referentes a porcentagem de células positivas. As linhas horizontais representam a mediana. Os valores de *p* estão indicados sobre os colchetes. Teste estatístico: Wilcoxon.

A análise da intensidade média de fluorescência *ex vivo* não mostrou diferença significativa em linfócitos de pacientes com DAC e o grupo controle. Nos pacientes com DAC ocorreu uma queda na intensidade de fluorescência para CXCR3 após a manutenção em cultura por 24h na ausência de estímulos ou na presença de LDLox ou LPS. O inverso foi observado no grupo controle, no qual um aumento na intensidade de fluorescência ocorreu em todas as condições testadas (fig. 16).

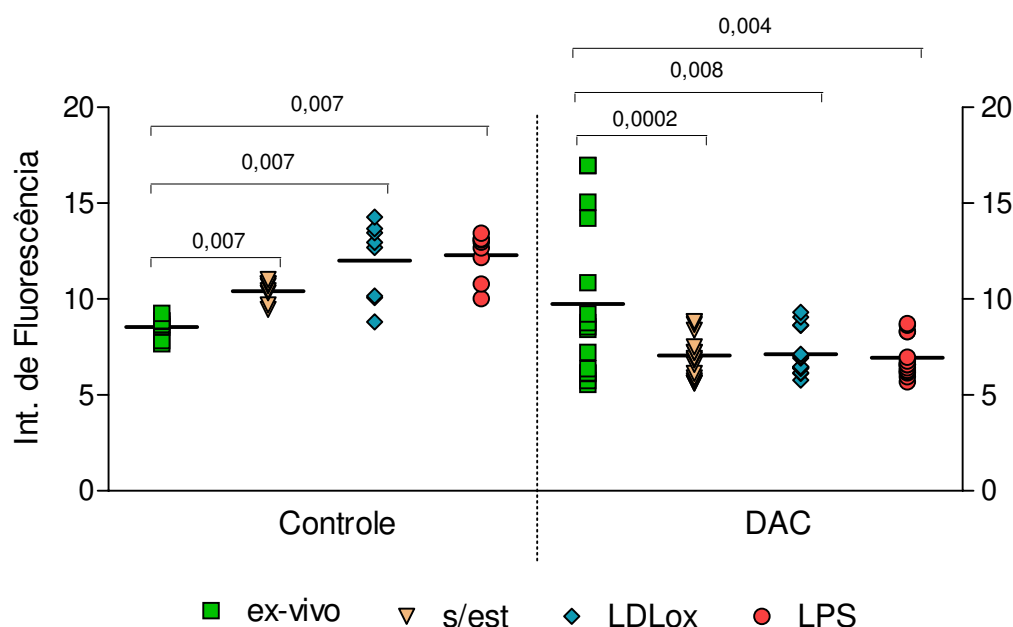


Figura 19 – Análise por citometria de fluxo da expressão de CXCR3 por linfócitos de controles e pacientes com DAC, cultivadas por 24 horas na ausência ou presença de 50 µg/mL de LDLox ou 10 µg/mL de LPS com brefeldina A (1µg/mL). Resultados referentes a intensidade média de fluorescência. As linhas horizontais representam a mediana. Os valores de p estão indicados sobre os colchetes. Teste estatístico: Mann Whitney.

Em conjunto, observamos maior expressão constitutiva da CXCL9 no grupo AI, e da CXCL10 nos grupos AE e AI, em comparação ao grupo controle. No entanto, quando analisamos a cinética de expressão notamos que as amostras do grupo AE apresentavam expressão menor de CXCL10 em determinado tempo quando comparada

com o grupo controle, ocorrendo o inverso na expressão do RNAm para CXCL10. As concentrações plasmáticas mostraram produção maior das duas quimiocinas pelos pacientes do grupo AI. Quanto à expressão do receptor CXCR3, observamos que os linfócitos dos pacientes com DAC apresentaram maior porcentagem de células positivas, após a cultura, em relação ao grupo controle, ocorrendo o inverso quando analisamos a intensidade de fluorescência.

6- Interleucina-10 (IL-10)

- a) Pacientes com AI apresentam expressão do RNAm para IL-10 mais tardiamente do que pacientes com AE ou controles

A IL-10 é uma citocina com propriedades anti-inflamatórias, com ação inibitória sobre macrófagos e outros componentes que contribuem para a estabilidade da placa aterosclerótica.

Ao analisar a cinética de expressão do RNAm para IL-10 observamos que não houve diferença na expressão constitutiva entre os grupos. Após 3h de estimulação com LDLox (fig. 17A) ocorreu um aumento acentuado na expressão de IL-10 nos grupos controle e AE, o mesmo não ocorrendo com o grupo AI, no qual a elevação foi mais lenta. A partir de 6 horas os grupos apresentaram expressão semelhante com queda mais acentuada nos pacientes com DAC após 48 horas de estimulação (fig. 18A).

Com a utilização do LPS (fig. 17B) como estímulo, as CMSP do grupo AE e controle apresentaram expressão maior do RNAm no tempo 3 horas, em relação ao grupo AI. Na avaliação da cinética de expressão do RNAm para IL-10 observamos um padrão semelhante ao anterior (LDLox), com o grupo AI apresentando elevação mais tardia (fig. 18B).

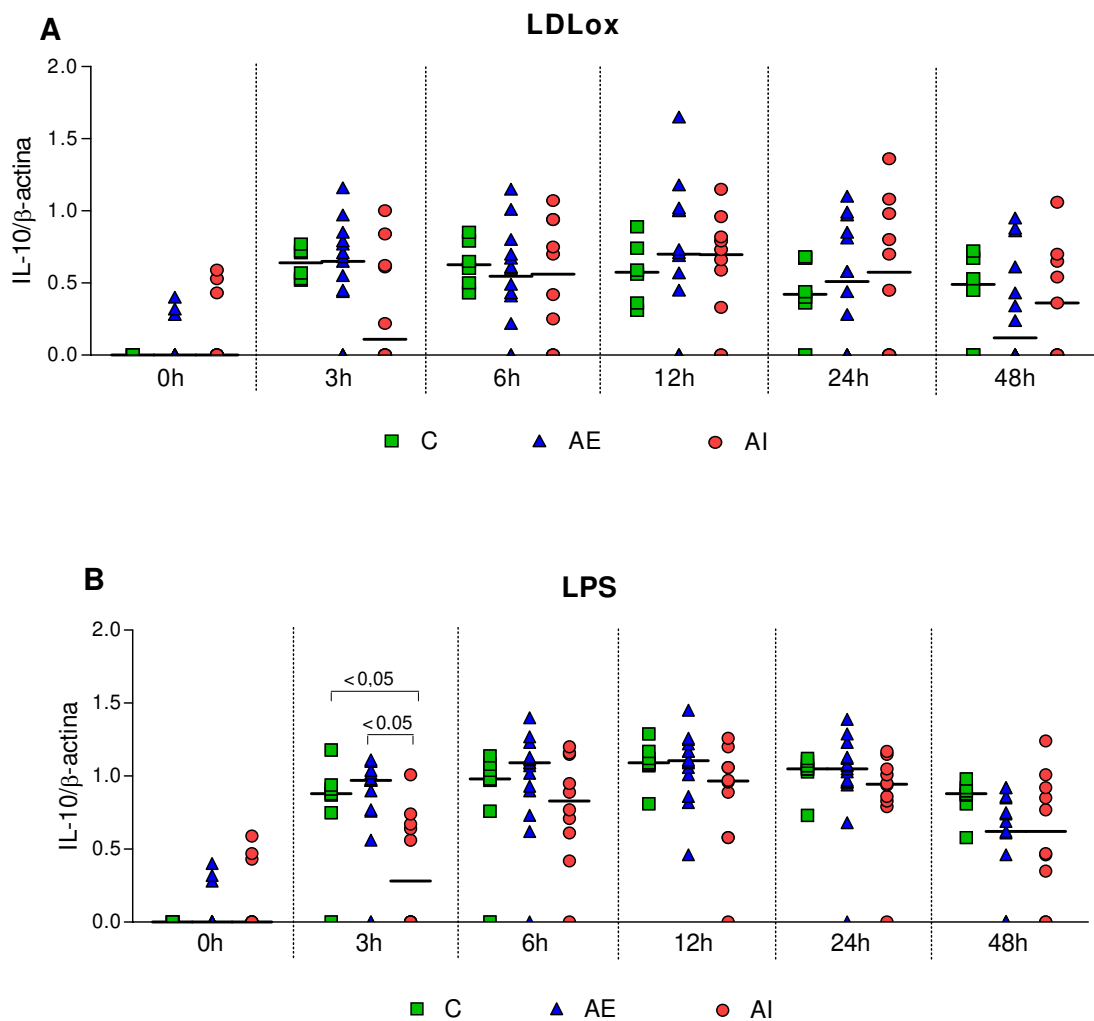


Figura 20 – Análise semi-quantitativa da expressão do RNAm para IL-10 (IL-10/β-actina) por CMSP de indivíduos do grupo controle (C) e de pacientes com angina estável (AE) e angina instável (AI). As células foram analisadas no tempo 0 (ex vivo) ou após estimulação por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10μg/mL de LDLox (A) ou LPS (B). As linhas horizontais representam a mediana. Os valores de p estão indicados sobre os colchetes. Teste estatístico: Kruskal Wallis com pós teste Dunn.

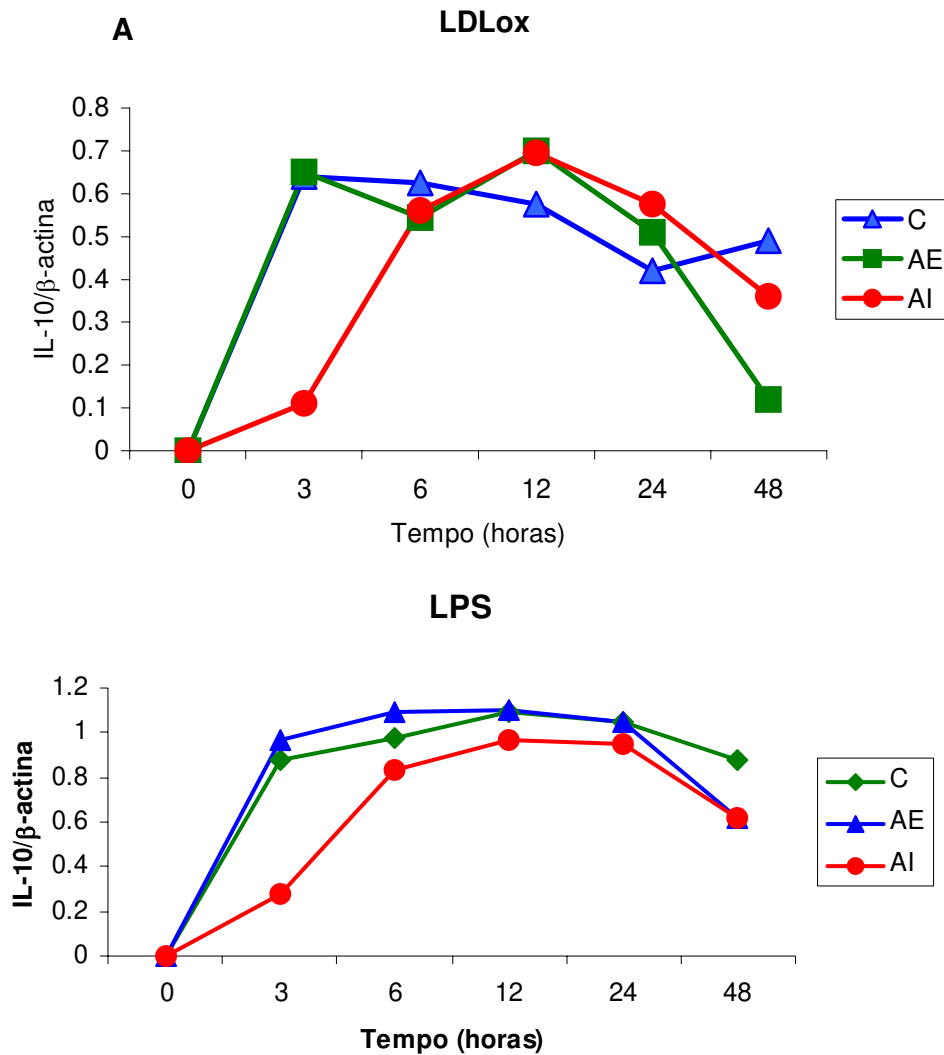


Figura 21 – Análise da cinética de expressão do RNAm para IL-10 (IL-10/β-actina) por CMSP de indivíduos do grupo controle (C) e de pacientes com angina estável (AE) e angina instável (AI). As células foram analisadas no tempo 0 (ex vivo) ou após estimulação por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10 µg/mL de LDLox (A) ou LPS (B). Os dados estão expressos como mediana. **LDLox** – C: T0 vs. T3, T6, T12, $p=0,03$; AE: T0 vs. T3, T6, $p=0,002$; T0 vs. T12, $p=0,003$; T0 vs. T24, $p=0,01$; T0 vs. T48, $p=0,04$. AI: T0 vs. T12, $p=0,03$. **LPS** - C: T0 vs. T3, T6, $p=0,03$; T0 vs. T12, T24, $p=0,003$; T0 vs. T48, $p=0,007$. AE: T0 vs. T3, $p=0,0005$; T0 vs. T6, T12, T24, $p=0,0002$; T0 vs. T48, $p=0,003$. AI: T0 vs. T6, T12, T24, $p=0,0002$; T0 vs. T48, $p=0,01$. Teste estatístico: Wilcoxon.

