LUIZ FONSECA DOS SANTOS JUNIOR

**O papel do receptor toll-like 4 na aterogênese em
modelo experimental de aterosclerose**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências**

**Área de concentração: Emergências Clínicas
Orientador: Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza
Co-orientadora: Dra. Patrícia Miralda Cazita**

**São Paulo
2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santos Junior, Luiz Fonseca dos

O papel do receptor toll-like 4 na aterogênese em modelo experimental de
aterosclerose / Luiz Fonseca dos Santos Junior.-- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Emergências Clínicas.

Orientador: Heraldo Possolo de Souza.

Co-orientadora: Patrícia Miralda Cazita.

Descritores: 1.Receptor 4 toll-like 2.Aterosclerose 3.Inflamação 4.Imunidade
natural

USP/FM/SBD-249/08

*Aos meus pais, Luiz e Áurea, exemplos de
força e perseverança.*

*À minha irmã, Alexandra, pelo carinho e
apoio de sempre.*

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza, pelo apoio, amizade, confiança e paciência nas inúmeras etapas desse estudo e por me fazer vivenciar cada etapa do método científico.

À minha co-orientadora, Dra. Patrícia Miralda Cazita, pelo apoio, sugestões, discussões e incentivo durante este estudo. Muito obrigado!

À Dra. Maria Cláudia Irigoyen, por todo o auxílio na aferição da pressão arterial e frequência cardíaca dos animais desse estudo.

Ao Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo, pelas dicas e por permitir o uso de seu laboratório para os ensaios de produção de superóxido vascular.

À Dra. Ana Lochabel Soares Moretti pela acolhida, conversas, brincadeiras e inúmeras sugestões durante todo o período da pós graduação.

Ao Dr. Luiz Claudio Godoy, grande responsável pela maior parte do que sei hoje sobre biologia molecular e cultura celular.

À Denise Frediani Barbeiro, por todo o apoio na genotipagem dos animais e conhecimento transmitido em relação às reações de PCR.

À Dra. Maria Carolina Guido, que abriu meu caminho para a pós graduação e por todo o auxílio e amizade.

À Valéria Nunes, do laboratório de lípidos (LIM-10) por todo auxílio e atenção. Sua contribuição foi muito importante.

À mestra Sueli Ariga pela amizade, apoio, bom humor e auxílio com o analisador de imagens.

À Fátima Abatepaulo pelo carinho e auxílio com a parte histológica desse estudo.

À amiga, Márcia Cristiane Jurado, pelas conversas, discussões sobre metabolismo lipídico, bom humor e disposição em ajudar sempre.

À Daniella Ozer, amiga desde a graduação, pelas conversas, amizade e apoio nos últimos quatro anos.

À Themis Cardinot pela ajuda com a cirurgia dos animais e medida da pressão arterial.

À Márcia Koike pela ajuda com a cirurgia dos animais e com o analisador de imagens.

À Dra. Denise Fernandes, por todo o auxílio nos ensaios para avaliação da produção de superóxido vascular.

À Kelli, secretária do LIM-51, pela competência e auxílio sempre que necessário. Seu apoio foi fundamental.

Ao Geraldo pelas conversas e auxílio.

A Pedro Ferreira, veterinário do LIM-31, por todo o auxílio e ensinamentos acerca do cuidado com os animais na primeira etapa desse trabalho.

A todos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Laboratório de animais geneticamente modificados, pela atenção e manejo dos animais.

Ao amigo, Carlos R. Caldieri, por toda a ajuda em relação à informática, desde os programas estatísticos até formatação do trabalho.

À Wânia Costa de Almeida Basílio, vice diretora da E.E. Prof. Sílvio Xavier Antunes, por todo o apoio e por possibilitar que eu me dedicasse mais a pós graduação quando necessário.

À Rosely Ravazzi, amiga educadora física, e grande responsável por compatibilizar meu horário docente com a vida discente.

A todos os demais colegas do laboratório de investigação médica 51 (LIM-51) e da E.E. Prof. Sílvio Xavier Antunes pelas conversas, apoio e incentivo.

*À Secretaria de Estado da Educação do Estado de São Paulo, pelo
programa Bolsa Mestrado, do qual fui bolsista.*

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aterosclerose: Aspectos Gerais	1
1.2	Fisiopatologia da aterosclerose	4
1.2.1	Lipídios e aterosclerose	4
1.2.2	Sinalização redox e aterosclerose	7
1.2.3	Sistema imunológico e aterosclerose	10
1.3	Receptores Toll-like	13
1.3.1	Receptores Toll-like e aterosclerose	14
2	HIPÓTESE	17
3	OBJETIVOS	18
3.1	Objetivo Geral	18
3.2	Objetivos Específicos	18
3.2.1	Determinar se a ausência do receptor Toll-like 4 altera o desenvolvimento da placa de ateroma	18
3.2.2	Determinar se a ausência do receptor Toll-like 4 (TLR4) altera a composição das placas de ateroma e sua estabilidade	18
3.2.3	Determinar se a ausência do receptor Toll-like 4 (TLR4) influencia na concentração plasmática de lípidos e no perfil das lipoproteínas: VLDL, LDL e HDL	19
3.2.4	Determinar se a ausência do Receptor Toll-like 4 (TLR4) altera a sinalização redox na placa de ateroma	19
3.2.5	Determinar se a ausência do receptor Toll-like 4 (TLR4) altera o processo inflamatório na placa aterosclerótica	19
4	MÉTODOS	20
4.1	Matrizes Animais e Condições Experimentais	20

4.2	Genotipagem dos animais	21
4.2.1	Extração do DNA	22
4.2.2	Reação de PCR	23
4.3	Composição da dieta	24
4.4	Medida do consumo alimentar e peso corporal	25
4.5	Sacrifício dos animais e coleta das amostras	25
4.6	Análise do perfil lipídico e das lipoproteínas por Cromatografia Líquida (FPLC)	26
4.7	Concentração Sérica de anticorpos anti-LDL oxidada	27
4.8	Análise da secreção hepática de triglicérides (TG)	28
4.9	Análise da lesão aterosclerótica na raiz aórtica (método modificado de Paigen et al. ^{50, 51})	29
4.10	Composição da placa.....	31
4.10.1	Quantidade de colágeno na placa por coloração de picrossirius	31
4.10.2	Expressão de CD40L, iNOS, MMP9 e formação de nitrotirosina	32
4.11	Produção de ânion superóxido	34
4.12	Medida de pressão arterial e frequência cardíaca	35
4.13	Análise estatística	36
5	RESULTADOS.....	37
5.1	Peso e consumo de dieta.....	37
5.2	Pressão arterial e frequência cardíaca.....	38
5.3	Lesão Aterosclerótica.....	39
5.4	Estrutura da placa de ateroma.....	42
5.5	Perfil lipídico.....	44
5.5.1	Colesterol e triglicérides totais	44
5.5.2	Perfil de lipoproteínas – Colesterol e TG	47
5.5.3	Avaliação da produção de VLDL-TG	49
5.6	Sinalização Redox	50
5.6.1	Produção de superóxido vascular.....	51
5.6.2	Concentração sérica de anticorpos anti-LDL oxidada.....	52
5.6.3	Expressão de iNOS na parede vascular	53
5.6.4	Formação de nitrotirosina na parede vascular	55
5.7	Inflamação	57
5.7.1	Expressão de CD40L na placa	58

5.7.2	Expressão de MMP9 na placa	60
6	DISCUSSÃO	62
6.1	Considerações sobre o modelo experimental utilizado	62
6.2	Ausência de sinalização pelo TLR4 induz a formação de placas ateroscleróticas menores	64
6.3	Ausência de sinalização pelo TLR4 induz placas ateroscleróticas mais estáveis.....	65
6.4	Ausência do receptor TLR4 altera os lípidos circulantes	66
6.5	Sinalização Redox	68
6.6	Inflamação	71
6.7	Considerações finais.....	74
7	CONCLUSÕES	76
8	REFERÊNCIAS.....	77

Lista de Abreviaturas e Siglas

μL	microlitro
μm	micrometro
ABCA1	<i>ATP-binding cassette A1</i> -Transportador A1 cassete ligante de adenosina trifosfato
abs	absorbância
ACN	acetonitrila
Apo E -/-	Camundongo com ablação gênica para apolipoproteína E
apoB	Apolipoproteína B
apoB-100	apolipoproteína B-100
apoB-48	apolipoproteína B-48
BH4	tetrahidrobiopterina
bpm	batimentos por minuto
CETP	Proteína de transferência de colesterol esterificado
CpG	Seqüência linear de DNA em que o nucleotídeo Citosina aparece antes de um nucleotídeo Guanina. Ambos os nucleotídeos são unidos por um fosfato (p)
d.o.	densidade óptica
DHE	dihidroetídeo
DKO	<i>Double knockout</i> – duplo <i>knockout</i> , em nosso trabalho refere-se a camundongos com ablação gênica simultânea para o receptor toll-like 4 e receptor de LDL
DTPA	ácido dietileno triamino pentacético
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	NO sintase endotelial

FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i> – Cromatografia líquida rápida de proteína
GPx	Glutathione peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL	<i>High density lipoprotein</i> – Lipoproteína de alta densidade
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> – Cromatografia líquida de alta performance
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i> – Células endoteliais da veia umbilical de humanos
ICAM-1	molécula de adesão intercelular 1
IgG	imunoglobulina G
IL	interleucina
INF	interferon
iNOS	NO sintase indizível
KO	<i>knockout</i> – traduzido como “sem expressão”
LCAT	Lecitina colesterol acil-transferase
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> – Lipoproteína de baixa densidade
LDL -/-	Camundongo com ablação gênica para o receptor de LDL
LPS	Lipopolissacarídeo
M	molar
MCP-1	proteína quimioatrativa de monócito 1
mg/dL	miligrama por decilitro
mM	milimolar
mmHg	milímetros de mercúrio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NF-κB	fator de transcrição nuclear κB
ng	nanograma
nM	nanomolar
nNOS	NO sintase neuronal
NO	óxido nítrico
NOD	camundongos resistentes a aterosclerose
NOS	NO sintase
O ₂ ⁻	ânion superóxido
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PBS	tampão de fosfato salino
PCR	reação em cadeia da polimerase
pmol	picomol
QM	Quilomicron
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	rotações por minuto
sCD40L	CD40L solúvel
SDS	dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
SR-B1	<i>Scavenger receptor – B1</i> – Receptor <i>Scavenger</i> B1
TG	triglicérides
TIR	receptor toll-interleucina 1
TLR4	receptor toll-like 4
TLRs	receptores toll-like
TNF	fator de necrose tumoral