- b) Após estimulação, os linfócitos do grupo DAC expressam menores quantidades de IL-10 intracitoplasmática.

A análise da produção intracitoplasmática de IL-10 em CMSP cultivadas por 24 horas na ausência de estímulos ou na presença de LPS não mostrou diferença estatística na porcentagem de células IL-10⁺ (dados não apresentados). Após a estimulação com LDLox observamos uma diminuição na porcentagem de monócitos IL-10⁺ no grupo DAC em relação ao controle (fig. 19). A análise da porcentagem de células positivas para IL-10 em linfócitos não mostrou diferenças significativas entre os grupos (dados não apresentados).

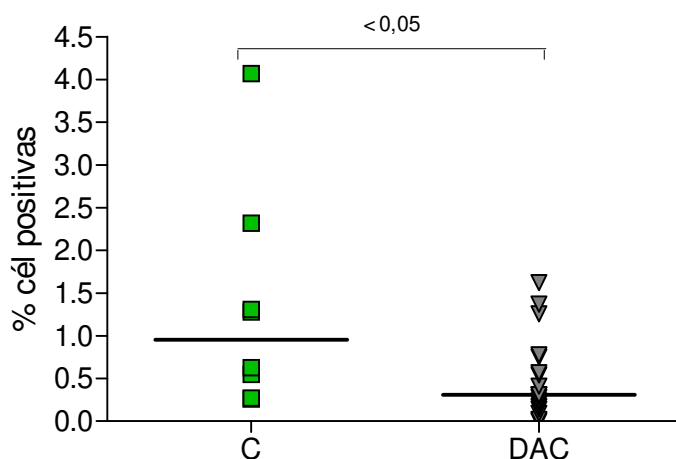


Figura 22 – Análise por citometria de fluxo da expressão de IL-10 por monócitos de controles (C) e pacientes com DAC, cultivadas por 24 horas na presença de 50µg/mL de LDLox com brefeldina A (1µg/mL). Resultados referentes a porcentagem de células positivas para IL-10. As linhas horizontais representam a mediana. Os valores de p estão indicados sobre os colchetes. Teste estatístico: Mann Whitney.

Monócitos do grupo DAC apresentaram menor intensidade média de fluorescência em relação ao grupo controle, após 24 horas de cultura na ausência de estímulos. A estimulação com LDLox ou LPS não resultou em diferenças entre os grupos (fig. 20A). A análise dos linfócitos, entretanto, mostrou uma diminuição na intensidade média de fluorescência, no grupo DAC em relação ao controle, em todas as condições estudadas (fig. 20B).

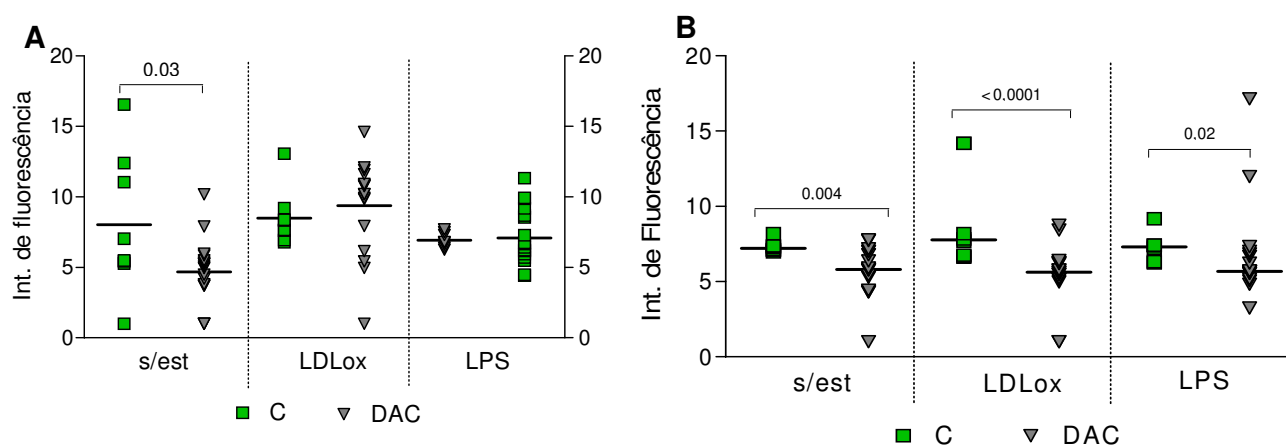


Figura 23 – Análise por citometria de fluxo da expressão de IL-10 por monócitos (A) e linfócitos (B) de controles (C) e pacientes com DAC, cultivadas por 24 horas na ausência ou presença de 50µg/mL de LDLox ou 10 µg/mL de LPS com brefeldina A (1µg/mL). Resultados referentes a intensidade média de fluorescência. As linhas horizontais representam a mediana. Os valores de *p* estão indicados sobre os colchetes. Teste estatístico: Mann Whitney.

Em conjunto, os resultados da análise da IL-10 mostraram que as CMSP dos pacientes com AI apresentaram expressão mais tardia e transiente do RNAm desta citocina em relação aos outros grupos. A análise da produção intracitoplasmática detectou menores quantidades de IL-10 nas células do grupo DAC.

7- Fator de transformação e crescimento (TGF- β)

a) CMSP do grupo AI apresentam menor produção de TGF- β 1 após estimulação com LPS.

A citocina antiinflamatória TGF- β 1 foi detectada em placas aterosclerótica e possui a atividade inibitória sobre a resposta inflamatória, levando a diminuição da produção de citocinas e quimiocinas pelas células presentes no local.

A análise da cinética de expressão do RNAm para TGF- β 1 não mostrou diferenças estatísticas entre os diferentes grupos analisados, seja *ex vivo* ou após estimulação com LPS ou LDLox (dados não apresentados).

A produção de TGF- β 1 por CMSP cultivadas na presença de LPS foi menor no grupo AI em relação aos pacientes AE e ao grupo controle (tendência). Nas outras condições (ausência de estímulo ou LDLox) não foram observadas diferenças entre os grupos (fig. 21).

A dosagem plasmática de TGF- β também não revelou diferenças entre os grupos (dados não apresentados).

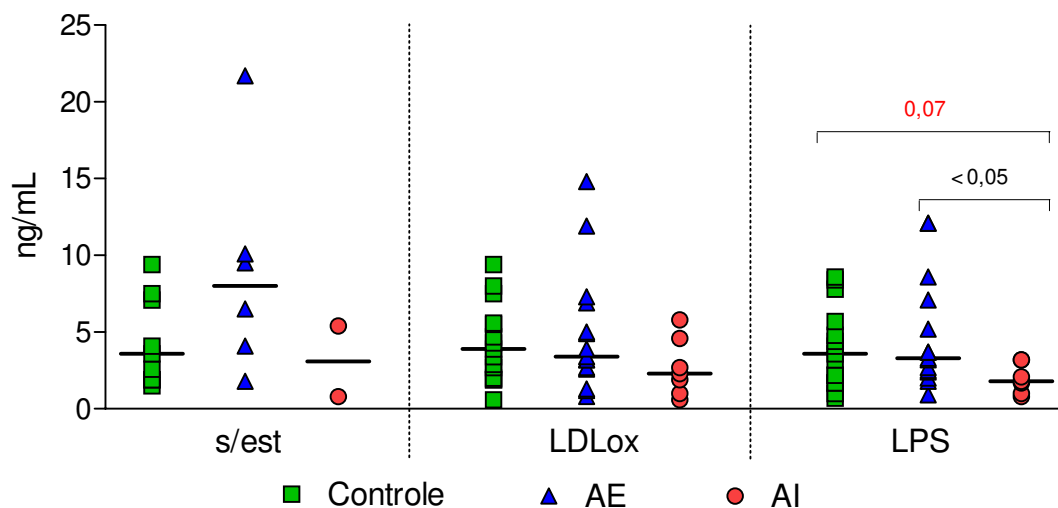


Figura 24 – Concentrações de TGF-β1 em sobrenadantes de cultura de CMSP de indivíduos do grupo controle e de pacientes com angina estável (AE) e angina instável (AI), estimuladas ou não com 10 µg/mL de LDLox ou LPS por 24h. As linhas horizontais representam a mediana. Os valores de p estão indicados sobre os colchetes. Teste estatístico: Kruskal Wallis com pós teste Dunn.



DISCUSSÃO

Várias evidências têm demonstrado a participação de componentes e mediadores da resposta imunológica no desenvolvimento, manutenção e instabilidade da lesão aterosclerótica. Macrófagos e linfócitos são as células presentes em maior número na lesão e são responsáveis pela elaboração de fatores de crescimento e citocinas, que causam hiperplasia da íntima, promovendo a aterogênese (Tedgui e Mallat, 2006).

Para que ocorra o influxo dessas células para o local da lesão é necessária a presença de fatores quimiotáticos, que levam à adesão ao endotélio lesado, ativação e migração (Lusis, 2000).

As quimiocinas, citocinas de baixo peso molecular (8 – 10 kDa), têm um papel bem estabelecido na patogênese da aterosclerose (Charo e Taubman, 2004) e dentre elas a CCL2 merece destaque por regular a migração e infiltração de monócitos/macrófagos para a íntima dos vasos (Egashira, 2003). A CCL2 promove a inflamação vascular crônica, induz trombose, proliferação e migração de células musculares lisas, angiogênese e stress oxidativo.

Neste trabalho verificamos que a expressão do RNAm para CCL2 foi maior em CMSP de pacientes com DAC comparado a controles normais tanto constitutivamente, como após estimulação *in vitro* com LDLox ou LPS. Além disso, observamos que a produção da proteína também foi mais elevada em sobrenadantes de cultura de CMSP de pacientes com angina estável ou instável, após estimulação por 24 horas com LDLox ou LPS. Estes achados sugerem que as células de pacientes com DAC apresentam uma maior capacidade de síntese de CCL2 e conseqüentemente de promover o recrutamento de monócitos quando alojadas em sítios inflamatórios.

Em lesões ateroscleróticas humanas e de animais, ao redor de 80% das células infiltrantes são monócitos/macrófagos e de 10 a 20% são linfócitos T de memória (Moreno et al., 1994). Células que formam o ateroma como células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos expressam CCL2 e seu receptor CCR2 (Peters e Charo, 2001). O CCR2 é o único receptor funcional estabelecido para CCL2 em células hematopoiéticas e a sua deleção em camundongos deficientes em ApoE inibe o acúmulo de macrófagos e conseqüentemente a formação da lesão aterosclerótica (Boring et al., 1998).

Monócitos CCR2⁺ são capazes de responder à presença de CCL2 migrando em direção ao local onde esta quimiocina é produzida (Boring et al. 1997). Nossos dados mostraram que os pacientes com DAC apresentam maior porcentagem de monócitos circulantes CCR2⁺ em relação ao grupo controle, o que poderia refletir uma maior capacidade para responder ao estímulo quimiotático e migrar em direção ao sítio inflamatório. Foi demonstrado que a expressão de CCR2 em monócitos aumenta acentuadamente em indivíduos hipercolesterolêmicos, comparado a indivíduos com níveis normais de colesterol (Han et al., 1998). Outro achado interessante em nosso trabalho foi a diminuição da expressão do receptor CCR2 em monócitos e linfócitos de pacientes com DAC após estimulação *in vitro*, mesmo resultado obtido por Han et al (2000) com células THP-1 na presença de LDLox, sugerindo ser este um provável mecanismo de retenção dessas células na placa.

Diferentemente de Lemos et al. (2003), que descreveram uma associação entre concentrações séricas elevadas de CCL2 e aumento do risco de morte ou infarto agudo do miocárdio em pacientes com DAC, em nosso trabalho a avaliação das concentrações plasmáticas de CCL2 não mostrou diferença entre o grupo controle e pacientes com angina estável ou instável. Entretanto, a maior expressão do RNAm (tanto constitutiva como após estimulação) e da proteína nos pacientes com angina, sugere uma participação desta quimiocina no desenvolvimento da DAC.

Com os dados obtidos podemos especular que as CMSP dos pacientes, por apresentarem maior expressão do receptor CCR2, estariam aptas a responder rapidamente ao estímulo da CCL2, migrando para a placa, onde passariam a secretar a quimiocina após o reconhecimento do LDLox, promovendo a quimiotaxia de mais células. Em seguida a diminuição do receptor CCR2, promovida pela LDLox, propiciaria a retenção das células inflamatórias causando o aumento e complicação da lesão.

Outra quimiocina envolvida no processo presente na aterosclerose é a CXCL8, tradicionalmente implicada no recrutamento de neutrófilos para os locais de inflamação. A ausência de neutrófilos no infiltrado inflamatório das lesões ateroscleróticas tem gerado bastante especulação. Uma possível explicação seria o fato de fosfolipídeos bioativos, provenientes da oxidação da LDL, serem capazes de ativar células endoteliais a expressar

determinadas moléculas de adesão, como VCAM-1, cujos receptores estão presentes preferencialmente em monócitos e linfócitos (Hanson, 2005). Além da CCL2, monócitos também respondem a CXCL8 por meio de seus receptores CXCL1 e CXCL2, justificando mais ainda a sua presença maciça na placa (Quehenberger, 2005).

Romuk et al (2002) detectaram concentrações plasmáticas elevadas de IL-8 em pacientes com AI. Em nosso estudo, não encontramos diferenças quanto aos níveis plasmáticos de IL-8, entretanto, CMSP dos pacientes com DAC apresentaram maior expressão do RNAm (após os diferentes estímulos) e da proteína em cultura (após estímulo específico com LDLox), do que o grupo controle. Interessante notar que após a estimulação com LDLox as concentrações de CXCL8 nos sobrenadantes de cultura foram mais elevadas nos pacientes com AI, seguido pelo grupo AE e finalmente pelo grupo controle, mostrando uma associação entre os níveis desta quimiocina e a gravidade do quadro clínico.

Nas placas mais vulneráveis a liberação local de metaloproteinases por células espumosas contribui para o adelgaçamento da cápsula fibrosa e este processo é controlado por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Foi descrito que a CXCL8 tem a capacidade de inibir a expressão de TIMP-1 em culturas de macrófagos, o que poderia levar a um desequilíbrio entre as concentrações de MMPs e TIMPs e a um aumento da chance de ruptura do ateroma (Moreau et al., 1999). Além da sua ação pró-aterogênica, a CXCL8 também pode ser considerada um fator pró-trombótico, visto que estimula a expressão do RNAm, bem como a síntese protéica de fator tecidual (Neumann et al., 1997).

Outra célula importante para o desenvolvimento e progressão da lesão é o linfócito do subtipo Th₁. Diversos trabalhos têm apontado o papel crucial deste grupo celular na aterosclerose (Benagiano et al, 2003; Fernandes et al, 2004; Methe et al, 2005). A principal função dos linfócitos Th₁ é a produção de IFN- γ , um potente mediador inflamatório, que promove a expressão de moléculas de adesão e aumento da produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos e células endoteliais (Harvey et al, 2005). Quimiocinas induzidas pelo IFN- γ , como CXCL9 e CXCL10, por sua vez, induzem a quimiotaxia específica de linfócitos Th1 através do receptor CXCR3 (Bonecchi et al, 1998).

A detecção de IFN- γ , tanto RNAm como a proteína, em placas ateroscleróticas confirma a sua participação na indução da resposta inflamatória local (Young et al., 2002). Em nosso trabalho, observamos maior expressão constitutiva do RNAm para IFN- γ , em CMSP do grupo com DAC (AE e AI), em relação ao grupo controle. Este resultado fala a favor de uma maior atividade pro-inflamatória nos pacientes, embora não houvesse diferença entre os grupos com AE e AI. Após estimulação com LDLox o grupo AE apresentou expressão maior de IFN- γ do que o grupo controle, nas primeiras 12 horas de cultura, após o qual observou-se uma queda em relação à concentração inicial. Por outro lado, o grupo AI expressou níveis constantes desse RNAm até o final do período analisado. Estes resultados sugerem que a manutenção da produção de IFN- γ pode contribuir para a deterioração do quadro clínico, tendo em vista a sua importante participação na inibição da proliferação de células musculares lisas e da síntese de colágeno, eventos associados à ruptura da placa (Harvey e Ramji, 2005).

Diferentemente dos resultados relativos à expressão do RNAm de IFN- γ , a dosagem da proteína em sobrenadantes de cultura de CMSP estimuladas por LDLox ou LPS não revelou diferenças significativas entre os grupos estudados. Em trabalho anterior também não observamos diferenças quanto a concentração plasmática e a produção *in vitro* de IFN- γ entre pacientes com AE e AI, embora a detecção intracitoplasmática revelasse um número mais elevado de células CD3⁺IFN- γ ⁺ em pacientes com AI, seguido do grupo AE e finalmente do grupo controle (Fernandes et al., 2004).

Dentre as suas múltiplas funções, o IFN- γ induz a síntese de quimiocinas do tipo CXC não ERL, que promovem o recrutamento de linfócitos para o sítio inflamatório. São representantes deste grupo a CXCL9 e a CXCL10, cuja ação está condicionada à sua ligação ao receptor CXCR3 presente em linfócitos do subtipo Th₁ (Bonecchi et al., 1998). Em nosso trabalho a expressão constitutiva do RNAm para CXCL9 e CXCL10 mostrou-se elevada nos pacientes com DAC em relação ao controle. No caso da CXCL9 também se observou diferença entre pacientes com AI e AE, com o primeiro produzindo níveis mais elevados. A maior expressão constitutiva de quimiocinas CXCL sugere que as CMSP foram estimuladas *in vivo* pelo IFN- γ , evidenciando a presença de resposta inflamatória

local, mas com repercussão sistêmica. Estes resultados são concordantes com Liuzzo et al (2001) que encontraram maior expressão constitutiva de RNAm para CXCL10 em pacientes com AI em relação a pacientes com AE e controles sadios.

A análise da cinética revelou que após estimulação com LDLox a expressão das quimiocinas CXC (CXCL9 e CXCL10) praticamente se igualou nos diferentes grupos estudados até 12 horas de cultura, quando então se constatou uma drástica diminuição somente no grupo com AE, em comparação com os pacientes com AI e controle. Este resultado poderia ser interpretado como um reflexo de mecanismos de contenção da resposta inflamatória, contribuindo assim para um quadro clínico mais estável.

A maior parte das células T presentes na placa aterosclerótica é do tipo Th₁, que expressam grande quantidade do receptor CXCR3 (Mach et al., 1999). Nossos resultados mostraram que pacientes com DAC apresentam maior porcentagem de linfócitos CXCR3⁺ em comparação ao grupo controle, tanto em células cultivadas por 24 horas na ausência de estímulo, como na presença de LDLox ou LPS. Em trabalho anterior detectamos uma maior proporção de células CD3⁺CXCR3⁺ em pacientes com angina estável em comparação com pacientes com angina instável e controles. Este resultado foi interpretado como um possível seqüestro destas células para a placa na forma clínica mais grave (angina instável), onde estariam participando ativamente da resposta inflamatória local (Fernandes et al., 2004).

Em contrapartida aos mecanismos pró-inflamatórios, os mediadores anti-inflamatórios podem contribuir para a estabilização da placa, evitando assim a ocorrência de eventos isquêmicos. A produção de IL-10 tem sido aventada como um dos principais mecanismos de controle da resposta inflamatória na aterosclerose (von der Thusen et al, 2003). Em nosso estudo pudemos observar que não houve diferença na produção constitutiva de RNAm para IL-10 entre os grupos estudados. Entretanto, a análise da cinética após estimulação com LDLox mostrou uma expressão mais tardia e transitória do RNAm para IL-10 em pacientes com AI. Padrão semelhante foi observado quando as células foram estimuladas com LPS, com o máximo de expressão ao redor de 12 horas, mas mantendo o padrão de produção mais lenta pelo grupo AI. Em trabalho comparável van Haelst et al. (2004) descreveram que monócitos

circulantes de pacientes com angina instável produzem concentrações similares de TNF- α , mas menores de IL-10 em resposta a estimulação com LPS, quando comparados a controles saudáveis.

A análise da produção intracitoplasmática por monócitos estimulados com LDLox mostrou uma menor porcentagem de células IL-10⁺ em pacientes com DAC em relação ao grupo controle. Adicionalmente, ao analisar a intensidade média de fluorescência observamos que, de maneira geral, os monócitos de pacientes com DAC expressaram menores quantidades de IL-10. Quanto à participação de linfócitos, verificamos não haver diferença na porcentagem de células positivas, mas a intensidade média de fluorescência foi menor no grupo de pacientes com DAC comparando-se ao grupo controle.

Em nossa casuística não verificamos diferenças quanto às concentrações plasmáticas de IL-10 nos diferentes grupos, assim como Waehre et al. (2002).

De maneira geral os resultados referentes à IL-10 mostraram além de uma menor produção nos pacientes com DAC, uma demora na expressão do RNAm mais evidente em CMSP do grupo AI. Estes achados sugerem que a ausência, ainda que temporária, de um componente antiinflamatório como a IL-10 poderia alterar o balanço da resposta imunológica na placa, de modo a favorecer um fenótipo mais instável e grave.

O TGF- β é outra citocina anti-inflamatória que tem papel decisivo na evolução da placa aterosclerótica. Vários estudos sinalizam a importância do TGF- β na aterosclerose como fator prognóstico na coronariopatia (Batuman et al., 2001; Tashiro et al., 2002), como fator de risco em pacientes com doença renal terminal (Stefoni et al., 2002) e na evolução da doença, como inibidor da VCAM-1 (Os et al., 2002) e da ativação de linfócitos T (Robertson et al., 2003), demonstrando um potencial mecanismo de controle inicial e de progressão da lesão. Cipollone et al. (2004) descreveram expressão aumentada do RNAm para TGF- β e um menor número de macrófagos e linfócitos T em placas assintomáticas em comparação com placas sintomáticas, caracterizadas por intensa atividade inflamatória.

Neste trabalho não observamos diferenças quanto a expressão do RNAm ou da concentração plasmática de TGF- β nos grupos estudados. Entretanto, células de pacientes com AI estimuladas em cultura com LPS produziram concentrações menores desta citocina em relação ao grupo AE e controle. Recentemente estudamos a ação da pentoxifilina no tratamento de pacientes com AI e verificamos um aumento das concentrações plasmáticas de TGF- β no grupo que recebeu a droga, associado a um número reduzido de eventos cardiovasculares (Fernandes et al., submetido). Entendemos que neste caso a modulação da resposta inflamatória pela droga permitiu a detecção plasmática da citocina, o que não foi possível no presente estudo.

Concluindo, em nosso trabalho analisamos a produção das quimiocinas CCL2, CXCL8, CXCL9 e CXCL10 e de seus receptores CCR2 e CXCR3, da citocina IFN- γ , assim como dos mediadores antiinflamatórios IL-10 e TGF- β em CMSP de pacientes com DAC, com o objetivo de detectar alterações sistêmicas que pudessem refletir a inflamação local. De maneira geral os resultados mostraram, nos pacientes com DAC, uma modulação positiva dos componentes que predispõem à resposta inflamatória como as quimiocinas que atraem monócitos (CCL2, CXCL8) e células Th1 (CXCL9 e CXCL10) e seus receptores, além do IFN- γ , em contraposição a menor expressão dos mediadores antiinflamatórios (IL-10 e TGF- β). Neste contexto, células capazes de migrar em resposta ao gradiente de quimiocinas seriam ativadas localmente respondendo rapidamente ao antígeno (LDLox) com a produção de grandes quantidades de mediadores, criando um ambiente inflamatório propenso ao surgimento de eventos isquêmicos.

O entendimento do complexo papel das quimiocinas nas várias manifestações da aterosclerose e a aparente redundância da sua expressão requer ainda o esclarecimento de vários pontos. Entretanto, estudos experimentais nesta área estão revelando aplicações terapêuticas promissoras envolvendo a utilização de antagonistas ou anticorpos contra quimiocinas (Wells et al., 2006). Trabalhos desenvolvidos com animais propensos a desenvolver aterosclerose mostram que antagonistas de CC quimiocinas, como a CCL2 e a CCL5, promovem redução da quantidade de lipídeos e do conteúdo de monócitos e linfócitos, assim como o aumento da quantidade de células musculares lisas, limitando a progressão das lesões ateroscleróticas (Bursill et al., 2004; Inoue et al., 2002; Ni et al.,

2001; Veillard et al., 2004; van Wanrooij et al., 2005). Nesta linha estão em andamento estudos utilizando *stents* recobertos de polímero para a liberação local de antagonistas de quimiocinas, visando reduzir a migração celular para o local lesado e consequentemente a resposta inflamatória.



CONCLUSÕES

CMSP de pacientes com DAC apresentam maior expressão constitutiva do RNAm para as quimiocinas CCL2, CXCL8, CXCL9 e CXCL10 e da citocina pró-inflamatória IFN- γ , quando comparadas as células do grupo controle. Estes dados sugerem que a resposta inflamatória presente na placa tem repercussão sistêmica, promovendo a ativação das células mononucleares circulantes.

Após a estimulação em cultura com LDLox, CMSP de pacientes com DAC produzem maiores concentrações de CCL2 e CXCL8 (RNAm e proteína), o que poderia indicar um maior potencial dessas células em responder ao antígeno (LDLox) no local da inflamação (placa aterosclerótica) e como consequência promover o recrutamento de mais monócitos para a lesão. Em relação a CXCL8 foi possível observar uma associação com a gravidade do quadro clínico, visto que ocorre a produção de concentrações mais elevadas nos pacientes com AI, seguido pelo grupo AE e finalmente pelo grupo controle.

Pacientes com DAC apresentam, constitutivamente, uma maior porcentagem de monócitos CCR2⁺ circulantes, que diminui significativamente após estimulação *in vitro* com LDLox. A maior expressão constitutiva do receptor CCR2 em monócitos pode sugerir uma maior capacidade dessas células em responder ao estímulo quimiotático promovido pela CCL2 e a diminuição da expressão sua expressão, bem como a de CXCR3, após estimulação, pode promover a retenção de monócitos e macrófagos no local da inflamação.

A análise das citocinas antiinflamatórias mostrou uma expressão mais tardia e transitória do RNAm para IL-10 nas CMSP de pacientes com AI e menor expressão intracitoplasmática da proteína em linfócitos e monócitos de pacientes com DAC. A menor produção de IL-10 poderia favorecer o agravamento da resposta inflamatória com conseqüente piora do quadro clínico.

Em conjunto os resultados obtidos mostraram que as CMSP dos pacientes com DAC são capazes de produzir concentrações elevadas de mediadores pro-inflamatórios como IFN- γ e quimiocinas envolvidas na ativação e recrutamento de monócitos (CCL2, CXCL8) e linfócitos (CXCL9, CXCL10), assim como de expressar receptores (CCR2 e CXCR3), que os habilitam a responder aos estímulos quimiotáticos. Estas alterações sistêmicas, reflexo do ambiente inflamatório presente na placa aterosclerótica, garantiriam a contínua ativação e migração de células para o sítio inflamatório, criando um ambiente propício ao surgimento de eventos isquêmicos (conforme descrito na figura 24).