VCAM-1	molécula de adesão de célula vascular 1
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i> – Lipoproteína de densidade muito baixa

Lista de Tabelas

Tabela I – <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR para identificação das linhagens de camundongos knockout para o receptor de LDL e para o receptor Toll-like 4.....	21
Tabela II – Peso e Consumo de Dieta dos animais dos diferentes grupos antes e após dieta. Dados expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão.	37
Tabela III – Pressão Arterial e Frequência Cardíaca. Dados expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão.	38
Tabela IV – Níveis séricos de colesterol e triglicérides, em mg/dL, antes (basal) e após (Final) serem submetidos a dieta rica em gordura e colesterol por 12 semanas.....	45
Tabela V – Porcentagem de cada fração de lipoproteína de colesterol	48
Tabela VI – Porcentagem de cada fração de lipoproteína de triglicérides	49

Lista de Figuras

Figura 1 – Placas de ateroma na raiz da aorta.....	40
Figura 2 – Área da placa aterosclerótica na raiz da aorta	41
Figura 3 – Porcentagem média de gordura na placa da raiz da aorta.....	41
Figura 4 – Deposição de colágeno na placa aterosclerótica.	43
Figura 5 – Porcentagem média de camundongos na placa aterosclerótica. ...	43
Figura 6 – Concentração de colesterol plasmático.....	45
Figura 7 – Concentração de triglicéride plasmático.....	46
Figura 8 – Perfil de colesterol das lipoproteínas.....	47
Figura 9 – Perfil de triglicérides das lipoproteínas	48
Figura 10 – Taxa de secreção hepática de VLDL-TG.	50
Figura 11 – Produção de superóxido vascular.	51
Figura 12 – Detecção de autoanticorpos anti-LDL oxidada.....	52
Figura 13 – Expressão de iNOS na placa.	53
Figura 14 – Análise quantitativa da expressão de iNOS na placa.	54
Figura 15 – Marcação imunohistoquímica para nitrotirosina.	56
Figura 16 – Análise quantitativa da coloração para nitrotirosina.	57
Figura 17 – Expressão de CD40L na placa.....	58
Figura 18 – Quantificação da expressão de CD40L na placa de ateroma.	59
Figura 19 – Expressão de MMP9 na placa de ateroma.....	60
Figura 20 – Quantificação da expressão de MMP9 na placa de ateroma.	61

Resumo

Santos Junior, LF. *O papel do receptor toll-like 4 na aterogênese em modelo experimental de aterosclerose* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Um papel importante foi atribuído ao receptor toll-like 4 (TLR4) no desenvolvimento da placa aterosclerótica. O TLR4 foi primeiramente descrito como um receptor para bactérias gram-negativas; posteriormente foi demonstrado que sua expressão está aumentada em placas ateroscleróticas e que pacientes que possuem um polimorfismo disfuncional do TLR4 são menos suscetíveis ao desenvolvimento dessa doença. Portanto, o objetivo desse estudo foi o de investigar, em um modelo experimental de aterosclerose, a influência da deleção do TLR4 na formação e morfologia da placa aterosclerótica, no perfil lipídico e em marcadores inflamatórios. Camundongos duplo *knockout* (DKO), deficientes no receptor de LDL e TLR4, foram gerados cruzando-se camundongos deficientes para o receptor de LDL (LDLrKO) com camundongos deficientes para o TLR4 (TLR4KO). Todos os grupos receberam dieta rica em gordura e colesterol por 12 semanas. As concentrações plasmáticas de colesterol e triglicérides foram medidas por ensaio colorimétrico. Cortes seriados da raiz aórtica foram corados com *Oil red O* e as áreas de lesão quantificadas por analisador de imagens. O colágeno foi medido por coloração de picrossirius. A formação de nitrotirosina e expressão de CD40L, MMP9 e iNOS nas placas foram feitas por imunohistoquímica. As comparações foram feitas por ANOVA com pós teste de Student Newman-Keuls. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. Camundongos DKO desenvolveram placas menores que camundongos LDLrKO (117.6 ± 1.4 vs $198.8 \pm 3.3 \times 10^4 \mu\text{m}^2$). Camundongos TLR4KO não formaram placa. As placas dos camundongos DKO apresentaram menor núcleo lipídico que as dos LDLrKO (76.2 ± 13.2 vs $161.7 \pm 2.9 \times 10^4 \mu\text{m}^2$). O colágeno ao redor do núcleo lipídico é maior nos camundongos DKO do que nos LDLrKO (24.9 ± 1.8 vs 16.5 ± 2.5 % da placa). A distribuição do colágeno nos camundongos DKO ocorre principalmente ao redor da placa, de forma mais organizada, enquanto que nos LDLrKO onde sua distribuição é mais difusa. As placas dos camundongos DKO apresentaram menor expressão de CD40L e iNOS do que as dos LDLrKO (13.1 ± 0.7 vs 18.5 ± 2.5 AU e 7.7 ± 0.9 vs 10.2 ± 0.4 AU, respectivamente). A expressão de MMP9 foi menor nas placas dos camundongos DKO do que as dos LDLrKO (2.99 ± 0.3 vs 1.99 ± 0.2 AU). A marcação para nitrotirosina foi maior nos camundongos LDLrKO quando comparada com as dos grupos DKO e TLR4KO (142.89 ± 208.5 , 77.16 ± 227.7 e $71.73 \pm 95.9 \times 10 \mu\text{m}^2$, respectivamente). Todos esses resultados sugerem que o processo inflamatório é menor na ausência do TLR4. As concentrações plasmáticas de colesterol não foram diferentes entre os grupos LDLrKO e DKO mas os camundongos LDLrKO apresentaram concentrações plasmáticas de triglicérides maiores do que os camundongos DKO após a dieta (265.2 ± 27.6 vs 150.5 ± 8.8 mg/dL). O receptor toll-like 4 influencia na estrutura e formação da placa aterosclerótica independentemente dos níveis séricos de colesterol.

Descritores: 1.Receptor 4 toll-like 2.Aterosclerose 3.Inflamação 4.Imunidade natural

Summary

Santos Junior LF. *Role of toll-like receptor 4 in atherogenesis in an experimental model of atherosclerosis* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008.

A crucial role has been suggested for toll-like receptor 4 (TLR4) in atherosclerotic plaque formation and development. TLR4 was described primarily, as a receptor for gram-negative bacteria lipopolisaccharide; later it was showed that its expression is increased in atherosclerotic plaques and patients that carries a TLR4 dysfunctional polymorphism are less susceptible to development of this disease.

Therefore, the aim of this study was to investigate, in an experimental model of atherosclerosis, the influence of TLR4 deletion in atherosclerotic plaque formation and morphology, cholesterol profile and inflammatory markers.

Double knockout mice (DKO), deficient in LDL receptor and TLR4, were generated by breeding LDL receptor knockout mice (LDLrKO) with TLR4 knockout mice (TLR4KO). All three experimental groups, LDLrKO, TLR4KO and DKO were fed a high fat-cholesterol diet for 12 weeks. Plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations were measured by colorimetric assay. Cross sections of aortic sinus were stained with Oil red O and lesion areas were quantified by an image analyzer. Collagen content was measured by picrossirius staining. We also measured nitrotyrosine formation, CD40L, MMP9 and iNOS expression by immunohistochemistry. Comparisons were made by ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post- test. Data are mean $\pm$ SEM.

DKO mice developed smaller plaques than LDLrKO mice (117.6 ± 1.4 vs $198.8 \pm 3.3 \times 10^4 \mu\text{m}^2$). TLR4KO mice developed no plaque. Plaques from DKO mice have also a smaller lipid core than the ones from LDLrKO mice (76.2 ± 13.2 vs $161.7 \pm 2.9 \times 10^4 \mu\text{m}^2$). Collagen content around the lipid core is higher in DKO mice compared to LDLrKO mice (24.9 ± 1.8 vs 16.5 ± 2.5 % of the whole plaque). Interestingly, collagen distribution in DKO mice seems to occur mainly on the plaque periphery, in a more organized manner, while in LDLrKO mice it is fuzzier, being present also inside the plaque. Plaques from DKO present lower expression of CD40L and iNOS than LDLrKO mice (13.1 ± 0.7 vs 18.5 ± 2.5 AU and 7.7 ± 0.9 vs 10.2 ± 0.4 AU, respectively). MMP9 expression is lower in DKO mice as compared to LDLrKO mice (2.99 ± 0.3 vs 1.99 ± 0.2 AU). Nitrotyrosine staining was higher in LDLrKO mice as compared to DKO and TLR4KO groups (142.89 ± 208.5 , 77.16 ± 227.7 and $71.73 \pm 95.9 \times 10^4 \mu\text{m}^2$, respectively). All together, these findings suggest that inflammatory process is milder in the absence of TLR4. Serum cholesterol were not different between LDLrKO and DKO mice but LDLrKO presented higher triacylglycerol serum levels after 12 weeks on high fat high cholesterol diet as compared to DKO mice (265.2 ± 27.6 vs 150.5 ± 8.8).

Toll like receptor 4 influences atherosclerotic plaque formation and structure independently from serum cholesterol levels.

Descriptors: 1. Toll-like receptor 4 2. Atherosclerosis 3. Inflammation
4. Natural immunity

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aterosclerose: Aspectos Gerais

A aterosclerose é uma doença caracterizada pela formação de placas na parede de médias e grandes artérias. Essas placas ateroscleróticas, ou ateromas, são formadas por um núcleo rico em gordura e *debris* celulares, com graus variáveis de deposição de cálcio, envoltos por uma capa fibrosa composta de células musculares lisas vasculares e colágeno, recoberta por uma camada de células endoteliais¹.

A formação das placas de ateroma tem uma característica progressiva. A hipótese corrente para a patogênese dessa doença enfatiza a disfunção endotelial como o primeiro passo na formação da placa de ateroma. Na disfunção endotelial ocorre, inicialmente, um desequilíbrio na sinalização redox, com conseqüente diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico. Esse fenômeno causa diminuição do relaxamento vascular endotélio-dependente e expressão aumentada de moléculas de adesão pelas células endoteliais, gerando acúmulo de macrófagos e linfócitos no espaço subendotelial².