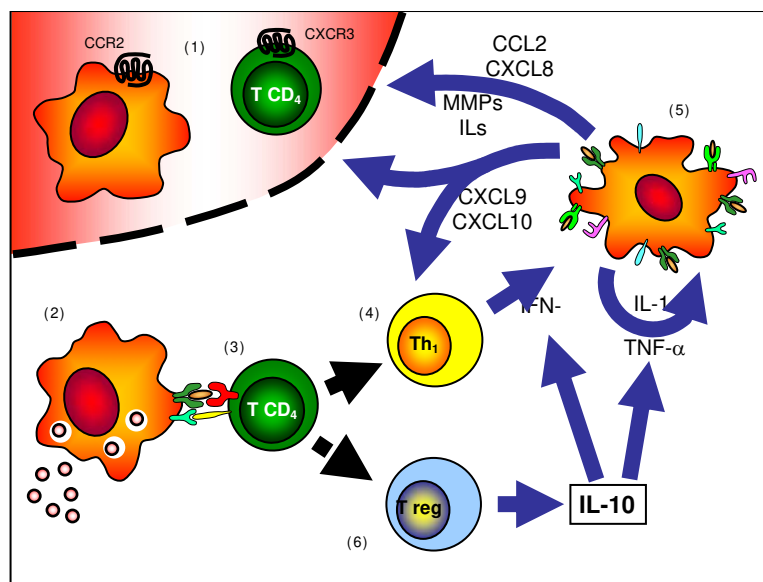


Figura 25 – Representação esquemática da resposta inflamatória presente nos pacientes com doença arterial coronariana. Com base nos resultados obtidos podemos sugerir que em pacientes com doença arterial coronariana a detecção no sangue periférico de (1) células CCR2⁺ (monócitos) e CXCR3⁺ (linfócitos), capazes de expressar e secretar quimiocinas como CCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10 e citocinas como IFN- γ e IL-10, reflete a resposta inflamatória/imunológica presente nos vasos. A expressão constitutiva elevada dos receptores de quimiocina CCR2 e CXCR3 tornam as células aptas a responder rapidamente ao estímulo quimiotático e garante a migração para os locais de lesão aterosclerótica. No interior do ateroma, os monócitos se diferenciam em macrófagos (2), o que leva ao aumento na expressão de receptores capazes de reconhecer antígenos presentes na placa, como a LDLox e a HSP 60. Após o reconhecimento do antígeno, ocorre o processamento, a apresentação e a ativação dos linfócitos do subtipo Th1 (3) que migram para o sítio inflamatório seguindo o gradiente de quimiocinas do tipo CXC. Linfócitos Th1 (4) ativados liberam diversos mediadores da resposta inflamatória, como o IFN- γ , que também contribui para a estimulação dos macrófagos presentes na placa (5). Macrófagos ativados liberam grande quantidade de mediadores, como as quimiocinas CCL2, CXCL8, CXCL9 e CXCL10, que amplificam a migração de células mononucleares para o local da lesão; citocinas, como a IL-1 e o TNF- α que promovem a ativação de macrófagos e células endoteliais presentes na placa; e a liberação de mediadores envolvidos na ruptura da lesão, como as metaloproteinases (MMPs). Em relação à resposta anti-inflamatória, a detecção de linfócitos T com fenótipo regulatório (6) na placa aterosclerótica de humanos e camundongos tem sido aventada como uma possível fonte da IL-10 presente na lesão, que poderia ter um papel no controle da resposta inflamatória local. De acordo com os achados do presente trabalho, uma demora na produção de IL-10, sugerida pela expressão mais tardia do RNAm para esta citocina em pacientes com AI, poderia constituir um dos mecanismos promotores da instabilidade da lesão aterosclerótica.



***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

Allavena P, Bianchi G, Zhou D, Damme J, Jilek P, Sozzani S, et al. Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotatic protein-1, -2, and -3. *Eur J Immunol* 1994; 24: 3233-6.

Apostolopoulos J, Davenport P, Tipping PG. Interleukin-8 production by macrophage from atheromatous plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1007-12.

Bancroft GJ, Schreiber RD, Unanue ER. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol Rev* 1991; 124: 5-24.

Batuman O, Go D, Clark LT, Smith EL, Clements P, Feit A, et al. Relationship between cytokine levels and coronary artery disease in women. *Heart Dis* 2001; 3: 80-4.

Becker AE, de Bôer OJ, van der Wal AC. The role of inflammation and infection in coronary artery disease. *Annu Rev Med* 2001; 52: 89-97.

Benagiano M, Azzurri A, Ciervo A, Amedei A, Tamburini C, Ferrari M, et al. T helper type 1 lymphocytes drive inflammation in human atherosclerotic lesions. *PNAS* 2003; 100: 6658 – 63.

Bendall L. Chemokines and their receptors in disease. *Histol Histopathol* 2005; 20: 907-26.

Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med* 2002; 11: 1218-26.

Binder CJ, Hartvigsen K, Chang MK, Miller M, Broide D, Plinski W, et al. IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis. *J Clin Invest* 2004; 114: 317-9.

Björkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, Koehn S, Ordija CM, Lee MA, et al. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med* 2004; 10: 416-21.

Blankenberg S, Barboux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003; 170: 191-203.

de Boer OJ, Hirsch F, van der Wal AC, van der Loos CM, Das PK, Becker AE. Costimulatory molecules in human atherosclerotic plaques: an indication of antigen specific T lymphocyte activation. *Atherosclerosis* 1997; 133: 227-34.

Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA. A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 1998; 101: 353-63.

Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 1998; 197: 129 – 34.

Boring L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Farese RV Jr. Broxmeyer HE, et al. Impaired monocyte migration and reduced type I (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest* 1997; 100: 2552-61.

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: 894-7.

Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis. *Science* 1996; 272: 685-8.

Brucet M, Marqués L, Sebastián C, Lloberas J, Celada A. Regulation of murine Tap1 and Lmp2 genes in macrophages by interferon gamma is mediated by STAT1 and IRF-1. *Genes Immun* 2004; 5: 26-35.

Buono C, Lichtman AH. Co-stimulation and plaque-antigen-specific T-cell responses in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14: 166-72.

Buono C, Pang H, Uchida Y, Libby P, Sharpe AH, Lichtman AH. B7-1/B7-2 costimulation regulates plaque antigen-specific T-cell responses and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 2004; 109: 2009-15.

Buono C, Binder CJ, Stavrakis G, Witztum JL, Glimcher LH. T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses. *PNAS* 2005; 102: 1596-601.

Bursill CA, Choudhury RP, Ali Z, Greaves DR, Channon KM. Broad spectrum CC-chemokine blockade by gene transfer inhibits macrophage recruitment and atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 2004; 110: 2460-6.

Carr, MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts a T-lymphocyte chemoattractant. *PNAS* 1994; 91: 3652-6.

Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res* 2004; 95: 858-66.

Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *NEJM* 2006; 354: 610-21.

Chen H, Li D, Saldeen T, Mehta JL. Transforming growth factor β_1 modulates oxidatively modified LDL-induced expression of adhesion molecules: Role of LOX-1. *Cir Res* 2001; 89: 1155-60.

Cipollone F, Fazia M, Mincione G, Iezzi A, Pini B, Cuccurullo C, et al. Increased expression of transforming growth factor-beta1 as a stabilizing factor in human atherosclerotic plaques. *Stroke* 2004; 35: 2253-7.

Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* 2000; 191: 189-94.

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: 1255-62.

Davenport P, Tipping PG. The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol* 2003; 163: 1117-25.

Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Khamis TA, et al. CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res* 2005; 96: 881-9.

Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E- selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* 1998; 102: 145-52.

Dutra WO, Gollob KJ, Pinto-Dias JC, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R, Coffman RL, et al. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection. *Scan J Immunol* 1997; 45: 74 – 80.

Edfelt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan Z. Expression of Toll-like receptors in human atherosclerotic lesions. A possible pathway for plaque activation. *Circulation* 2002; } 105: 1158-61.

Egashira K. Molecular mechanisms mediating inflammation in vascular disease. Special reference to monocyte chemoattractant protein-1. *Hypertension* 2003; 41: 834-41.

Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, et al. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 2000; 105: 1049-56.

Febbraio M, Guy E, Silverstein RL. Stem cell transplantation reveals that absence of macrophage CD36 is protective against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 2333-8.

Fernandes JL, Mamoni RL, Orford JL, Garcia C, Selwyn AP, Coelho OR, et al. Increased Th1 activity in patients with coronary artery disease. *Cytokine* 2004; 26: 131-7.

Fernandes JL, Oliveira RTD, Mamoni RL, Coelho OR, Nicolau JC, Blotta MHSL, et al. Pentoxifylline reduces proinflammatory and increases antiinflammatory activity in patients with coronary artery disease - a randomized placebo-controlled study. (submetido).

Fernvik EC, Ketelhuth DF, Russo M, Gidlund M. The autoantibody repertoire against copper – or macrophage – modified LDL differs in normolipidemics and hypercholesterolemic patients. *J Clin Immunol* 2004; 24: 170-6.

Flach R, Speidel N, Flohe S, Borgermann J, Dresen IG, Erhard J, et al. Analysis of intragraft cytokine expression during early reperfusion after liver transplantation using semi-quantitative RT-PCR. *Cytokine* 1998; 10: 445 – 51.

Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 1999; 145: 33-43.

Geng YJ, Wu Q, Muszynski M, Hansson GK, Libby P. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 19-27.

Georganas C, Liu H, Perlman H, Hoffmann A, Thimmapaya B, Pope RM. Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis fibroblasts: the dominant role for NF-kB but not C/Epb or c-Jun. *J Immunol* 2000; 165: 7199-7206.

Gerdes N, Sukhova GK, Libby P, Reynolds RS, Young JL, Schöenbeck 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: 245-57.

Gerszten RE, Zepeda EAG, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 1999; 398: 718-23.

Gojova A, Brun V, Esposito B, Cottrez F, Gourdy P, Ardouin P, et al. Specific abrogation of transforming growth factor β signaling in T cells alter atherosclerotic lesion size and composition in mice. *Blood* 2003; 102: 4052-8.

Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest* 1999; 103: 773-8.

Greaves DR, Hakkinen T, Lucas AD, Liddiard K, Jones E, Quinn CM, et al. linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 923-9.

Gupta S, Pablo AM, Jiang XC, Wang, N, Tall AR, Schindler C. IFN- γ potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest* 1997; 99: 2752-61.

van Haelst PL, Tervaert JWC, Blizet J, Volkers B, May, JF, Langeveld, et al. Circulating monocytes in patients with acute coronary syndromes lack sufficient interleukin-10 production after lipopolysaccharide stimulation. *Clin Exp Immunol* 2004; 138: 364-8.

Haley KJ, Lilly CM, Yang JH, Feng Y, Kennedy SP, Turi TG, et al. Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis. Using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation. *Circulation* 2000; 102: 2185-9.

Han J, Nicholson AC. Lipoproteins modulate expression of the macrophage scavenger receptor. *Am J Pathol* 1998; 152: 1647-54.

Han KH, Chang MK, Boullier A, Green SR, Li A, Glass CK, et al. Oxidized LDL reduces monocyte CCR2 expression through pathways involving peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Clin Invest* 2000; 106: 793-802.

Hansson GK, Libby P, Schönbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002; 91: 281-91.

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *NEJM* 2005; 352: 1685-95.

Hansson GK, Robertson AKL, Naucler CS. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2006; 1: 297-329.

Haque NS, Zhang X, French DL, Li J, Poon M, Fallon JT, et al. CC chemokine I-309 is the principal monocyte chemoattractant induced by apolipoprotein(a) in human vascular endothelial cells. *Circulation* 2000; 102: 786-92.

Harvey EJ, Ramji DP. Interferon-gamma and atherosclerosis: pro- or anti-atherogenic? *Cardiovasc Res* 2005; 67: 11 – 20.

Hatakeyama M, Imaizumi T, Tamo W, Yamashita K, Yoshida H, Fukuda I, et al. Heparin inhibits IFN-gamma-induced fractalkine/CX3CL1 expression in human endothelial cells. *Inflammation* 2004; 28: 7-13.

Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Boersma E, Simoons ML, et al. Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003; 107: 2109-14.

Henn V, Slupsky JR, Grafës M, Anagnostopoulos I, Förster R, Berghaus GM, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391: 591-4.

Herttuala SY, Lipton BA, Rosenfeld ME, Särkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *PNAS* 1991; 88: 5252-6.

Inoue S, Egashira K, Ni W, Kitamoto S, Usui M, Otani K, et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in Apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 2002; 106: 2700-6.

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.

Jiang Y, Beller DI, Frendl G, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* 1992; 148: 2423-8.

Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1986; 6: 131-8.

Kanda, N, Watanabe S. Gangliosides GD1b, GT1b, and GQ1b enhance IL-2 and IFN- γ production and suppress IL-4 and IL-5 production in phytohemagglutinin-stimulated human T cells. *J Immunol* 2001; 166: 72-80.

Klouché M, Gottschling S, Gerl V, Hell W, Husmann M, Dorweiler B, et al. Atherogenic properties of enzymatically degraded LDL. Selective induction of MCP-1 and cytotoxic effects on human macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1376-85.

Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 1992; 90: 1138-44.

Kume N, Murase T, Moriwaki H, Aoyama T, Sawamura T, Masaki T, et al. Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ Res* 1998; 83: 322-7.

Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14: 421-30.

Lemos JA, Morrow DA, Sabatine MS, Murphy SA, Gibson M, Antman EM, et al. Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003; 107: 690 – 5.

Lesnik P, Haskell CA, Charo IF. Decreased atherosclerosis in CX3CR1-/- mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest* 2003; 111: 333-40.

Li D, Mehta JL. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation* 2000; 101: 2889-95.

Li D, Liu L, Chen H, Sawamura T, Mehta JL. LOX-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 816-21.

Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 2000; 247: 349-58.

Ludewig B, Freigang S, Jaggi M, Kurrer MO, YC Pei, VLK L, et al. Linking immune-mediated arterial inflammation and cholesterol-induced atherosclerosis in a transgenic mouse model. *PNAS* 2000; 97: 12752-7.

Liuzzo G, Vallejo AN, Kopechy SL, Frye RL, Holmes DR, Goronzy JJ, et al. Molecular fingerprint of interferon-gamma signaling in unstable angina. *Circulation* 2001; 103: 509-14.

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407: 233-41.

Luster AD. Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *NEJM* 1998; 338: 436-45.

Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJAP, de Muinck ED, Grewal IS, Kotlianky VE, et al. Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis. *Nat Med* 1999; 5: 1313-6.

Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, et al. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: Implications for CD10-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *PNAS* 1997; 94: 1931-6.

Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, et al. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest* 1999; 104: 1041-50.

Mallat Z, Besnard S, Duriez M, Deleuze V, Emmanuel F, Bureau MF, et al. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res* 1999; 85: 17-24.

Mallat Z, Gojova A, Brun V, Esposito B, Fournier N, Cottrez F, et al. Induction of a regulatory T cell type 1 response reduces the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 2003; 108: 1232-7.

McDermott DH, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Merrell MN, Epstein N, et al. Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Circ Res* 2001; 89: 401-7.

McDermott DH, Fong AM, Yang Q, Sechler JM, Cupples LA, Merrell MN, et al. Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in human. *J Clin Invest* 2003; 111: 1241-50.

Mehte H, Brunner S, Wiegand D, Nabauer M, Koglin J, Edelman ER, et al. Enhanced T-helper-1 lymphocyte activation patterns in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1939 – 45.

Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, Doherty TM, et al. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *PNAS* 2004; 101: 10679-84.

Millonig G, Malcom GT, Wick G. Early inflammatory-immunological lesions in juvenile atherosclerosis from the pathobiological determinants of atherosclerosis in youth (PDAY)-study. *Atherosclerosis* 2002; 160: 441-8.

Minami M, Kume N, Shimaoka T, Kataoka H, Hayashida K, Akiyama Y, et al. Expression of SR-PSOX, a novel cell-surface scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized LDL in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1796-800.

Moreau M, Brocheriou I, Petit L, Ninio E, Chapman MJ, Rouis M. Interleukin-8 mediates downregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cholesterol-loaded human macrophages. Relevance to stability of atherosclerotic plaque. *Circulation* 1999; 99: 420-6.

Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newel JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation* 1994; 90: 775-8.

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-73.

Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. Murine macrophages secrete interferon γ upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med* 1998; 187: 2103-8.

Murakami S, Morioka T, Nakagawa Y, Suzuki Y, Arakawa M, Oite T. Expression of adhesion molecules by cultured human glomerular endothelial cells in response to cytokines: comparison to human umbilical vein and dermal microvascular endothelial cells. *Microvasc Res* 2001; 62: 383-91.

Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia: Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997; 100: 2680-90.

Namiki M, Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M, Hirase T, Ishida T, et al. Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophage and formation of atherosclerotic lesion. Synergism with hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 115-20.

Namiki M, Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M, Sakoda T, Inoue N, et al. Intramuscular gene transfer of interleukin-10 cDNA reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Atherosclerosis* 2004; 172: 21-9.

Neumann FJ, Ott I, Marx N, Luther T, Kenngott S, Gawaz M, et al. Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 3399-405.

Ni W, Egashira K, Kitamoto S, Kataoka C, Koyanagi M, Inoue S, et al. New anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 2001; 103: 2096-101.

Os I, Djurovic S, Seljeflot I, Berg K. Transforming growth factor (TGF)-beta1 inversely related to vascular cell adhesion molecule-1 in postmenopausal women with coronary artery disease. A possible mechanism for the putative cardioprotective role of TGF-beta1? J Intern Med 2002; 251: 223-7.

Pattison JM, Nelosn PJ, Huie P, Sibley RK, Krensky AM. RANTES chemokine expression in transplant-associated accelerated atherosclerosis. J Heart Lung Transplant 1996; 15: 1194-9.

Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. Curr Opin Immunol 2002; 14: 123-8.

Pestka S, Krause CD, Walter MK. Interferon, interferon-like cytokines, and their receptors. Immunol Rev 2004; 202: 8-32.

Peters W, Charo IF. Involvement of chemokine receptor 2 and its ligand, monocyte chemoattractant protein-1, in the development of atherosclerosis: lessons from knockout mice. Curr Opin Lipidol 2001; 12: 175-80.

Quehenberger O. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Molecular mechanisms regulating monocyte recruitment in atherosclerosis. J Lipid Res 2005; 46: 1582-90.

Reape TJ, Rayner K, Manning CD, Gee AN, Barnette MS, Burnand KG, et al. Expression and cellular localization of the CC chemokines PARC and ELC in human atherosclerotic plaques. Am J Pathol 1999; 154: 365-74.

Reape TJ, Groot PH. Chemokines and atherosclerosis. Atherosclerosis 1999; 147: 213-25.

Reardon CA, Blachowicz L, White T, Cabana V, Wang Y, Lukens J, et al. Effect of immune deficiency on lipoproteins and atherosclerosis in male apolipoprotein E-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001; 21: 1011-6.

Ribeiro RA, Mello RGB, Melchior R, Dill JC, Hohmann CB, Lucchese AM, et al. Custo anual do Manejo da cardiopatia isquêmica crônica no Brasil: Perspectiva pública e privada. *Arq Bras Cardiol* 2005; 85: 3-8.

Ribeiro S, Horuk R. The clinical potential of chemokine receptor antagonists. *Pharmacol Ther* 2005; 107: 44-58.

Robertson AKL, Rudling M, Zhou X, Gorelik L, Flavell RA, Hansson GK. Disruption of TGF- β signaling in T cells accelerates atherosclerosis. *J Clin Invest* 2003; 112: 1342-50.

Robbins BJ, Yoshimura T, Leonard EJ, Pober JS. Cytokine-activated human endothelial cells secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol* 1990; 136: 1229-33.

Romagnani P, Annunziato F, Lazzeri E, Cosmi L, Beltrame C, Lasagni L, et al. Interferon-inducible protein 10, monokine induced by interferon gamma, and interferon inducible T-cell alpha chemoattractant are produced by thymic epithelial cells and attract T-cell receptor (TCR) alphabeta+ CD8+ single-positive T cells, TCR gammadelta+ T cells, and natural killer-type cells in human thymus. *Blood* 2001; 97: 601 – 7.

Romuk E, Poloczek BS, Wojciechowska C, Tomasik A, Birkner J, Wodniechi J, et al. Selectin-P and interleukin-8 plasma levels in coronary heart disease patients. *Eur J Clin Invest* 2002; 32: 657 – 61.

Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis: Second of two parts. *NEJM* 1976; 295: 420-5.

Ross R. Atherosclerosis: An inflammatory disease. *NEJM* 1999; 340: 115-26.

Sad S, Marcotte R, Mosmann TR. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8⁺ T cells into cytotoxic CD8⁺ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 1995; 2: 271-9.

Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokines receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 1998; 19: 568-74.

Schechter AD, Rollins BJ, Zhang YJ, Charo JF, Fallon JT, Rossikhina M, et al. Tissue factor is induced by monocyte chemoattractant protein-1 in human aortic smooth muscle and THP-1 cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 28568-73.

Schönbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res* 2001; 89: 1092-103.

Skalén K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultén LM, Wiklund O, Innerarity TL, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 2002; 417: 750-4.

Steinberg D. Atherogenesis in perspective: Hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med* 2002; 8: 1211-17.

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. *PNAS* 1995; 92: 8264-8.

Smith DA, Irving SD, Sheldon J, Cole D, Kaski JC. Serum levels of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 are decreased in patients with unstable angina. *Circulation* 2001; 104: 746-9.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol* 2004. v.82.

Song L, Leung C, Schindler C. Lymphocytes are important in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 108: 251-9.

Stemme S, Holm J, Hansson GK. T lymphocytes in human atherosclerotic plaques are memory cells expressing CD45RO and the integrin VLA-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1992; 12: 206-11.

Stefoni S, Cianciolo G, Donati G, Dormi A, Silvestri MG, Coli L, et al. Low TGF- β 1 serum levels are a risk factor for atherosclerosis disease in ESRD patients. *Kidney Int* 2002; 61: 324-35.

Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 1997; 386: 292-6.

Szalai C, Duba J, Prohászka Z, Kalina Á, Szabó T, Nagy B, et al. Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 -2518 G/G genotype in CAD patients. *Atherosclerosis* 2001; 158: 233-9.

Tashiro H, Shimokawa H, Sadamatu K, Yamamoto K. Prognostic significance of plasma concentrations of transforming growth factor β in patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 2002; 13: 139-43.

Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: Pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006; 86: 515-81.

Von der Thüsen JH, Kuiper J, van Berkel TJ, Biessen EA. Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 133-66.

Tupin E, Nicoletti A, Elhage R, Rudling M, Ljunggren HG, Hansson GK, et al. CD1d-dependent activation of NKT cells aggravates atherosclerosis. *J Exp Med* 2004; 199: 417-22.

Uyemura K, Demer LL, Castle SC, Jullien D, Berliner JA, Gately MK. Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis. *J Clin Invest* 1996; 97: 2130-8.

VanderLaan PA, Reardon CA. The unusual suspects: an overview of the minor leukocyte populations in atherosclerosis. *J Lipid Res* 2005; 46: 829-38.

Veillard NR, Kwak B, Pelli G, Mulhaupt F, James RW, Proudfoot AEI, et al. Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice. *Circ Res* 2004; 94: 253-61.

Vink A, Schoneveld AH, van der Meer J, van Middelaar BJ, Sluijter JPG, Smeets MB, et al. In vivo evidence for a role of Toll-like receptor 4 in the development of intimal lesions. *Circulation* 2002; 106: 1985-90.

Vries JE. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. *Ann Med* 1995; 27: 537-41.

Waehre T, Halvorsen B, Damas JK, Yndestad A, Brosstad F, Gullestad L, et al. Inflammatory imbalance between IL-10 and TNFalpha in unstable angina potential plaque stabilizing effects of IL-10. *Eur J Clin Invest* 2002; 32: 803-10.

Wang N, Tabas I, Winchester R, Ravalli S, Rabbani LE, Tall A. Interleukin 8 is induced by cholesterol loading of macrophages and expressed by macrophage foam cells in human atheroma. *J Biol Chem* 1996; 271: 8837-42.

Warner SJ, Friedman GB, Libby P. Immune interferon inhibits proliferation and induces 2'-5'-oligoadenylate synthetase gene expression in human vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1174-82.

van Wanrooij EJA, Happé H, Hauer AD, de vos Paula, Imanishi T, Fujiwara H, et al. HIV entry inhibitor TAK-779 attenuates atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2642-7.

Wells TNC, Power CA, Shaw JP, Proudfoot AEI. Chemokines blockers – therapeutics in the making? *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27: 41-7.

Whitman SC, Ravisankar P, Elam H, Daugherty A. Exogenous Interferon enhances atherosclerosis in Apolipoprotein E-/- mice. *Am J Pathol* 2000; 157: 1819-24.

Whitman SC, Rateri DL, Szilvassy SJ, Yokoyama W, Daugherty A. Depletion of natural killer cell function decreases atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1049-54.

Wilcox JN, Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Schall TJ. Local expression of inflammatory cytokines in human atherosclerotic plaques. *J Atheroscler Thromb* 1994; 1: 10-3.

Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88: 1785-92.

Wong BWC, Wong D, Mcmanus BM. Characterization of fractalkine (CX3CL1) in human coronary arteries with native atherosclerosis, diabetes mellitus, and transplant vascular disease. *Cardiovasc Pathol* 2002; 11: 332-8.

World Health Organization. A race against the time: The challenge of cardiovascular disease in developing economies. 2003. 94p.

Wuttge DM, Zhou X, Sheikine Y, Wagsater D, Stemme V, Hedin U, et al. CXCL16/SR-PSOX is an interferon-gamma-regulated chemokine and scavenger receptor expressed in atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 750-5.

Yamamoto T, Eckes B, Mauch C, Hartmann K, Krieg T. Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinases-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 α -loop. *J Immunol* 2000; 164: 6174-9.

Yilmaz A, Lochno M, Traeg F, Cicha I, Reiss C, Stumpf C, et al. Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques. *Atherosclerosis* 2004; 176: 101-10.

Young YL, libby P, Schonbeck U. Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2002; 88: 554-67.

Xie JH, Nomura N, Lu M, Chen SL, Koch GE, Weng Y, et al. Antibody-mediated blockade of the CXCR3 chemokine receptor results in diminished recruitment of T helper 1 cells into sites of inflammation. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 771-80.

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: 3103-8.

Zhou X, Nicoletti A, Elhage R, Hansson GK. Transfer of CD4+ T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* 2000; 102: 2919-22.

Zhou X, Robertson AKL, Hjerpe C, Hansson GK. Adoptive transfer of CD4+ T cells reactive to modified low-density lipoprotein aggravates atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 864-70.