Sabe-se que as causas da disfunção endotelial são bastante complexas, estando associada a uma predisposição genética e à exposição a diversos fatores de risco ambientais, como tabagismo, elevação do LDL-colesterol, estresse e sedentarismo. Além disso, existe também associação com outras doenças multifatoriais, como a hipertensão e o diabetes. Estudos clínicos, experimentais e epidemiológicos sugerem que, mais comumente, o

que encontramos nos pacientes com doença aterosclerótica é a combinação de múltiplos fatores².

A partir da disfunção endotelial, mantidos os fatores de risco, a aterosclerose pode progredir. A lesão histológica mais precocemente detectável é a “estria gordurosa”, caracterizada como um agregado de macrófagos repletos de gordura dentro da camada intimal, as chamadas “células espumosas”. Essas estrias gordurosas precedem o desenvolvimento de lesões mais complexas, as placas ateromatosas, compostas por um centro de material necrótico, lípidos e, ocasionalmente, cálcio, envolto por uma capa fibrosa, contendo células musculares lisas vasculares e colágeno, recobertos por uma camada de células endoteliais³.

Com o crescimento da placa, há inicialmente um remodelamento da parede arterial, aumentando o volume externo e reduzindo o estreitamento luminal⁴. Até esse estágio, a lesão vascular é clinicamente assintomática⁵. A partir daí, pode se tornar sintomática caso o processo de remodelamento seja suplantado pelo crescimento intraluminal da placa de modo suficiente para obstruir o fluxo sanguíneo arterial e suprimento de oxigênio e nutrientes ao tecido irrigado naquele território vascular. Do ponto de vista clínico, pacientes com angina estável apresentam este tipo de quadro morfológico.

Por mecanismos ainda não completamente esclarecidos, a placa aterosclerótica pode se romper, isto é, pode ser criada uma solução de continuidade na camada endotelial e fibrosa que envolve o núcleo da placa e são expostas moléculas da parede celular que podem desencadear coagulação intravascular local. Essa trombose local interrompe o fluxo sanguíneo arterial, ocasionando isquemia tecidual a montante³. A ruptura da

placa é o fenômeno fisiopatológico responsável pelo desencadeamento daquilo que é chamado clinicamente de síndromes coronarianas agudas, a angina instável e o infarto agudo do miocárdio.

É necessário expor, nesse momento, o conceito de placas estáveis e instáveis, que tem grande impacto sobre o entendimento da aterosclerose e nosso estudo, em particular.

Placas instáveis são aquelas que apresentam uma maior probabilidade de ruptura. Do ponto de vista histológico, apresentam uma maior concentração de células inflamatórias, núcleo lipídico extenso e capa fibrosa tênue, devido a uma atividade aumentada de metaloproteinases. As placas estáveis, por outro lado, têm um menor potencial de desencadear síndromes isquêmicas. Apresentam uma capa fibrosa espessa, composta de células musculares lisas e colágeno, poucas células inflamatórias e núcleo lipídico menos proeminente. Do ponto de vista clínico e terapêutico essa diferenciação é importante, pois são as placas instáveis que devem ser manipuladas, de tal maneira que sua ruptura possa ser prevenida, evitando-se assim o desencadeamento das síndromes isquêmicas.

Os fenômenos que levam à ruptura da placa aterosclerótica ainda não estão completamente esclarecidos. Detectar fatores que predispõem a placa de ateroma à ruptura e maneiras de preveni-la é o grande desafio da cardiologia nos dias de hoje. Evidências bastante contundentes mostram que diversos marcadores biológicos relacionados a esses processos inflamatórios da aterosclerose podem também contribuir com informações de valor preditivo e prognóstico de grande relevância clínica^{1, 2, 6, 7, 8}.

Pelo exposto até o momento, fica clara a complexidade da aterogênese e as múltiplas vias de sinalização envolvidas. Entretanto, parece evidente que dois mecanismos são cruciais na gênese e evolução da doença aterosclerótica: o metabolismo lipídico e as vias de sinalização que controlam o processo inflamatório.

Todo esse processo evolutivo apresentado pela lesão aterosclerótica na parede arterial pode ser entendido como uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas que, em conjunto, podem ser melhor descritas como um processo inflamatório crônico⁹. Esse processo inflamatório é ainda mais evidente no desencadeamento dos eventos coronarianos agudos.

1.2 Fisiopatologia da aterosclerose

No processo de progressão da aterosclerose, desde a disfunção endotelial até a ruptura da placa e desencadeamento das síndromes coronarianas agudas alguns fatores são recorrentes: alterações no metabolismo lipídico, distúrbios na sinalização redox e a ativa participação das células do sistema imune, com ativação de múltiplas vias de sinalização envolvidas na resposta inflamatória.

1.2.1 Lipídios e aterosclerose

O metabolismo lipídico tem um papel crucial no desenvolvimento da lesão aterosclerótica. A lipoproteína de baixa densidade (LDL) é fundamental para a formação das células espumosas no início da lesão¹⁰ enquanto que

as lipoproteínas de alta densidade (HDL) têm um papel protetor, inibindo a aterogênese⁶. Modificações oxidativas nos lípidos parecem ser os primeiros estímulos inflamatórios para o recrutamento de macrófagos para a parede vascular. Assim, é necessário discutirmos o metabolismo lipídico e suas interações com a resposta inflamatória presente na aterosclerose.

Os lipídios da dieta são absorvidos pelo intestino na forma de quilomícrons pelos enterócitos e transportados aos tecidos periféricos pelo sangue¹¹. Os quilomícrons são hidrolisados pela lipoproteína lipase gerando quilomicron remanescente que é absorvido pelo fígado que carrega os lipídios na apolipoproteína B secretando VLDL que, sofre lipólise, originando LDL¹².

As LDL são partículas de pequeno diâmetro, constituídas por uma molécula de apoB-100 e que transportam a maior parte do colesterol plasmático. Devido ao pequeno tamanho, as LDL além de atravessarem facilmente a barreira endotelial e alcançarem a parede vascular, são mais suscetíveis a modificações químicas de seus componentes, tais como oxidação. Essas LDL modificadas são reconhecidas e fagocitadas pelos macrófagos, formando as células espumosas e dando início a formação da placa de ateroma¹³.

A HDL, por sua vez, é formada pelo intestino e pelo fígado pela secreção de apolipoproteína A-I que recruta colesterol do fígado e intestino através dos receptores ABCA1, formando as HDLs nascentes. O colesterol livre presente nessa HDL nascente é esterificado pela enzima lecitina colesterol acil-transferase (LCAT), transformando a HDL nascente em HDL madura e mais rica em colesterol esterificado para posterior transporte ao

fígado. O colesterol presente na HDL pode retornar ao fígado de forma direta, através da captação hepática pelo receptor SR-BI ou de forma indireta, pela transferência, mediada pela proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP), para lipoproteínas plasmáticas contendo apoB (QM, VLDL e LDL) e a posterior captação destas pelo fígado¹³.

Desde a década de 1970 já havia evidências da relação entre concentração sérica elevada de LDL - colesterol e doenças cardiovasculares. O grupo de Steinberg¹⁴ foi o primeiro desenvolver estudos em pacientes com hipercolesterolemia familiar. Esses pacientes apresentam elevação de LDL-colesterol, desenvolvem aterosclerose prematuramente, sugerindo uma forte associação entre os lipídeos e a formação do ateroma. Além disso, estudos realizados com imigrantes japoneses, nos Estados Unidos, revelaram que alterações nos níveis séricos de LDL – colesterol estão mais relacionadas com fatores ambientais como o hábito alimentar comparado a fatores genéticos. Outros estudos mostraram que populações que tinham dieta rica em gordura saturada apresentavam elevação do colesterol no sangue e uma maior incidência de doenças cardiovasculares do que populações que tinham uma ingestão baixa de gordura saturada^{14, 15}.

Em conjunto, estudos clínicos, epidemiológicos e experimentais relatam uma forte associação entre a aterosclerose e alterações no metabolismo lipídico, chegando a sugerir que os lipídeos são imprescindíveis para o desenvolvimento da doença. Muitas dúvidas ainda permanecem, principalmente sobre a interação entre os lipídeos circulantes e as vias de sinalização do sistema imune, ativadas na doença aterosclerótica.

1.2.2 Sinalização redox e aterosclerose

A presença de radicais livres é comum em todos os sistemas biológicos e sua formação ocorre devido a reações de oxidação-redução nas quais os elementos moleculares cedem elétrons, oxidando-se, ou recebem outros, reduzindo-se¹⁶. Nos sistemas biológicos, os radicais mais comuns são aqueles derivados do oxigênio e nitrogênio. Esses radicais podem gerar outras espécies, não radicalares, mas também altamente capazes de participar de reações de oxidação e redução. Assim, os radicais derivados do oxigênio (superóxido e hidroxila) em conjunto com espécies não radicalares (peróxido de hidrogênio e outros peróxido) são chamados coletivamente de espécies reativas de oxigênio (ROS). Raciocínio semelhante é aplicado às espécies reativas de nitrogênio (RNS), que encampam radicais (óxido nítrico) e não radicais (peroxinitrito).

Até a década de 80, as espécies reativas eram consideradas agentes lesivos às células, efetoras de lesão tecidual. A partir da descrição do óxido nítrico como um radical capaz de exercer funções de sinalização em múltiplos sistemas, a atenção ao papel de sinalizador das espécies reativas passou a predominar.

Hoje sabemos que as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio exercem papel de sinalizadoras em praticamente todos os sistemas celulares, de maneira paralela e semelhante à fosforilação protéica, sendo imprescindíveis para a homeostase tecidual.

Distúrbios da sinalização redox são descritos em múltiplas doenças, como as doenças neurodegenerativas e doenças inflamatórias. Na

aterosclerose foram identificados múltiplos processos onde ocorrem distúrbios da sinalização redox. Strokes *et al.*¹⁷ relatam que, em resposta à hipercolesterolemia, ocorre uma grande produção de ROS, capazes de desencadear efeitos proinflamatórios importantes para a fisiopatologia da doença como o aumento da expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, aumento da produção de substâncias que ativam leucócitos como o fator ativador de plaquetas, leucotrieno B₄ e complemento 5a e promoção da diapedese dos leucócitos para o espaço subendotelial¹⁸. As principais fontes dessas espécies reativas de oxigênio incluem as oxidases mitocondriais, as xantina oxidases, lipoxigenases e NAD(P)H oxidases dependentes¹⁸ sendo as NAD(P)H oxidases as principais fontes de geração de superóxido vascular¹⁹.