ANEXOS

Differential expression of cytokines, chemokines and chemokines receptors in patients with coronary artery disease

Rômulo Tadeu Dias de Oliveira^a, Ronei Luciano Mamoni^a, José Roberto Matos Souza^b, Juliano de Lara Fernandes^c, Francisco José O. Rios^d, Magnus Gidlund^d, Otávio Rizzi Coelho^b, Maria Heloisa Souza Lima Blotta^a.

Short title: Chemokines in atherosclerosis

^a Department of Clinical Pathology, ^b Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

^c Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, Brazil

^d Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil.

*Corresponding author: Maria Heloisa S. L. Blotta, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), PO Box 6111, 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Tel: +55 19 3289 9434; fax: +55 19 3289 9434.

e-mail: heblotta@fcm.unicamp.br

Key words: atherosclerosis, inflammation, chemokines

Abstract

Monocytes/macrophages and lymphocytes have a key role in the pathogenesis of atherosclerosis through the production of inflammatory and antiinflammatory cytokines. We evaluated mRNA expression and the in vitro production of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1 or CCL2), interleukin-8 (IL-8 or CXCL8), monokine induced by interferon-gamma (Mig or CXCL9), interferon-inducible protein-10 (IP-10 or CXCL10), interferon gamma (IFN- γ) and interleukin-10 (IL-10), in addition to the expression CCR2 and the CXCR3 in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with stable (SA), unstable angina (UA) and healthy controls stimulated or not with oxidized LDL (LDLox) or with LPS. Our results showed that patients with coronary arterial disease (CAD) presented higher constitutive expression of CCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10, and IFN- γ mRNA and, after stimulation with oxidized LDL, higher expression of CCL2 and CXCL8 mRNA, as compared to the control group. We also detected higher amounts of CCL2 and CXCL8 in supernatants of oxLDL stimulated PBMC of CAD patients, when compared to the controls. Patients with CAD presented higher percentage of CCR2⁺ cells in a constitutive manner and CXCR3⁺ cells after stimulation with LDLox or LPS. The main differences between SA and UA were higher expression of CXCL8 (protein) and CXCL9 mRNA in SA patients and lower IL-10 mRNA in UA patients. All together our data suggest that PBMC of CAD patients are able to produce high concentrations of chemokines and cytokines involved in the regulation of monocytes and lymphocyte migration and retention into atherosclerotic lesions.

Introduction

Chronic inflammation is an important determinant of atherosclerosis and mediators such as adhesion molecules, cytokines and chemokines are involved in the initiation and progression of atherosclerotic lesions [1]. Recruitment of circulating mononuclear leukocytes is one of the earliest events in atherosclerosis [2]. In this context chemokines have an important role promoting the migration and activation of cells at the site of inflammation. CCL2 (MCP-1) is a specific chemotactic factor for monocytes/macrophages and its effects are mediated mainly through CC chemokine receptor 2 (CCR2) [3, 4]. Mice lacking CCL2 or CCR2 show a prominent reduction of atherosclerotic lesion formation [5]. CXCL8 (IL-8), a ELR CXC chemokine, has also been implicated in the atherogenic recruitment of monocytes [6]. In addition to monocytes, CD4 T⁺ cells are also recruited to atherosclerotic lesions and data from human and animal studies show a predominant Th1 cells participation [7, 8]. IFN- γ is the major pro-atherogenic Th1 cytokine, which promotes macrophage and endothelial cells activation [9, 10]. IFN- γ activation also leads to the local expression of specific chemokines like CXCL9 and CXCL10, and their receptor CXCR3 in atheromas [11], which amplifies the original signal and recruits a specific subset of cells [12] to the site of plaque development or rupture.

In opposition to proinflammatory mediators, a regulatory pathway involving antiinflammatory cytokines such as IL-10 influences the inflammatory activation of monocytes in atherosclerosis [13, 14]. IL-10 may arrest and reverse the chronic inflammatory response in established atherosclerosis, as well as limit thrombotic complications [15, 16]. In this study we demonstrated that the expression of inflammatory mediators such as CCL2, CXCL8, IFN- γ , CXCL9 and CXCL10 (mRNA and protein) is upregulated in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of CAD patients in comparison to normal controls, in addition to higher expression of CCR2 and CXCR3. In contrast, IL-10 production was lower and later in CAD patients than in controls.

Material and Methods

Patient Population

A total of twenty-four patients were studied: nine patients (four men, five women) aged 57 (range, 44-86) years consecutively admitted to a tertiary referral hospital with the diagnosis of unstable angina and a group of fifteen randomly drawn patients (twelve men, three women) aged 58 (range, 46-72) seen in as outpatients at the same hospital with the diagnosis of stable angina. Unstable angina was defined as angina at rest or an angina episode lasting over 20 minutes during the preceding 24 hours, with diagnostic ST-segment depression but no evidence of myocardial infarction as determined by serial cardiac muscle enzyme assays (troponin T and creatine kinase [CK] MB isoenzyme). Patients with stable angina were selected during their visit in the outpatient clinic. Stable angina was defined as effort angina of at least 6 months duration, without any change in symptom frequency or severity, and angiographically documented obstructive CAD. Exclusion criteria included decompensated congestive heart failure, clinically significant valvular heart disease, surgery, major trauma or myocardial infarction within the preceding month, thrombotic disorders, malignancy, inflammatory or autoimmune diseases. Sixteen (eleven men, five women) healthy donors served as control. Individuals with evidence of recent infectious disease, immunological disorders, fever, use of anti-inflammatory drugs or neoplastic disease were excluded

Study Procedures

Patients with unstable angina pectoris were admitted to the hospital for routine medical care, including coronary angiography and percutaneous coronary intervention, when indicated. Blood samples were drawn within 48 hours of the index consultation and stored at -80°C. The study complies with the declaration of Helsinki and was approved by the institutional review committee. All patients provided written informed consent.

LDL purification and oxidative modification

Plasma LDL ($1.020 < d < 1.063$ g/ml) was purified from whole blood from a pool of healthy normolipidemic volunteers by sequential ultracentrifugation as previously described[17]. In short, after purification, same day collected LDL was dialyzed against PBS overnight. The purified LDL was then oxidized in vitro with 5 μ M CuSO₄ overnight at 37°C. The reaction was stopped by adding EDTA (1mg/mL final concentration) and 1%BHT (Sigma, St. Louis, USA). The degree of oxidative modification was assessed at 1, 12 and 18 hours by determining thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). The antigen preparation used in this study presented a stationary phase highly oxidized oxLDL preparation. The choice of using copper-oxidized LDL as an antigen was based on previous observations that oxLDL formed by this method carries nearly the same properties as oxLDL found in human lesions[18, 19].

Separation and stimulation of PBMC

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from heparinized venous blood by centrifugation over Ficoll-Hypaque gradient (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), washed twice with cold PBS and resuspended in RPMI 1640 medium (Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA) supplemented with 2 mM glutamine (Sigma, St. Louis, USA), gentamycin (5 μ g/mL - Sigma) and 10% heat inactivated human AB serum, at a concentration of 2×10^6 cells/mL. The cells were cultured in 24 wells plates (Costar,

Cambridge, MA, USA) and stimulated with lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli*/0127:B8 (Sigma, St. Louis, USA; final concentration 10 µg/mL) or oxidized LDL (oxLDL; final concentration 10 µg/mL) for 3, 6, 12, 24 and 48 h at 37 °C in presence of 5% CO₂ or immediately frozen for later *ex vivo* mRNA analysis. After each incubation period the cells were harvested and stored at -70°C until RNA extraction.

RNA extraction and cDNA synthesis

Freshly isolated or in vitro stimulated PBMC were resuspended in TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) and 2 µg of glycogen (carrier) was added to each tube. After addition of chloroform, samples were centrifuged and the aqueous phase was collected. RNA was precipitated with isopropanol, washed twice with ethanol, resuspended in DEPC-treated water and the RNA concentration was determined by optical density. One microgram of RNA from each sample underwent reverse transcription using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen Co.) and oligo(dT) 12-18 (Invitrogen Co.). After incubation at 90 °C for 5 min, 2.6 units of ribonuclease H (Invitrogen Co.) was added to each tube, in order to eliminate any RNA-cDNA strands. The cDNA were stored at -70 °C until amplification.

Polymerase chain reaction (PCR) and quantification of products

PCR was performed using specific primer-pairs, flanking each gene of interest. Primer sequences were based on previously published papers [20, 21] and were designed to span intron/exon junctions, allowing specific amplification of cDNA and preventing the amplification of genomic DNA (Table 1). Amplification of sequences was carried out in a Mastercycler Gradient System (Eppendorf, Hamburg, Germany) using the following reaction conditions: 95 °C melting for 45 s, annealing for 45 s (see Table 1 for temperature) and 72 °C extension for 1 min. The number of amplification cycles varied from 25 to 40 and was established by individual titration for each cytokine/chemokine to give linear amplification (see Table 1 for number of cycles). Amplicons were resolved by 1% agarose

gel electrophoresis and photographed using a photo documentation apparatus (Kodak Edas 290 e Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA) under UV light with ethidium bromide staining. The intensity of each band formed was estimated using the Kodak 1D 3.5 software (Eastman Kodak Co.). Expression of β -actin was evaluated in parallel and used for proper normalization of each sample load in analytic runs.

Table 1- Primer sequences and PCR conditions

Gene	Sequence (5' – 3')	Annealing (°C)	Number of cycles
β -actina	sense – 5' GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG – 3'	55	35
	antisense – 5' GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG – 3'		
CCL2	sense - 5' CAA ACT GAA GCT CGC ACT CTC GCC - 3'	62	30
	antisense – 5' ATT CTT GGG TTG TGG AGT GAG TGT TCA – 3'		
CXCL8	sense - 5' CCA AGG AAA ACT GGG TGC AGA G - 3'	60	25
	antisense - 5' GGC ACA GGG GAA CAA GGA CTT G - 3'		
CXCL9	sense – 5' CAGCAGATGTGAAGGAACTG – 3'	57	35
	antisense – 5' GCATGATGAAATTCAACTGG – 3'		
CXCL10	sense – 5' CAGCCTCTGTGTGGTCCATCCTTG – 3'	60	35
	antisense – 5' TGATTTGCTGCCTTATCTTTCTGA – 3'		
IFN- γ	sense – 5' TTTAATGCAGGTCATTGAGATG – 3'	55	35
	antisense – 5' CTGGGATGCTCTTCGTCCTCGAAAC – 3'		
IL-10	sense – 5' ATCCCCCAAGCTGAGAACCCAAGACCCA – 3'	62	40
	antisense – 5' TCTCAAGGGGCTGGGTCAGCTATCCCA – 3'		

ELISA

Concentrations of CCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10, IFN- γ , IL-10 and were measured in supernatants of PBMC cultures by EIA (R&D systems, Minneapolis, MN, USA). To minimize run-to-run variability, all samples from a given patient were analysed in the same micro-titre plate.

Culture of mononuclear cells for detection of chemokine receptors.

Mononuclear cells were prepared from heparinized venous blood by Ficoll-Hypaque gradient, plated (2×10^6 cells/mL) in 24-well plates and stimulated or not for 24 h with oxLDL (50 μ g/mL) or LPS (10 μ g/mL) in presence of 5% CO₂. After the incubation period the cells were collected and treated with normal human AB serum for 15 min to block Fc receptors and fixed for 20 min in 2% formaldehyde at room temperature. After that, the cells were washed in PBS-1% BSA followed by added of anti-CD3 (CyChrome), anti-CD4 (CyChrome), anti-CD14 (PerCP), anti-CCR2 (PE), anti-CXCR3 (FITC) or isotype-matched controls (BD PharMingen, San Diego, USA) for an additional 30 min incubation. Cells were washed twice with PBS-1% BSA, fixed with 2% formaldehyde and analyzed in a flow-cytometer (FACScalibur, BD Biosciences) using CellQuest software (BD Biosciences). Cells were gated as monocyte or lymphocyte populations by forward and side scatter distribution.

Statistical analysis

The results were analyzed by SigmaStat v1.0 software (Jandel Co.). The differences among the groups were analyzed using the ANOVA test and Dunn's posttest. Comparisons among different time intervals following stimuli were made using the ANOVA test for repeated measures. Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Results

To investigate whether chemokines were differentially expressed in cells of CAD patients we first analyzed mRNA levels of CCL2, the main chemokine involved in monocytes recruitment. The results revealed significantly higher constitutive levels of CCL2 mRNA in PBMC of CAD patients (SA and UA) compared with the control group (fig. 1A, 0h). After 3h in culture with oxLDL the CCL2 mRNA expression increased significantly in all groups maintaining the differences between CAD patients and controls until the end of the period (48h). No differences were detected between SA and UA patients in any time points (fig. 1A). PBMC from CAD patients cultured for 24h in the presence of oxLDL produced elevated levels of CCL2 as compared to cells from control group (data not shown).

The effect of CCL2 is mediated by CCR2 expressed mainly in monocytes. The analysis of constitutive CCR2 expression showed a higher percentage of CCR2⁺ monocytes in patients with CAD as compared to the control group. However, after 24h in culture in the absence or in the presence of oxLDL or LPS a markedly decrease of CCR2 expression was observed in monocytes CAD patients (fig. 1B). Constitutive CCR2 expression in lymphocytes was low in both CAD and control groups but a downregulation of CCR2 expression was also observed in PBMA of CAD patients (data not shown).

The analysis of constitutive CXCL8mRNA revealed a higher expression in SA patients in relation to the UA patients and controls (fig. 2, 0h). After 3h in culture with oxLDL, CXCL8 mRNA expression increased significantly in all groups and remained constant until the end of the period (48h) (fig. 2). PBMC from UA patients cultured for 24h in the presence of oxLDL produced elevated levels of CXCL8 as compared to SA patients, followed by the control group (data not shown).