Fundamental para o início e desenvolvimento da aterosclerose parecem ser modificações nas lipoproteínas, incluindo oxidação por espécies reativas de oxigênio geradas na parede vascular. Os lípidos oxidados têm um efeito pró-inflamatório importante, estimulando a migração de macrófagos para o espaço subintimal e a expressão de moléculas de adesão, além de outros efeitos diretos. A LDL oxidada pode também reagir com o óxido nítrico, diminuindo sua disponibilidade na parede vascular.

O óxido nítrico (NO^{*}) tem um papel importante para a biologia vascular e fisiopatologia da aterosclerose²⁰. A produção do NO^{*} resulta da oxidação da L-arginina em L-citrulina pela enzima NO^{*} sintase, NOS²¹. A NOS existe em três isoformas: NOS neuronal (nNOS), NOS induzida (iNOS) e NOS endotelial (eNOS). A iNOS é produzida por macrófagos após a estimulação por citocinas, lipopolissacarídeo (LPS) e outros agentes

imunológicos¹⁸. A nNOS está presente nos neurônios e a eNOS nas células endoteliais vasculares^{18,22}. A eNOS pode atuar como fonte de íon superóxido em condições patofisiológicas²³. Em condições normais essa enzima transfere elétrons do grupo heme no domínio oxigenase para o substrato L-arginina, para formar L-citrulina e NO[•]. A tetrahidrobiopterina (BH4) atua como cofator nesse processo e se a disponibilidade da BH4 ou da L-arginina diminui, a eNOS deixa o seu estado acoplado, no qual gera NO[•], e passa para o estado desacoplado, no qual os elétrons do grupo heme reduzem o oxigênio, produzindo íon superóxido^{23,24}.

O NO[•] produzido pelo endotélio controla o tônus vascular, inibe a agregação plaquetária e regula a contração cardíaca²⁵, além de efeitos antiaterogênicos como inibição da adesão de leucócitos e monócitos, redução da permeabilidade endotelial e inibição da proliferação migração de células musculares lisas²⁶. Presentes, mesmo em concentrações baixas, o íon superóxido e o NO[•] reagem rapidamente, dependendo somente da difusão; se essa reação ocorre na parede vascular, reduz a biodisponibilidade do NO[•] e forma o ânion peroxinitrito²⁴, um potente oxidante que reage com resíduos de tirosina, inativando diversas vias de sinalização necessárias para a manutenção da homeostase vascular. Como consequência, deixam de existir os efeitos protetores do NO[•] e passam a ocorrer fenômenos que participam da aterogênese.

Em resumo, podemos dizer que a função endotelial normal depende grandemente do balanço homeostático entre NO e ROS na parede vascular. Distúrbios nesse equilíbrio podem ocasionar distúrbios da sinalização pelo NO e conseqüente disfunção endotelial e ativação de mecanismos pró-

inflamatórios na parede vascular, eventos cruciais na fisiopatologia da aterosclerose.

1.2.3 Sistema imunológico e aterosclerose

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica na qual a participação do sistema imunológico é crucial para o início da disfunção endotelial, formação da estria gordurosa, progressão da lesão mais avançada e ruptura da placa²⁷. Um dos primeiros eventos na formação da lesão é a migração dos leucócitos para o espaço subendotelial promovida pela expressão de moléculas de adesão como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), a proteína quimioatrativa de monócito 1 (MCP-1) e molécula de adesão de célula vascular 1 (VCAM-1) pelas células endoteliais¹.

Além das células do sistema imune, múltiplas vias de sinalização responsáveis pela coordenação da resposta imune e sua relação com outros tecidos parecem estar ativadas na aterosclerose. Uma das principais parece ser a via de sinalização composta pelo receptor de membrana CD40 e seu ligante, CD40L. Essa via de sinalização é importante na adequação da resposta imune, sendo imprescindível para a ativação de células T, proliferação e ativação de células B, além da formação da memória imunológica.

A participação do CD40/CD40L na aterosclerose foi descrito no final da década de 90. Mach *et al.*²⁸ mostraram que as células endoteliais ativadas, células musculares lisas e macrófagos expressavam o mediador imunológico CD40 e o seu ligante CD40L. Outros trabalhos^{27, 29} relataram

que a ativação desse sistema leva a expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais e monócitos além de, *in vitro*, estimular células HUVEC a expressar MCP-1 e IL-8 que sabidamente estão envolvidas na formação e progressão da lesão aterosclerótica. Kiener *et al.*³⁰ afirmaram que a ativação de CD40 em monócitos também estimulava a produção de outras citocinas próinflamatórias como IL1- β , TNF- α e IL-6, mostrando o potencial próinflamatório dessa via de sinalização.

Mais contundentes foram os achados posteriores, mostrando que em modelos experimentais de aterosclerose o bloqueio da via de sinalização CD40/CD40L leva a uma diminuição significativa da formação de placas ateroscleróticas e pacientes com síndromes coronarianas agudas apresentam aumento do CD40L circulante, que é, inclusive, um fator independente de risco para novos eventos cardiovasculares.

Para que ocorra interação entre as células do sistema imunológico é necessária a presença do CD40 na superfície das células apresentadoras de antígenos e a do seu ligante, CD40L, em sua forma solúvel ou na superfície dos linfócitos T, plaquetas ou células da parede vascular³¹. Durante o processo de aterogênese, após fagocitar a LDL, os macrófagos apresentam o antígeno para as células T, desencadeando a resposta imunológica adaptativa³¹. A resposta imunológica das células Th1 é a produção de mediadores próinflamatórios como INF- γ , TNF- α , IL-1, IL-12 e IL-18 que reconhecidamente aceleram a aterosclerose^{31,32}. A resposta Th2 leva a produção dos mediadores IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 que inibem o desenvolvimento da aterosclerose³¹. Essa resposta Th2 leva a maturação de

uma linhagem alternativa de macrófagos que são responsáveis por reparar o tecido, produzindo colágeno e fibrose³².

Paralelamente a esses fenômenos ligados à imunidade celular, uma série de mediadores solúveis, as citocinas, são secretados durante a formação da placa e contribuem para sua evolução.

A IL1- β parece ter um papel importante no início e progressão da lesão aterosclerótica. Kirii *et al.*³³ realizaram um estudo utilizando camundongos duplo *knockout* para ApoE^{-/-} e IL1- β ^{-/-}. Os resultados desses autores demonstram uma diminuição de cerca de 30% no tamanho da placa no grupo dos camundongos incapazes de produzir IL1- β além da diminuição da expressão de VCAM-1, ICAM-1 e MCP-1 quando comparado com o grupo controle.

O TNF α é um potente estimulador de diversas metaloproteinases de matriz³⁴ e foi verificado que sua participação é importante para a progressão da lesão aterosclerótica. Branen *et al.*³⁵ demonstraram que camundongos *knockout* para TNF α desenvolvem uma lesão aterosclerótica 50% menor quando comparado ao grupo controle.

Em relação à influência da IL-6 na aterogênese os dados da literatura parecem ser contraditórios. Huber *et al.*³⁶ realizaram um estudo com camundongos ApoE, C57B1/6 e NOD (resistentes a aterosclerose) no qual cada uma dessas linhagens era subdividida em 2 grupos. Um dos grupos recebia injeções semanais de IL-6 e o outro não. Os resultados obtidos por esses pesquisadores demonstraram que as lesões ateroscleróticas eram maiores nos grupos que receberam IL-6 do que nos grupos que não receberam IL-6. Entretanto, outro estudo realizado por Song *et al.*³⁷

demonstraram que a IL-6 parece não ter influência na aterogênese. Esse grupo de pesquisadores criou uma linhagem duplo *knockout* tanto para o receptor de LDL quando para a IL-6 e após administrar dieta para esses animais, o tamanho da placa aterosclerótica não era estatisticamente diferente no grupo duplo *knockout* quando comparado com o grupo LDL *knockout*.

Todos esses trabalhos mostram as contribuições dessas citocinas para o processo aterosclerótico evidenciando a intensa participação do sistema imunológico na progressão dessa doença.

Assim, podemos concluir que existe uma interação importante entre o metabolismo lipídico, a sinalização redox e a resposta inflamatória no desenvolvimento da aterosclerose. O sistema imune participa em todas as fases do processo, através da ativação de múltiplos tipos celulares e vias de sinalização.

Achados recentes sugerem que até mesmo vias de sinalização responsáveis pela imunidade inata, isto é, a resposta mais primitiva, que não gera memória imunológica, pode participar do processo de aterogênese.

1.3 Receptores Toll-like

Os receptores Toll-like são os principais receptores de reconhecimento de padrão envolvidos na imunidade inata. São encontrados, principalmente, nas células do sistema imunológico e são capazes de reconhecer alguns poucos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Esses PAMPs são expostos, na maioria das vezes, na superfície

de microorganismos como vírus, bactérias, fungos e parasitas; são altamente conservados entre as espécies, permitindo assim que a evolução tenha selecionado receptores capazes de reconhecê-los. São exemplos de PAMPs: Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), presentes em todas as bactérias gram-negativas, peptidoglicanos presentes em todas as bactérias gram-positivas, seqüências CpG repetitivas no DNA e RNA de dupla fita, identificados em vírus^{38,39}.

A pouca variedade entre os PAMPs permite que um pequeno número de receptores Toll-like (em humanos há um total de dez isoformas, trabalhando isoladamente ou em conjunto)⁴⁰ reconheçam todos os patógenos que possam causar dano ao organismo.

Todos os TLRs possuem um domínio TIR (receptor toll-interleucina-1) conservado na região citosólica que é responsável pela ativação de vias de sinalização comuns como aquelas que levam a ativação de vias de sinalização como a do fator de transcrição nuclear κ -B (NF- κ B) e proteínas quinases ativadas por estresse^{38,41}.

1.3.1 Receptores Toll-like e aterosclerose

Kiechl *et al.*³⁹ demonstraram que a presença do polimorfismo Asp299Gly para o receptor Toll-like 4 (TLR4), que afeta a composição da porção extracelular do receptor, prediz um menor nível de citocinas inflamatórias circulantes e uma maior suscetibilidade à infecções, mas um risco reduzido de aterosclerose. Tais dados sugerem que um mecanismo imune inato eficaz é necessário para o desenvolvimento de aterosclerose.

Estudos de imunohistoquímica e biologia molecular demonstraram que em lesões ateroscleróticas humanas há a presença de um repertório grande de TLRs e aumento na tradução de seus genes. Em particular, TLR1, TLR2 e TLR4 apresentavam níveis de RNAm maiores que três vezes o controle⁴². A imunohistoquímica demonstrou elevados graus de intensidade para TLR1, TLR2 e TLR4 em placas ateroscleróticas, especialmente no endotélio e em áreas com células inflamatórias.

Outro estudo demonstrou a presença de TLR4 em placas ateroscleróticas humanas com núcleo lipídico rico, mas não em placas fibrosas⁴³. Uma marcação importante, demonstrando uma forte expressão de TLR4, foi encontrada ao redor do núcleo lipídico e nas extremidades das placas ricas em lípidos. Uma marcação dupla para macrófagos e para TLR4 demonstrou uma localização espacial muito próxima entre elas. Não se observou marcação para macrófagos ou TLR4 nas placas fibrosas. Esses mesmos autores demonstraram que macrófagos em cultura apresentam aumento dos níveis de RNAm para TLR4 quando expostos a oxi-LDL, mas não a LDL normal⁴³.

Outros dados demonstraram a expressão de TLR4 em macrófagos e fibroblastos de adventícia humana, sendo que a ativação desses receptores em fibroblastos humanos induz à produção de citocinas pró-inflamatórias. A ativação dos TLR4 na adventícia por LPS induz a um aumento na formação de neoíntima⁴⁴.

Mais recentemente, Michelsen *et al.*⁴⁵, demonstraram que a deficiência genética de TLR4 em camundongos deficientes em ApoE, está associada a uma redução significativa da placa aórtica em regiões

propensas a aterosclerose mesmo quando submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica. Também demonstram que camundongos deficientes em ApoE que não expressavam o TLR4 ou o adaptador molecular MyD88 (fator de diferenciação mielóide 88) desenvolveram uma aterosclerose aórtica reduzida associada a diminuição de citocinas próinflamatórias como a IL-12 e a proteína quimioatrativa de monócito 1 (MCP-1). Esses camundongos também apresentaram diminuição do número de macrófagos da placa e do conteúdo lipídico.

Em conjunto, esses dados sugerem que a ativação dos receptores TLR exerce um papel importante na formação e evolução da placa aterosclerótica. Esse fato é intrigante, pois, por definição, a resposta imune inata tem por principal função o reconhecimento e a resposta inicial a uma agressão externa e, na aterosclerose, esse sistema imune inato parece estar permanentemente ativado.

2 HIPÓTESE

Até o momento demonstramos que a aterosclerose é uma doença na qual o processo inflamatório crônico desempenha um papel fundamental em todos os estágios de evolução. Múltiplos tipos celulares e vias de sinalização do sistema imune parecem estar envolvidos nessa resposta inflamatória. Outros mecanismos importantes envolvidos são as alterações no metabolismo lipídico e os distúrbios na sinalização redox.

Estudos recentes sugerem que os TLR4, receptores de reconhecimento de padrões, membros da imunidade inata, têm expressão aumentada na placa aterosclerótica e que a ausência desse receptor torna o hospedeiro menos suscetível ao desenvolvimento da doença.

Não estão claros, entretanto, quais os mecanismos dependentes da ativação dos TLR4 podem ser os responsáveis pelo desenvolvimento das placas ateroscleróticas. Também não estão completamente esclarecidas as interações entre a via de sinalização TLR4, o metabolismo de lípidos e a sinalização redox.

Em nosso laboratório geramos um camundongo deficiente em receptor de LDL e em TLR4. Alimentado com dieta rica em gordura e colesterol esse animal desenvolve placas ateroscleróticas em artérias, como a aorta. Comparando-se as placas ateroscleróticas desses animais com aquelas dos animais deficientes somente em receptor LDL nos possibilitou obter importantes informações sobre as interações entre imunidade e lípidos na aterosclerose.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar o papel do receptor Toll-like 4 (TLR4) na formação e desenvolvimento da placa aterosclerótica em camundongos deficientes para o receptor de LDL.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Determinar se a ausência do receptor Toll-like 4 altera o desenvolvimento da placa de ateroma

Estratégia: Foram comparadas placas formadas na raiz da aorta em camundongos deficientes em receptor de LDL isoladamente (LDLrKO) com as placas formadas em animais deficientes em receptor de LDL e TLR4 (Duplo KO ou DKO).

3.2.2 Determinar se a ausência do receptor Toll-like 4 (TLR4) altera a composição das placas de ateroma e sua estabilidade

Estratégia: Para se avaliar a instabilidade da placa de ateroma, foi observado por imunohistoquímica e histoquímica, o tamanho do núcleo de gordura e a quantidade de colágeno presente na placa de ateroma de camundongos LDLr^{-/-}, TLR4^{-/-}; duplo *Knockout* (LDLr^{-/-}/TLR4^{-/-}) alimentados com dieta rica em gordura e colesterol.

3.2.3 Determinar se a ausência do receptor Toll-like 4 (TLR4) influencia na concentração plasmática de lípides e no perfil das lipoproteínas: VLDL, LDL e HDL

Estratégia: As frações de lipoproteínas foram obtidas por FPLC usando-se o plasma sanguíneo dos camundongos dos diferentes grupos de estudo antes e após serem submetidos à dieta rica em gordura e colesterol. A concentração plasmática dos lípides foi determinada enzimaticamente.

3.2.4 Determinar se a ausência do Receptor Toll-like 4 (TLR4) altera a sinalização redox na placa de ateroma.

Estratégia: Para analisar a sinalização redox na parede vascular de animais LDLr KO, DKO e TLR4 KO, medimos a expressão de iNOS por imunohistoquímica, a produção de superóxido, por HPLC de produtos derivados da oxidação de DHE (dihidroetídio) e a geração de peroxinitrito, por imunohistoquímica para nitrotirosina.

3.2.5 Determinar se a ausência do receptor Toll-like 4 (TLR4) altera o processo inflamatório na placa aterosclerótica

Estratégia: Observamos a expressão de vias de sinalização (CD40L) ou efetoras (metaloproteinase 9 – MMP9) do processo inflamatório vascular em camundongos LDLr ^{-/-}, TLR4 ^{-/-} ; duplo *Knockout* (LDLr ^{-/-}/ TLR4 ^{-/-}) antes e após 12 semanas de dieta rica em gordura e colesterol, por imunohistoquímica.

4 MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Guia de Procedimentos e Cuidados no Uso de Animais, aprovado pelo comitê de Uso de Animais em Pesquisa e Educação da Universidade de São Paulo.

4.1 Matrizes Animais e Condições Experimentais

1) Camundongos deficientes para TLR4 (C57BL/10ScN) e 2) camundongos deficientes para o receptor de LDL (LDLr) (*ldlr*^{tm1^{Her}}) foram adquiridos comercialmente do Jackson Laboratory (Bar Harbor, EUA) e foram mantidos no biotério central da FMUSP. Animais heterozigotos para a deficiência de ambos os genes foram obtidos a partir do cruzamento das matrizes 1 e 2. Os animais heterozigotos foram acasalados entre si e camundongos duplo *Knockout* foram obtidos. A ausência da expressão desses receptores foi confirmada por genotipagem utilizando-se reações de PCR.

Os animais gerados para o estudo foram mantidos em gaiolas plásticas, em um número de 5 animais/gaiola, em ambiente de temperatura e umidade controladas e ciclo de luz/escuro de 12 h, e submetidos à alimentação *ad libitum* de ração e água. As gaiolas dos animais foram limpas 3 vezes por semana e a troca da água dos bebedouros, diariamente. Os camundongos machos com idade entre 12 e 16 semanas, foram então divididos aleatoriamente em 3 grupos :

- 1) LDLrKO
- 2) TLR4KO

3) duplo *knockout* (DKO)

Os animais de todos os grupos foram submetidos a uma dieta contendo 1,25% de colesterol durante um período de 12 semanas. Para uma melhor conservação, a dieta foi mantida sob refrigeração até momento de sua utilização.

4.2 Genotipagem dos animais

Os animais foram genotipados por reações de PCR (Reação em cadeia da Polimerase) usando-se os *primers* da tabela I abaixo:

Tabela I – Primers utilizados nas reações de PCR para identificação das linhagens de camundongos *knockout* para o receptor de LDL e para o receptor Toll-like 4.

Linhagem	Primer
TLR4KO	<i>Sense:</i> GTGCCCCGCTTTCACCTCTG
	<i>Reverse:</i> TCTAGACACTACCACAATAA
LDLrKO	p14 AGGTGAGATGCAGGAGATC
	p46 ACCCCAAGACGTGCTCCCAGGATGA
	p59 CGCAGTGCTCCTCATCTGACTTGT

Para identificação dos camundongos *knockout* para o receptor toll-like 4 a reação de PCR foi feita procurando-se o gene que codifica o receptor. Nesse caso, a ausência de amplificação identificava o animal *knockout*. Em relação aos animais *knockout* para o receptor de LDL, a reação foi feita procurando-se a mutação inserida nesses animais e que é responsável pelo não funcionamento do receptor de LDL.

4.2.1 Extração do DNA

A extração do DNA para a genotipagem foi feita retirando-se 1 cm da cauda dos camundongos e macerando-se o fragmento da cauda até que ficasse com o aspecto de uma folha. Em seguida o material foi colocado em um tubo de 1,5 mL com 150 µL de tampão B (10 mM de Tris-HCl, 400 mM de NaCl, 2 mM Na₂EDTA) com pH 8.2. A essa mistura foi acrescentado 10µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%, 2 mL de EDTA 0,5 M pH 8 e 488 mL de água milli-Q) previamente enriquecido com 8µL de Proteinase K (20 mg/mL).

O material foi incubado por duas horas a 65°C. Após esse período foi adicionado 100µL de NaCl 6M e centrifugado a 3000 rpm a 4°C por 20 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para outro tubo com 500 µL de etanol gelado e os tubos foram acondicionados em gelo.

O *pellet* de DNA foi novamente lavado com 1 mL de etanol gelado e centrifugado por 20 minutos a 14000 rpm. Após a centrifugação deixou-se o *pellet* secar em temperatura ambiente e ressuspendeu-se o mesmo com 100 ou 200 mL de Tris-EDTA.

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 260 nm e diluído até a concentração de 100 ng/µL. Para realizar a reação de PCR usou-se 1 µL desse preparado.

4.2.2 Reação de PCR

Os camundongos do grupo TLR4KO foram genotipados utilizando-se uma solução de *mix*, contendo 1 µL da amostra de DNA, 17,75 µL de água, 2,5 µL de tampão (10x), 1 µL de MgCl₂ (50 mM), 1µL do *primer sense* (10pmol/ µL) e 1µL do *primer reverse* (10pmol/ µL), 0,5 µL dNTP (10mM – Invitrogen) e 0,25 µL de Taq polimerase (Invitrogen).