Patients with CAD expressed more IFN- γ mRNA constitutively than controls (fig.3). After oxLDL stimulation SA presented more IFN- γ mRNA at 3, 6 and 12h while UA patients at 12 and 24h as compared to controls (fig. 7).

Constitutive expression of IFN- γ inducible chemokines CXCL9 and CXCL10 mRNA was also higher in UA as compared to SA patients, followed by the control group (fig. 4 A and B, 0h). After 3h of culture in the presence of oxLDL there was an upregulation of CXCL9 and CXCL10 mRNA expression that remained basically constant during the whole period. The only exception was SA patients who showed a remarkable decay in the expression of both CXCL9 and CXCL10 mRNA at 24 and 48h (fig. 4 A and B).

CXCL9 and CXCL10 share the same receptor, CXCR3, expressed predominantly on Th1 lymphocytes. Higher amounts CXCR3⁺ lymphocytes were detected in CAD patients after 24h in culture without stimulation or in the presence of oxLDL or LPS (fig. 4C). On the other hand, no differences were observed in relation to the control group.

The evaluation of anti-inflammatory cytokine IL-10 showed no differences among the groups in relation to constitutive expression (fig. 5, 0h). After 3h in the presence of oxLDL there was a significant increase in IL-10 message in PBMC of SA patients and controls. Patients with UA started to express IL-10mRNA later and only after 6h it reached the levels exhibited by SA and controls.

Discussion

Based on the literature showing the importance of chemokines and chemokine receptors in the development of atherosclerosis, we decided to investigate their expression in patients with CAD. Our findings from mRNA and protein expression suggest that PBMC of CAD patients are able to secrete CCL2 and consequently promote the recruitment of monocytes when produced at inflammatory sites. In human and animal atherosclerotic lesions around 80% of the cells are monocytes/macrophages and 10-20% are memory T lymphocytes [22]. Other cells within the atheroma are endothelial cells, smooth muscle cells and macrophages that express CCL2 and its receptor CCR2 [23]. CCR2 is the only functional receptor for CCL2 in hematopoietic cells and its deletion in ApoE^{-/-} mice inhibit the accumulation of macrophages and consequently the size of lesions [24]. CCR2 macrophages are able to respond to CCL2 gradient moving in direction to the site where the chemokine is being produced.

Our data showed a higher percentage of CCR2⁺ monocytes in CAD patients in relation to the control group, which could account for an increased ability to migrate in direction to the site of inflammation. It was demonstrate that CCR2 expression in monocytes increases markedly in hypercholesteronemics individual in comparison to normal [25]. Another interesting finding in our study was the downregulation of CCR2 in monocytes and lymphocytes of CAD patients after in vitro stimulation with oxLDL and LPS. Han et al (2000) [26] demonstrated that oxLDL caused a rapid dowregulation of CCR2 expression in THP1 cells and, after that, these monocytes no longer responded to CCL2. Acting as a negative regulator of CCR2 expression, oxLDL may promote the arrest of newly recruited monocytes in the arterial wall, allowing for their cytokine-and growth factor induced maturation to macrophages [25].

Romuk at al [27] found high plasma concencentration of CXCL8 in patients with UA. We showed that PBMC of CAD patients expressed higher levels of CXCL8 (mRNA and protein) after oxLDL stimulation. Moreover CXCL8 levels correlated with the severity of the inflammatory since they were higher in patients with UA in comparison to SA and controls.

Another important component for the development and progression of atherosclerotic lesion are the Th1 lymphocytes. Th1 cells main function is to secrete the potent proinflammatory cytokine IFN- γ . We observed higher constitutive IFN- γ mRNA levels in CAD patients in relation to controls. Moreover, differently of SA patients, IFN- γ mRNA levels were constant in UA patients, which may account for the maintenance of the local inflammatory process and plaque instability.

Among other functions, IFN- γ induces the secretion of CXCL9 and CXCL10 which signal through a common receptor, CXCR3, expressed by memory (CD45RO⁺) T cells, preferentially of the Th1 subset [11]. Our findings of elevated levels of CXCL9 and CXCL10 mRNA suggest that PBMC of CAD patients were stimulated *in vivo* by IFN- γ and also demonstrate the systemic repercussion of a local inflammation. The kinetics analysis showed that after oxLDL stimulation CXCL9 and CXCL10 mRNA expression increased in UA, SA patients and controls until 12h of culture and then, a drastic decreased was observed only for SA patients. This finding may reflect the presence of anti-inflammatory mechanisms controlling the inflammatory response in SA group, accounting to a chronic instead of an acute of coronary disease. Recent studies have suggested a functional role for the effector T-cell chemoattractant CXCL10 in atherosclerotic lesion formation by modulating the local balance of the effector and regulatory arms of the immune system [28, 29].

The majority of lymphocytes detected in the atherosclerotic lesion is Th1 and express high amounts of CXCR3 [12]. Our results showed higher percentage of CXCR3⁺ cells in patients with CAD as compared to the control group. After different stimulations there was an upregulation of CXCR3 expression.

Our data concerning the expression of IL-10 mRNA did not differentiate UA patients from SA and controls. However, the kinetics analyses showed a late and brief expression of IL-10 mRNA in UA patients, in relation to SA and controls. This data may indicate a protective antiinflammatory environment in SA patients at early stages of atherogenesis that might prevail over the expression of proinflammatory molecules. In accordance Haelst et al [30] described low levels of IL-10 in UA patients.

All together our data suggest that PBMC of CAD patients are able to produce high concentrations of chemokines and cytokines involved in the regulation of monocytes and lymphocyte migration and retention into atherosclerotic lesions. After migration and activation, these cells would be ready to quickly respond to the antigen (oxLDL) producing high amounts of inflammatory mediators, which may contribute to plaque instability, and the development of acute coronary syndromes. Therapeutic interventions targeting molecular events associated with chemokines signaling offer novel approaches to the treatment of atherosclerosis.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Grant 04/01697-6.

References

- [1] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-95.
- [2] Quehenberger O. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Molecular mechanisms regulating monocyte recruitment in atherosclerosis. *J Lipid Res* 2005; 46: 1582-90.
- [3] Egashira K. Molecular mechanisms mediating inflammation in vascular disease: special reference to monocyte chemoattractant protein-1. *Hypertension* 2003; 41: 834-41.
- [4] Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006; 354: 610-21.
- [5] Boring L, Gosling J, Cleary M et al. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998; 394: 894-7.

- [6] Wang N, Tabas I, Winchester R et al. Interleukin 8 is induced by cholesterol loading of macrophages and expressed by macrophage foam cells in human atheroma. *J Biol Chem* 1996; 271: 8837-42.
- [7] Fernandes JL, Mamoni RL, Orford JL et al. Increased Th1 activity in patients with coronary artery disease. *Cytokine* 2004; 26: 131-7.
- [8] Methe H, Brunner S, Wiegand D et al. Enhanced T-helper-1 lymphocyte activation patterns in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1939-45.
- [9] Whitman SC, Ravisankar P, Elam H et al. Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice. *Am J Pathol* 2000; 157: 1819-24.
- [10] Tellides G, Tereb DA, Kirkiles-Smith NC et al. Interferon-gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes. *Nature* 2000; 403: 207-11.
- [11] Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 1998; 187: 129-34.
- [12] Mach F, Sauty A, Iarossi AS et al. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest* 1999; 104: 1041-50.
- [13] Mallat Z, Besnard S, Duriez M et al. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res* 1999; 85: e17-24.
- [14] Mallat Z, Heymes C, Ohan J et al. Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 611-6.
- [15] Pinderski Oslund LJ, Hedrick CC, Olvera T et al. Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2847-53.

- [16] Terkeltaub RA. IL-10: An "immunologic scalpel" for atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2823-5.
- [17] Frostegard J, Nilsson J, Haegerstrand A et al., Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937, in *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990. p. 904-8.
- [18] Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME et al., Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man, in *J Clin Invest*. 1989. p. 1086-95.
- [19] Hoff HF, O'Neil J, Lesion-derived low density lipoprotein and oxidized low density lipoprotein share a lability for aggregation, leading to enhanced macrophage degradation, in *Arterioscler Thromb*. 1991. p. 1209-22.
- [20] Li D, Mehta JL. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation* 2000; 101: 2889-95.
- [21] Mamoni RL, Blotta MH. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine* 2005; 32: 20-9.
- [22] Moreno PR, Bernardi VH, Lopez-Cuellar J et al. Macrophage infiltration predicts restenosis after coronary intervention in patients with unstable angina. *Circulation* 1996; 94: 3098-102.
- [23] Peters W, Charo IF. Involvement of chemokine receptor 2 and its ligand, monocyte chemoattractant protein-1, in the development of atherosclerosis: lessons from knockout mice. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12: 175-80.
- [24] Boring L, Gosling J, Chensue SW et al. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest* 1997; 100: 2552-61.

- [25] Han KH, Tangirala RK, Green SR et al. Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes. A regulatory role for plasma LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1983-91.
- [26] Han KH, Chang MK, Boullier A et al. Oxidized LDL reduces monocyte CCR2 expression through pathways involving peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Clin Invest* 2000; 106: 793-802.
- [27] Romuk E, Skrzep-Poloczek B, Wojciechowska C et al. Selectin-P and interleukin-8 plasma levels in coronary heart disease patients. *Eur J Clin Invest* 2002; 32: 657-61.
- [28] Heller EA, Liu E, Tager AM et al. Chemokine CXCL10 Promotes Atherogenesis by Modulating the Local Balance of Effector and Regulatory T Cells. *Circulation* 2006;
- [29] Veillard NR, Steffens S, Pelli G et al. Differential influence of chemokine receptors CCR2 and CXCR3 in development of atherosclerosis in vivo. *Circulation* 2005; 112: 870-8.
- [30] van Haelst PL, Tervaert JW, Bijzet J et al. Circulating monocytes in patients with acute coronary syndromes lack sufficient interleukin-10 production after lipopolysaccharide stimulation. *Clin Exp Immunol* 2004; 138: 364-8.