Os camundongos do grupo LDLrKO foram genotipados utilizando-se duas soluções de *mix* (A e B) obedecendo as mesmas proporções utilizadas para o preparo da solução de *mix* para o grupo TLR4KO. Entretanto, para o *mix* A era utilizado 1 µL do *primer* 46 (10pmol/ µL) e 1 µL do *primer* 59 (10pmol/ µL) enquanto que para o *mix* B era utilizado 1 µL do *primer* 46 (10pmol/ µL) e 1 µL do *primer* 14 (10pmol/ µL).

As reações de PCR foram realizadas em termociclador (PTC-200, MJ Research) e para identificação dos camundongos do grupo TLR4KO, era feita utilizando-se uma temperatura de hibridização de 61°C, durante 32 ciclos sendo reduzida em 1°C a cada ciclo. Para a identificação dos camundongos *knockout* para o receptor de LDL, realizavam-se as reações A e B para cada amostra utilizando-se uma temperatura de hibridização de 64°C durante 26 ciclos, sendo que a cada ciclo diminuía-se a temperatura em 0,5°C.

Os animais do grupo DKO eram identificados realizando-se as reações acima descritas para a amostra de um único animal e observando-se a não amplificação do receptor Toll-like 4 e da mutação inserida nos camundongos LDLrKO.

Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo, com todos os componentes da reação menos o DNA, para evitar uma possível contaminação.

A amplificação ou não dos genes de interesse era verificada fazendo-se, após as reações de PCR, eletroforese em gel de Agarose 1% corado com brometo de etídeo (Horizon[®] - Life Technologies). Em cada poço do gel era colocado 3 µL do produto da reação de PCR e 5 µL *loading Dye*. A eletroforese era feita por 40 minutos a 80V. Os resultados foram fotodocumentados por meio do aparelho Gene Flash (SynGene[®]).

4.3 Composição da dieta

A dieta foi obtida da HN&C Consultoria e Nutrição Experimental, Dourado, SP, formulada conforme as recomendações da AIN-93⁴⁶ e teve a seguinte composição: 52,95% de carboidratos, 20% de proteínas, 17% lipídios (11% de óleo de coco, 4,75% de óleo de soja e 1,25% de colesterol), 5% de celulose, 3,5% de mistura mineral, 1% de mistura vitamínica, 03% de L-cistina e 0,25% de Bitartarato de colina.

A dieta era fornecida em pó ao nosso laboratório. Aqui eram preparados os *pellets* de ração que, para uma melhor conservação, eram mantidos sob refrigeração até o momento de sua utilização.

4.4 Medida do consumo alimentar e peso corporal

O consumo alimentar de todos os animais foi avaliado semanalmente, a partir da data do início da dieta, pela diferença de peso entre a quantidade de ração oferecida e as sobras pesadas na semana subsequente. Avaliou-se o consumo "per capita" pela média de consumo de cada gaiola/nº de animais.

O peso corporal de cada animal foi avaliado quinzenalmente, em uma balança devidamente aferida. A partir do peso corporal de cada animal, determinamos a evolução ponderal média dos grupos no decorrer do estudo.

4.5 Sacrifício dos animais e coleta das amostras

No final do período estabelecido, os animais foram mantidos em jejum por 6 horas e posteriormente transferidos do biotério para o laboratório onde permaneceram para ambientação durante 30 minutos. Foram pesados e anestesiados utilizando-se uma mistura de Rompum® (cloridrato de xylazina 16mg/kg peso) e Ketalar® (cloridrato de cetamina 50mg/kg de peso) para evitar dor ou sofrimento dos mesmos. Alguns animais de cada grupo foram usados para ensaios de produção de superóxido vascular enquanto que demais animais de cada grupo foram usados no protocolo a seguir: o sangue foi coletado por punção cardíaca ou aorta abdominal em tubos contendo heparina ou EDTA como anticoagulante. Posteriormente, os órgãos dos animais foram perfundidos com solução fisiológica (NaCl 0.9%) gelada, e em seguida com formalina a 10% para iniciar a fixação da aorta. A perfusão foi

pelo ventrículo esquerdo com secção da aorta distal. O fígado foi retirado, lavado com salina, e armazenado a -20°C para determinação do conteúdo de colesterol hepático. O coração, juntamente com os ramos aórticos, foram cuidadosamente removidos e colocados em pequenos frascos com formalina 10%, durante pelo menos 48 horas, até o seu processamento para determinação de lesão aterosclerótica.

As carcaças dos animais foram descartadas conforme as normas de descarte de material biológico da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, acondicionadas em sacos plásticos que foram armazenados em câmara fria até a posterior incineração das mesmas.

4.6 Análise do perfil lipídico e das lipoproteínas por Cromatografia líquida (FPLC)

Amostras de sangue dos animais correspondendo ao período basal (dieta *chow*) e após dieta aterogênica foram coletadas da cauda em tubos contendo EDTA (concentração final 1 mM), centrifugados a 2500 x *g* a 4°C por 10 minutos e alíquotas de plasma estocadas a -70°C para análise de perfil lipídico e lipoproteínas. As lipoproteínas foram obtidas por cromatografia líquida (FPLC). Alíquotas de 200 µL de plasma de dos camundongos foram injetados numa coluna Superose 6 (HR 10/30) (FPLC System, Pharmacia, Upsalla, Suécia) e as lipoproteínas foram eluídas numa velocidade de 0,5 mL/min com tampão Tris, pH 7.4. Após a eluição as 10 frações iniciais foram descartadas e as 30 frações seguintes de 0,5 mL foram coletadas e o colesterol determinado enzimaticamente em analisador

automático bioquímico Cobas Mira (F.Hoffmann Roche, Basiléia, Suíça) utilizando kit comercial da Roche[®]. A identificação dos picos correspondentes as VLDL, LDL e HDL foi determinada pelo perfil do colesterol total.

4.7 Concentração Sérica de anticorpos anti-LDL oxidada

Para medir, indiretamente, a concentração sérica de LDL oxidada por ELISA nos camundongos dos diferentes grupos, foi necessário sensibilizar uma placa de ELISA com LDL oxidada. A LDL foi obtida a partir de um *pool* de soro de camundongos C57BL6 que estavam em jejum por 12h. Ao soro, foi adicionado aprotinina 0,1 unidade/mL, benzamidina 2mM, gentamicina 0,5%, cloranfenicol 0,25% e fluoreto de fenilmetilsulfonila 0,5mM⁴⁷. A fração de LDL foi obtida por ultracentrifugação sequencial⁴⁸, usando um rotor 50Ti, 10°C, 100000xg. No início, o soro foi centrifugado por 12 horas para obter VLDL (densidade = 1.006g/mL). Depois, a densidade do infranadante foi ajustada para 1.063 pela adição de KBr e centrifugada por 20 horas a 100000xg, para obtenção da LDL (densidade menor que 1.063 g/mL). O sobrenadante de LDL foi retirado e dialisado em solução fosfato de PBS (NaCl 0,9%, Na₂PO₄ 0,2%, NaOH 0,38% e EDTA 0,01% pH 7.4). Após esse procedimento, a LDL foi filtrada com um filtro de 0,20 micra. As proteínas foram quantificadas usando o kit BCA (Pierce, USA) seguindo as especificações do fabricante.

A LDL foi, então, oxidada como descrito por Gidlund *et al.*⁴⁹ com 20µM de CuSO₄ por 18 horas a 37°C. Após esse tempo, a oxidação foi bloqueada pela adição de EDTA 1mM.

Essa LDL oxidada foi, então, usada para sensibilizar uma placa de ELISA, pelo seguinte protocolo: a placa de ELISA foi encubada com a LDL oxidada (3,5 mg/mL) por 18 horas a 4°C. Após esse tempo, ela foi lavada 3 vezes em PBS e bloqueada com gelatina 1% por 2 horas, seguida de mais três lavagens com PBS. Amostras diluídas de soro (1:400) foram adicionadas e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Para normatizar os resultados, adicionou-se um padrão de IgG anti- LDL oxidada a um dos poços já sensibilizados. Prosseguiu-se com 3 lavagens de PBS Tween (0,05%). Adicionou-se o anticorpo de detecção (BD Biolabs, USA) e incubou-se por 2 horas. Então, procedeu-se com mais 3 lavagens de PBS Tween (0,05%) e adicionou-se solução de revelação (BD Biolabs, USA) deixando agir por 30 minutos. A leitura foi feita em um leitor de ELISA com comprimento de onda de 540nm. A densidade ótica foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\text{D.o autoanticorpo anti-oxLDL} = (\text{d.o amostra} - \text{d.o branco}) / (\text{d.o padrão} - \text{d.o branco})$$

4.8 Análise da secreção hepática de triglicérides (TG)

Os animais de cada grupo, após 12h de jejum, foram pesados e coletou-se uma amostra de sangue da cauda por meio de um capilar de hematócrito para dosagem basal de triglicérides. Em seguida os camundongos foram anestesiados e receberam uma injeção intravenosa de

Triton WR1339, na veia femoral, para inibir a atividade da lipoproteína lipase, na dose de 500mg/kg, dissolvidos em solução de NaCl 0,9%. Após a injeção, coletou-se amostras de sangue de cada animal nos tempos 30, 60 e 90 minutos. Determinou-se os níveis de triglicérides no plasma obtido em cada tempo. A secreção hepática de VLDL foi determinada pela inclinação das retas médias obtidas por regressão linear da trigliceridemia ao longo do tempo após administração do Triton WR 1339.

4.9 Análise da lesão aterosclerótica na raiz aórtica (método modificado de Paigen et al.^{50, 51})

Os corações mantidos em formalina 10%, foram transferidos para uma cápsula (cassetes) cuidadosamente identificados e foram colocados sob água corrente durante pelo menos duas horas. Passado este período, estas cápsulas contendo os corações foram incubadas, em banho-maria a 40°C por 2 horas, em gelatina (Type A–Porcine Skin) a 5%, em seguida gelatina a 10% (2h), e finalmente em gelatina a 25% overnight. Posteriormente, foram colocados sob refrigeração por 3 horas ou até atingirem a consistência de um bloco de gelatina e estes foram mantidos em formalina 10% a 4°C. Para iniciar o processamento dos cortes, os ventrículos foram seccionados entre o ápice e a base num plano paralelo a uma linha definida pelas pontas laterais dos átrios. Os corações foram embebidos no composto de TBS (Tissue Freezing Medium-Riange Biomedical Sciences, Durham, NC) e colocados na câmara de congelamento do criostato (Micrótomo HM 505 E-Micron Criostato). Os cortes tiveram início

a partir da porção distal do coração. Após a identificação da raiz aórtica, quando os três folhetos valvulares foram visíveis, cortes seriados de 10 µm foram coletados em lâminas de microscopia cobertas com uma fina camada de gelatina. Cortes sucessivos alternados da aorta proximal foram coletados numa área definida como logo após o final dos sinus aórtico até onde a válvula não é mais visualizada, tendo assim a aorta uniformemente arredondada (comprimento total 280 a 480 µm). As lâminas foram coradas com *oil Red O* e contra coradas com Hematoxilina e *Light Green*. A imagem da lesão aterosclerótica foi capturada por câmera (Leica) e pelo microscópio (Leica DMLS) e quantificada utilizando um software específico (Leica Qwin) versão 3.1.0 para Windows. A área média foi calculada para cada animal e subsequente para cada grupo e quantificada como a soma de seis cortes de 10 µm, distantes um do outro por 80 µm, numa área total da aorta de 480 µm. Para calcular a proporção de gordura na placa, utilizou-se a seguinte fórmula:

$\text{Porcentagem de gordura da placa} = (\text{área coberta por gordura corada com } Oil\ red\ O / \text{área média da placa}) \times 100$
--

4.10 Composição da placa

O arco aórtico foi retirado e incluído em parafina. Foram realizados cortes longitudinais, de 5µm de espessura, que foram utilizados para determinar:

4.10.1 Quantidade de colágeno na placa por coloração de picrossirius

Neste caso os cortes seriais foram desparafinados em banhos sucessivos em xilol e hidratados com banhos sucessivos de álcool (absoluto, 95° e 70°) seguido de água corrente e água deionizada. Após isso, receberam por dois minutos um banho de ácido fosfomolibílico 0,2%, banho com água destilada e incubados por 110 minutos na solução de picrossirius 0,1%, diluído de uma solução saturada de ácido picrico (33,33 mg/mL). Após a incubação, as amostras foram lavadas por dois minutos em ácido clorídrico 0,01N, seguida de banhos sucessivos de álcool (70%, 95% e absoluto) e por um ultimo banho de xilol. A análise foi feita utilizando microscópio e programa analizador de imagens (Leica Qwin), versão 3.1.0 para windows XP. A proporção de colágeno na placa foi dada pela seguinte fórmula:

$\text{Porcentagem de colágeno da placa} = (\text{área marcada para colágeno} / \text{área média da placa}) \times 100$

4.10.2 Expressão de CD40L, iNOS, MMP9 e formação de nitrotirosina

A expressão dessas moléculas foi feita por imunohistoquímica utilizando-se os seguintes anticorpos primários: Anticopo policlonal de coelho - IgG contra CD154 (H-215) Santa Cruz Biotechnology (diluição 1:60); anticorpo polyclonal de coelho - IgG conta iNOS (NOS2-N20-Sc651) Santa Cruz Biotechnology (diluição 1:50); anticorpo policlonal de cabra – IgG contra MMP9 (C20):Sc6840 Santa Cruz Biotechnology (diluição 1:50); anticorpo policlonal de coelho – IgG contra nitrotirosina (A-21285) Molecular Probes (diluição 1:200). Os cortes seriais parafinados foram desparafinados em xilol e hidratados com banhos sucessivos de álcool (absoluto, 95° e 70°), seguidos de água corrente e água deionizada. O bloqueio do peróxido endógeno foi feito por banhos de solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 10vol) por 5 minutos seguido de água corrente, água deionizada e PBS. A recuperação antigênica foi feita com solução de Citrato de Sódio 10mM, pH 6,0 em alta temperatura por 40 minutos; depois de resfriar com água gelada, os cortes foram lavados em PBS por 5 minutos e incubados com leite desnatado 2% por 30 minutos para bloquear reações inespecíficas. A incubação com o anticorpo primário correspondente a cada tratamento foi feita por cerca de 18h em geladeira. Os anticorpos primários foram previamente diluídos em albumina bovina (BSA) seguido de banhos de PBS por 5 minutos. As lamina foram incubadas em lamina úmida, em temperatura ambiente, por 60 minutos com anticorpo secundário biotilado (Vector Laboratories, Cat# BA-5000 – diluição 1:500) seguido de 3 banhos

em PBS por 5 minutos e incubados com complexo ABC (Vector Laboratories, Cat# BA-5000) – diluição 1:500) por 30 minutos em temperatura ambiente, seguida de 3 banhos em PBS por 5 minutos. Posteriormente as laminas foram incubadas em solução de cromógeno (50mg de DAB para 50mL de PBS com 3mL de H₂O₂ 10vol) por uma duração que variou conforme o anticorpo: para MMP9 e nitrotirosina a incubação foi de 1 minuto; CD40L a incubação foi de 3 minutos e para iNOS a incubação foi de 2 minutos. Após esse período de incubação, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos. Foi feita contra coloração por 30 segundos em Hematoxilina de Harris seguida de lavagem em água corrente por 5 minutos. As amostras de tecidos foram submetidas a banhos sucessivos de álcool (95° e absoluto) e por um ultimo banho em xilol.

A análise foi feita usando-se microscópio e programa analisador de imagens que permitiu a quantificação da área da Placa. A porcentagem de CD40L, iNOS e MMP9 na placa foi dada pela fórmula:

$\% \text{ de CD40L, iNOS ou MMP9 da placa} = \left(\frac{\text{área marcada para CD40L, iNOS ou MMP9}}{\text{área média da placa}} \right) \times 100$
--

A análise para a detecção da formação de nitrotirosina foi feita medindo-se a marcação presente em toda a área do vaso de cada um dos grupos, uma vez que foi verificada marcação na parede do vaso dos animais do grupo TLR4KO.

4.11 Produção de ânion superóxido

A aorta ascendente, arco aórtico e aorta descendente foram retirados, armazenados em tubos, devidamente etiquetados quanto ao grupo e data da cirurgia, e imersos em nitrogênio líquido. Os tubos com o material foram retirados do nitrogênio líquido e congelados a -80°C por até 2 semanas antes do processamento das amostras.

As amostras foram processadas da seguinte forma: segmentos de 0,7 a 1,3 cm de comprimento, pesando de 4,1 a 10,2 mg, foram colocados em tubos com 300 μL de PBS/DTPA. Em seguida acrescentou-se 50 μM de DHE e deixou-se as amostras em banho maria a 37°C por trinta minutos. Após esse período, os seguimentos foram retirados do banho maria, colocados no gelo e lavados uma vez em solução de PBS/EDTA para retirar o excesso de DHE. Em seguida cada segmento foi macerado em cadinho de alumínio com nitrogênio líquido e pistilo. O pó foi retirado com uma espátula, armazenado em frasco devidamente etiquetado e armazenado no gelo. Acrescentou-se 500 μL de acetonitrila (ACN) em cada frasco e sonicou-se cada amostra, três vezes, por 10 segundos. Após esse procedimento, as amostras foram centrifugadas por 10 min em centrífuga a 10000 rpm a 4°C . Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e secou-se a vácuo (Speed Vac Plus model SC-110A, Thermo Savant) por duas horas. As amostras foram ressuspensas com 120 μL de PBS/DTPA 0,1 mM e injetadas em HPLC para análise.

A produção de superóxido vascular foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Superóxido vascular} = [\text{EOH}]/[\text{DHE consumida}]$$

4.12 Medida de pressão arterial e frequência cardíaca

A pressão arterial caudal e a frequência cardíaca foi medida de forma não invasiva usando-se um sistema computadorizado do tipo “tail-cuff” (BP 2000 Visitech Systems) como descrito por Johns *et al.*⁵². Os animais foram climatizados às condições do aparelho por uma semana antes das medições propriamente ditas. Eles foram colocados sobre uma plataforma de metal com temperatura preestabelecida em 38°C e imobilizados com o auxílio de pequenas caixas de metal presas a plataforma por um ímã. Manguitos de borracha, ligados a esfigomanômetros automáticos, adaptados à região proximal da cauda dos animais, foram colocados. O aparelho, previamente calibrado com um esfigomanômetro manual e uma coluna de mercúrio, era ligado e os manguitos começavam a exercer pressão (0 a 250 mmHg) na cauda dos animais. Os sinais de onda de pulso da pressão arterial na artéria caudal foram captados por um sensor preso a região mediana da cauda e o registro transmitido ao computador. Para cada animal foram realizadas 20 medições, sendo as 3 primeiras medições descartadas (adaptação do animal). O resultado obtido foi expresso como sendo a média das medições restantes e valores muito discrepantes, em relação aos demais, foram descartados.

4.13 Análise estatística

Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média. A comparação entre os 3 grupos foi feita usando-se ANOVA seguida do pós teste de Student-Newman-Keuls. Para comparações realizadas apenas entre os grupos DKO e LDLrKO, utilizou-se teste t não pareado com correção de Welch. Essas análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 4 para windows. O nível de significância foi estabelecido em 0.05 para todas as análises.

5 RESULTADOS

5.1 Peso e consumo de dieta

Os animais dos três grupos experimentais apresentavam peso bastante similar antes de se iniciar a administração de uma dieta rica em gordura e colesterol, conforme apresentado na Tabela II.

Durante as doze semanas após a introdução da dieta, os animais foram pesados e seu consumo alimentar registrado. Não houve qualquer diferença entre o alimento consumido entre os três grupos alimentares. Assim, ao final do estudo, antes do sacrifício, o ganho de peso foi similar em todos os grupos, resultando também em pesos semelhantes (Tabela II).

Tabela II – Peso e Consumo de Dieta dos animais dos diferentes grupos antes e após dieta. Dados expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão.

	LDLrKO n=9	DKO n=9	TLR4KO n=9
Peso Inicial (g)	24.9 $\pm$ 0.5	23.1 $\pm$ 0.4	25.5 $\pm$ 0.6
Peso Inicial (g)	30.5 $\pm$ 0.7	29.9 $\pm$ 0.4	31.5 $\pm$ 0.8
Ganho de Peso (g)	5.6 $\pm$ 0.8	6.8 $\pm$ 0.3	6.0 $\pm$ 0.3
Consumo Semanal de Dieta (g)	23.6 $\pm$ 0.6	22.4 $\pm$ 0.3	22.2 $\pm$ 0.8

5.2 Pressão arterial e frequência cardíaca

A pressão arterial e a frequência cardíaca foram medidas no início do estudo, antes da administração da dieta e ao final das doze semanas. Notamos inicialmente, que não havia diferença significativa entre as variáveis hemodinâmicas entre os três grupos estudados, sugerindo que nem a deficiência do receptor de LDL, nem a do TLR4 influenciam a regulação basal da pressão arterial ou da frequência cardíaca.