Figure 1

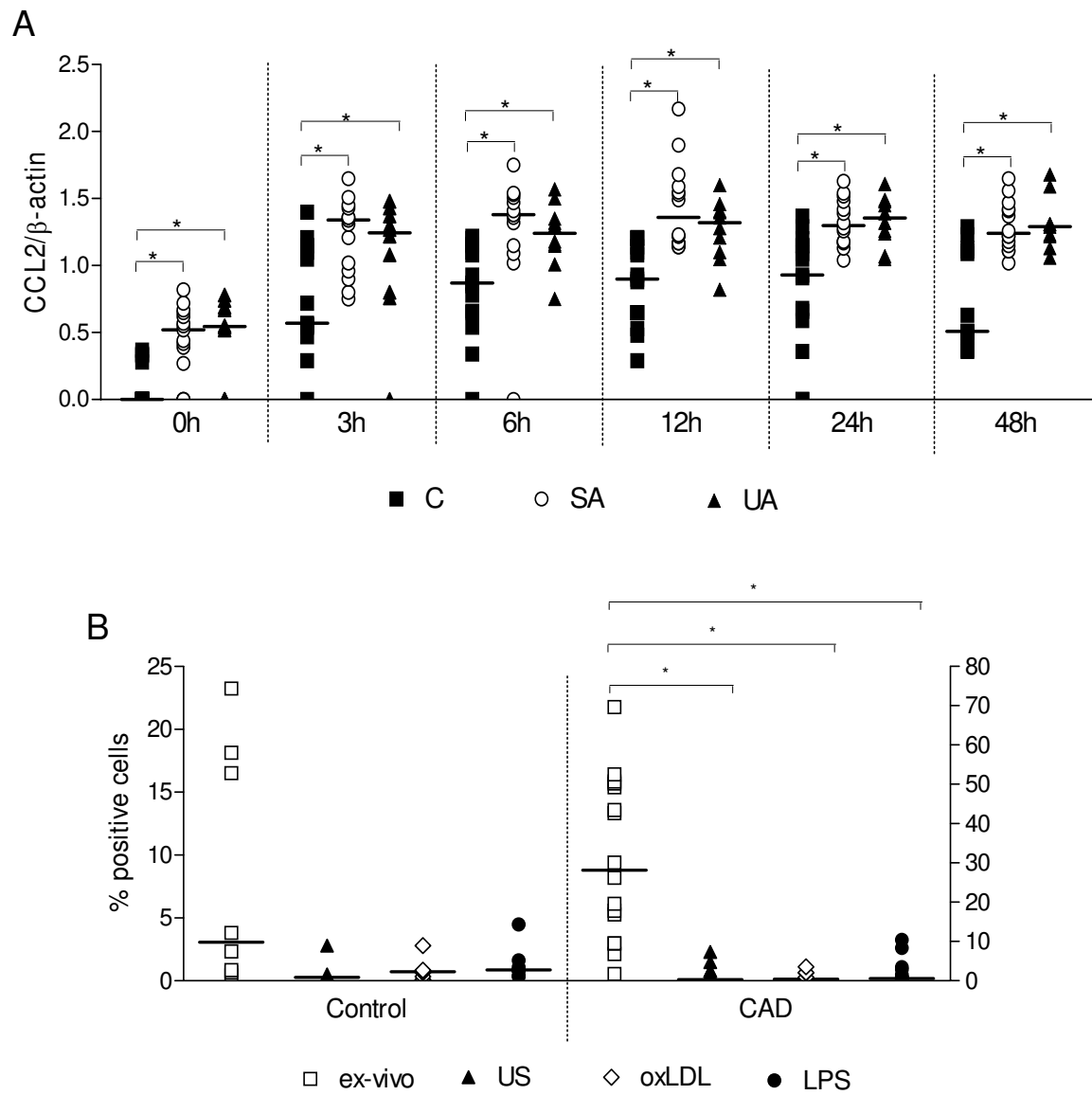


Figure 2

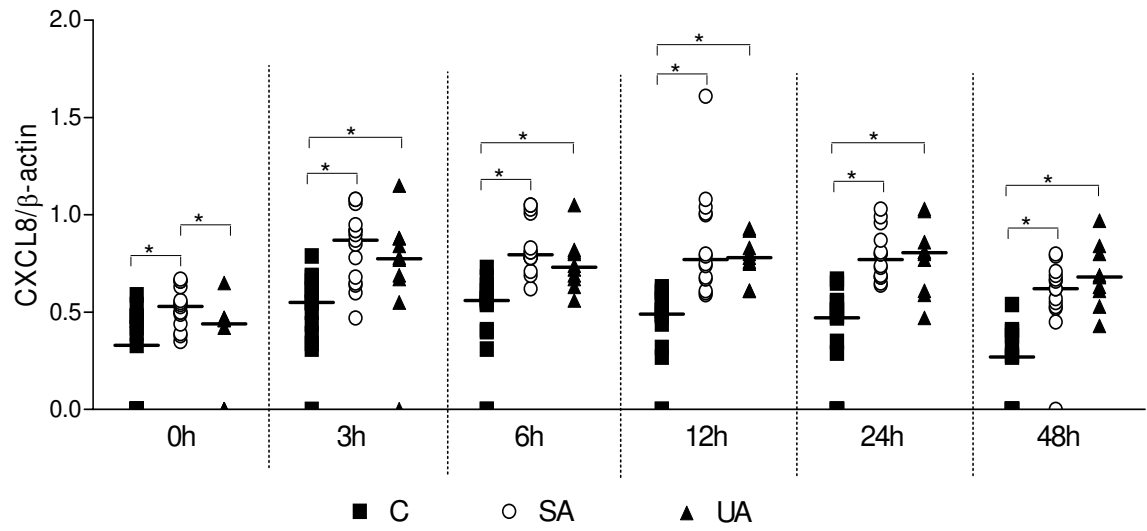


Figure 3

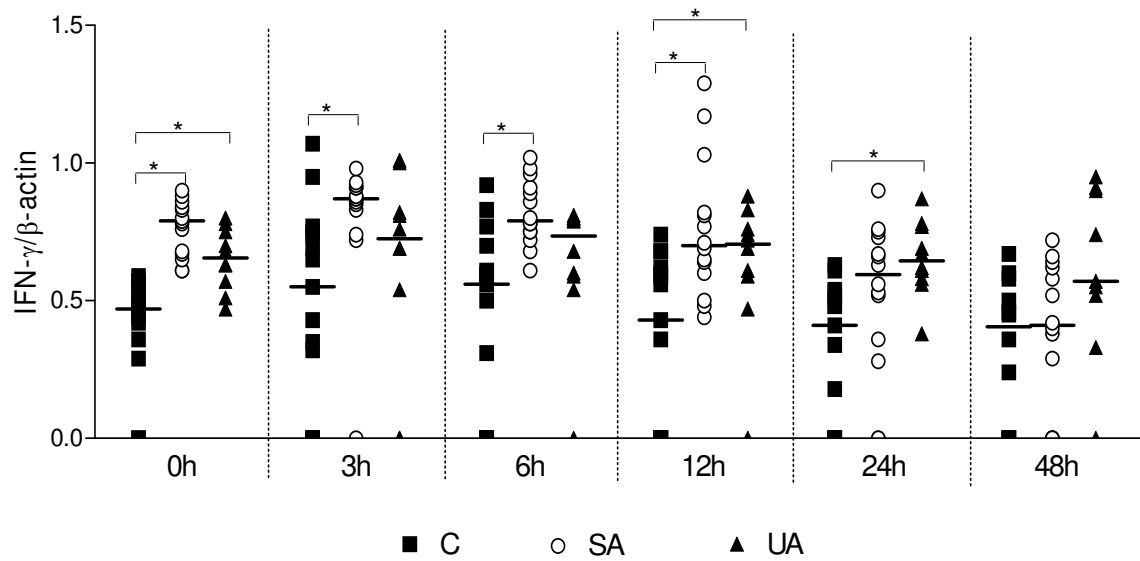


Figure 4

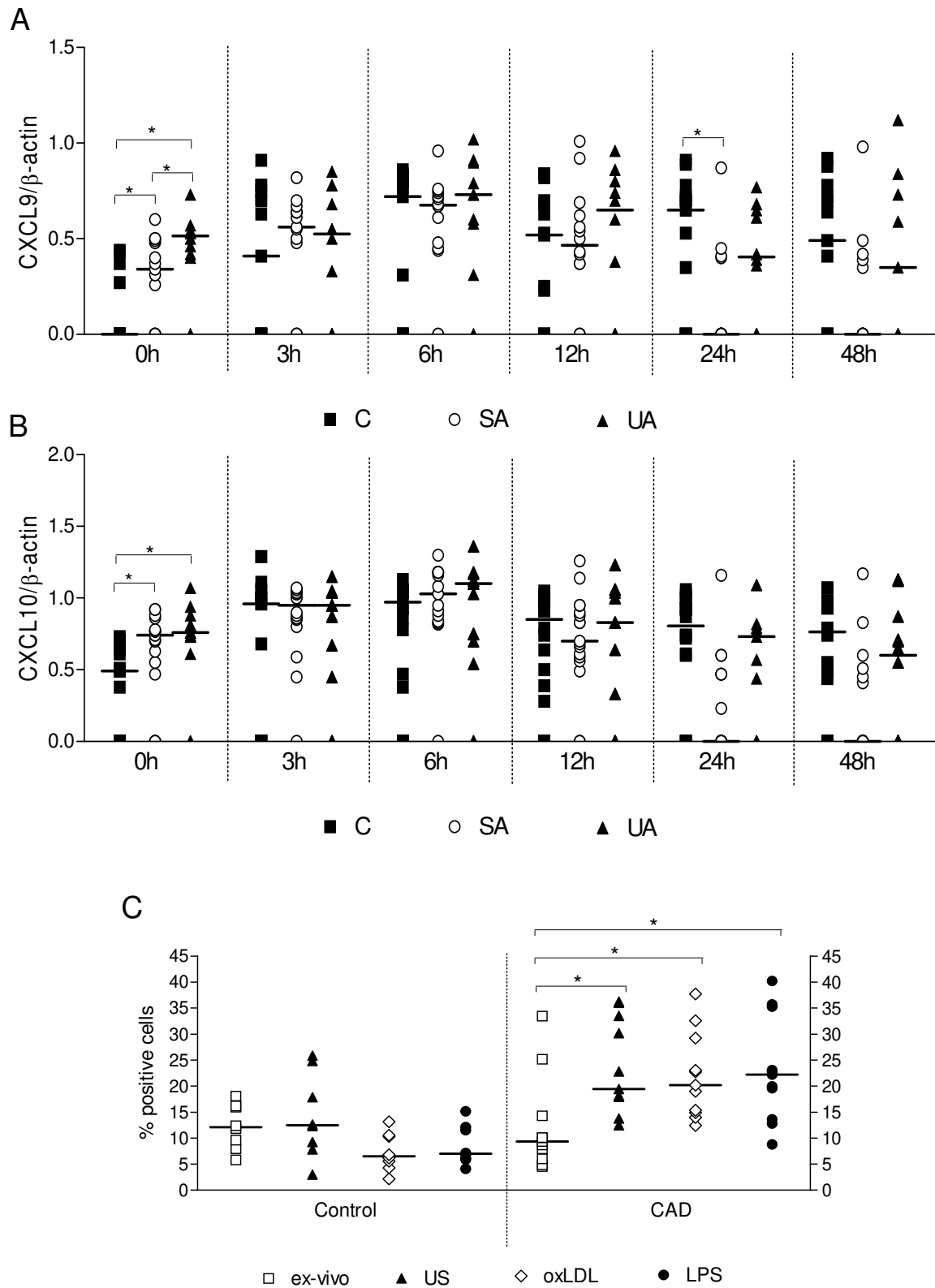
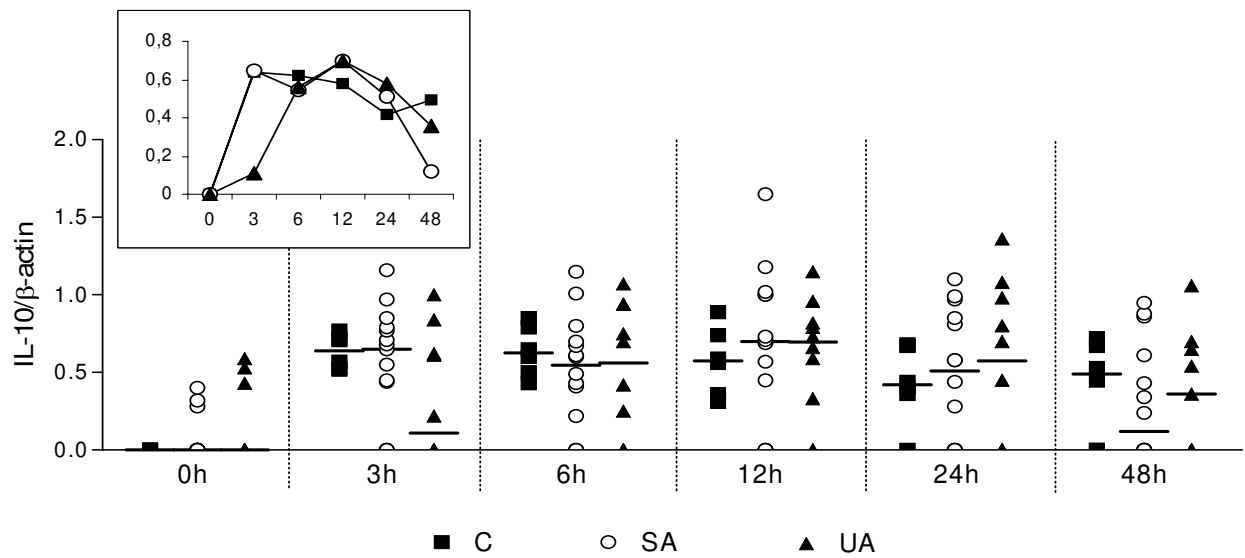


Figure 5



Legends to the figures

Figure 1 – (A) Semi-quantitative analysis of CCL2 mRNA expression (CCL2/ β -actin). Comparative kinetic mRNA expression in cells unstimulated (0) or stimulated with oxLDL (10 μ g/mL) for 3, 6, 12, 24 and 48 hours. C = Control, SA = Stable Angina, UA = Unstable Angina. Statistics – Kruskal Waalis with Dunn' post test. * $p < 0,05$. (B) Percentage of CCR2⁺ monocytes by PBMC from control or coronary artery disease (CAD) patients *ex-vivo* or cultured for 24 hours in the absence or presence of 10 μ g/mL of LPS or 50 μ g/mL of oxLDL. The cells were gated in monocyte region according to their SSC and FSC characteristics. Statistics: Wilcoxon test, * $p < 0,05$. Horizontal bars represent the median.

Figure 2 – Semi-quantitative analysis of CXCL8 mRNA expression (CXCL8/ β -actin). Comparative kinetic mRNA expression in cells unstimulated (0) or stimulated with oxLDL (10 μ g/mL) for 3, 6, 12, 24 and 48 hours. C = Control, SA = Stable Angina, UA = Unstable Angina. Statistics – Kruskal Waalis with Dunn' post test. * $p < 0,05$. Horizontal bars represent the median.

Figure 3 – Semi-quantitative analysis of IFN- γ mRNA expression (IFN- γ / β -actin). Comparative kinetic mRNA expression in cells unstimulated (0) or stimulated with oxLDL (10 μ g/mL) for 3, 6, 12, 24 and 48 hours. C = Control, SA = Stable Angina, UA = Unstable Angina. Statistics – Kruskal Waalis with Dunn' post test. * $p < 0,05$. Horizontal bars represent the median.

Figure 4 – (A) Semi-quantitative analysis of CXCL9 and CXCL10 mRNA expression (CXCL9, CXCL10/ β -actin). Comparative kinetic mRNA expression in cells unstimulated (0). C = Control, SA = Stable Angina, UA = Unstable Angina. Statistics – Kruskal Waalis with Dunn’post test. * $p < 0,05$. **(B)** Percentage of CXCR3⁺ monocytes by PBMC from control or coronary artery disease (CAD) patients *ex-vivo* or cultured for 24 hours in the absence or presence of 10 $\mu\text{g/mL}$ of LPS or 50 $\mu\text{g/mL}$ of oxLDL. The cells were gated in monocyte region according to their SSC and FSC characteristics. Data are expressed as median. Statistics: Wilcoxon test. Horizontal bars represent the median.

Figure 5 – Semi-quantitative analysis of IL-10 mRNA expression (IL-10/ β -actin). Comparative kinetic mRNA expression in cells unstimulated (0) or stimulated with oxLDL (10 $\mu\text{g/mL}$) for 3, 6, 12, 24 and 48 hours. C = Control, SA = Stable Angina, UA = Unstable Angina. Statistics – Kruskal Waalis with Dunn’post test. * $p < 0,05$. Horizontal bars represent the median. **Insert:** Line graph with the presenting median only, in which the differences in the mRNA expression kinetics is better visualized.