Ao final do período de administração da dieta, antes do sacrifício, tanto a pressão arterial quanto a frequência cardíaca foram bastante semelhantes aos valores basais iniciais. Novamente, nenhuma diferença entre os três grupos pode ser verificada (Tabela III)

Tabela III – Pressão Arterial e Frequência Cardíaca. Dados expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão

	LDLrKO n=9	DKO n=9	TLR4KO n=9
Pressão Arterial Inicial (mmHg)	138.2 $\pm$ 2.2	135.6 $\pm$ 4.7	132.5 $\pm$ 3.2
Pressão Arterial Final (mmHg)	145.3 $\pm$ 3.4	144.1 $\pm$ 3.5	138.2 $\pm$ 3.0
Frequência Cardíaca Inicial (bpm)	561.5 $\pm$ 19.5	572.6 $\pm$ 20.7	560.6 $\pm$ 10.3
Frequência Cardíaca Final (bpm)	544.4 $\pm$ 14.1	574.3 $\pm$ 8.1	567.5 $\pm$ 7.9

Em conjunto, os dados apresentados nas Tabelas II e III sugerem que o peso e as variáveis hemodinâmicas (pressão arterial e frequência cardíaca) não podem ser responsabilizadas por diferenças na evolução da doença aterosclerótica que possa haver entre os três grupos experimentais.

5.3 Lesão Aterosclerótica

Analizamos inicialmente a formação da placa aterosclerótica na raiz da aorta em camundongos dos três grupos experimentais.

A Figura 1 mostra um exemplo de placas formadas nessa localização. Nos camundongos LDLr KO ocorre a formação de placas ateroscleróticas, que se estendem para a luz vascular. Essas placas são formadas por grande quantidade de lípidos, evidenciados pela sua afinidade ao corante lipofílico *oil red O* (Figura 1A).

As placas ateroscleróticas formadas nos camundongos DKO eram menores que as dos deficientes somente em LDLr, com menor conteúdo lipídico (Figura 1B). Podemos também observar que os camundongos TLR4 KO apresentam raiz da aorta normal, com a parede íntegra, sem deposição de lípidos (Figura 1C).

Ainda nessa figura, notamos, na luz arterial, os folhetos valvares, marcos iniciais utilizados para mensuração das placas, conforme descrito nos Métodos.

Figura 1 – Placas de ateroma na raiz da aorta.

Cortes representativos da raiz da aorta de cada grupo estudado. A – LDLrKO; B – DKO e C – TLR4KO. Coloração por *Oil Red O*. Aumento de 40X.

A análise quantitativa da placa aterosclerótica presente nos três grupos experimentais evidenciou que os animais deficientes em receptor LDL formam uma placa extensa na raiz da aorta (Figura 2), composta, em sua maioria, por um grande núcleo lipídico (Figura 3). Nos camundongos do grupo DKO o tamanho da placa era bem menor, aproximadamente a metade daquelas dos animais deficientes somente em receptor de LDL (Figura 2). A composição das placas dos animais DKO também era distinta, sendo que seu conteúdo de gordura era menor do que as dos animais LDLr KO (Figura 3). Os animais deficientes somente em TLR4 não apresentaram formação de placas de ateroma em sua parede arterial.

Figura 2 – Área da placa aterosclerótica na raiz da aorta

Camundongos TLR4KO não formaram placa. Os camundongos DKO apresentaram placa aterosclerótica que são quase 50% menores que as placas formadas nos camundongos LDLrKO. Média $\pm$ EPM, n=9. *p < 0.05 vs LDLrKO.

Figura 3 – Porcentagem média de gordura na placa da raiz da aorta

As placas ateroscleróticas dos animais do grupo DKO apresentaram um núcleo lipídico menor do que as placas dos camundongos LDLrKO. O conteúdo de gordura foi medido como porcentagem em relação à área média da placa. Média $\pm$ EPM, n=9. *p < 0.05 vs LDLrKO.

5.4 Estrutura da placa de ateroma

Como discutido anteriormente, placas instáveis podem se romper, desencadeando síndromes coronárias agudas. Não existem modelos animais facilmente reproduzíveis de ruptura da placa. Assim, analisamos, em nosso modelo, características que indiquem estabilidade da placa.

Inicialmente mostramos que os animais DKO apresentam placas com menor conteúdo lipídico, quando comparados aos animais LDLr KO (Figura 3), o que já é uma característica de estabilidade.

Em seguida, analisamos o conteúdo de colágeno nas placas dos animais dos três grupos experimentais.

Na Figura 4, mostramos placas de animais LDLr KO e DKO coradas com picrossirius, específico para colágeno. Observamos que os animais DKO apresentam uma maior deposição de colágeno, evidenciada, principalmente, na periferia da placa de ateroma, formando um envoltório fibroso em torno do centro lipídico. A quantificação do colágeno depositado mostra que a proporção de colágenos na placa é quase 50% maior nos animais DKO, quando comparados aos LDLr KO (Figura 5).

Figura 4 – Deposição de colágeno na placa aterosclerótica.

Corte representativo da placa aterosclerótica do arco aórtico dos grupos LDLrKO (A) e DKO (B). Coloração por picrossirius. Aumento de 200X.

Figura 5 – Porcentagem média de camundongos na placa aterosclerótica.

Camundongos DKO apresentaram quase o dobro de deposição de colágeno ao redor da plaque do que camundongos LDLrKO. Média $\pm$ EPM, $n=7$. * $p < 0.05$ DKO vs LDLrKO.

Em conjunto, os achados apresentados nas figuras 3 e 5 sugerem que as placas formadas nos animais DKO apresentam mais sinais de estabilidade que as dos animais LDLr KO.

5.5 Perfil lipídico

5.5.1 Colesterol e triglicérides totais

A seguir, nosso objetivo foi determinar quais fatores responsáveis pela formação da placa de ateroma poderiam ser influenciados pelo receptor TLR4, de tal maneira que sua ausência induzisse a formação de placas mais estáveis. Inicialmente avaliamos os lípides circulantes.

No período basal, podemos observar que os animais deficientes em receptor LDL apresentam valores de colesterol e TG circulantes maiores que os animais TLR4 KO (Tabela IV). Não há diferença, entretanto, entre os animais LDLr KO e os DKO.

Como esperado, após 12 semanas de dieta rica em gordura, a ausência do LDLr induziu um grande aumento dos lípides circulantes, principalmente colesterol. Esse achado não é observado nos animais TLR4 KO, cuja concentração de lípides circulantes é mais próxima a dos animais selvagens (dados não mostrados), mesmo quando alimentados com a dieta rica em gordura e colesterol (Tabela IV e Figuras 6 e 7)

Curiosamente, observamos que nos animais DKO o incremento de TG circulante induzido pela dieta não é tão grande quanto o observado nos animais LDLr KO (Tabela IV e figura 7). A diferença entre os níveis

circulantes de colesterol nos grupos LDLr KO e DKO não chega a ser estatisticamente significativa (Figura 6).

Tabela IV – Níveis séricos de colesterol e triglicérides, em mg/dL, antes (basal) e após (Final) serem submetidos a dieta rica em gordura e colesterol por 12 semanas

	Colesterol		Triglicérides	
	Basal	Final	Basal	Final
LDLrKO	282.7 ± 10.5	968.8 ± 75.3 ^b	86.8 ± 6.0	265.2 ± 27.6 ^e
DKO	221.5 ± 21.2	766.0 ± 89.0 ^c	103.9 ± 11.1	150.5 ± 8.8 ^{f,g}
TLR4KO	96.0 ± 1.9 ^a	161.1 ± 4.6 ^d	64.9 ± 9.6	66.8 ± 15.2

^ap<0.05: TLR4KO Basal vs DKO, LDLrKO Basal; ^{b,e}p<0.05: LDLrKO Final vs Basal; ^dp<0.05: TLR4KO Final vs Basal; ^{c,f}p<0.05: DKO Final vs Basal; ^gp<0.05: DKO Final vs LDLrKO Final.

Figura 6 – Concentração de colesterol plasmático

Concentração plasmática de colesterol no sangue dos animais dos diferentes grupos antes (basal) e após dieta rica em gordura e colesterol por 12 semanas (final). *p< 0.05 LDLrKO Final vs LDLrKO basal. #p< 0.05 DKO final vs DKO basal.

Figura 7 – Concentração de triglicéride plasmático

Concentração plasmática de triglicérides no sangue dos animais dos diferentes grupos antes (basal) e após dieta rica em gordura e colesterol por 12 semanas (final). * $p < 0.05$ LDLrKO final vs LDLrKO basal, DKO final. # $p < 0.05$ DKO final vs DKO basal.

Em resumo, podemos observar que os animais DKO apresentam uma menor concentração de TG circulantes que os camundongos LDLr KO tabela IV e Figura 7.

5.5.2 Perfil de lipoproteínas – Colesterol e TG

Analizamos a seguir as diferentes frações dos lípides circulantes.

Nos animais, TLR4 KO, que expressam um receptor de LDL funcional, o perfil lipídico é semelhante ao publicado para animais selvagens, com a maior fração de lípides estando presente nas partículas mais densas (HDL).

Já nos animais deficientes em receptor LDLr isoladamente (LDLr KO) ou em conjunto com o TLR4 (DKO), o colesterol se encontra circulando principalmente em partículas de menor densidade (VLDL e LDL).

Como observado na Figura 8 e Tabela V, não há diferença no perfil de colesterol presente em lipoproteínas entre os animais LDLr KO e DKO. Curiosamente, quando observamos os TG transportados pelas frações, notamos que existe uma maior porcentagem de HDL em animais DKO, quando comparados com os animais LDLr KO (Figura e Tabela VI)

Figura 8 – Perfil de colesterol das lipoproteínas

Tabela V – Porcentagem de colesterol nas lipoproteínas

Grupo	% Colesterol das Lipoproteínas		
	VLDL	LDL	HDL
LDLrKO	56.4 ± 1.8	32.6 ± 1.8	10.8 ± 0.4
DKO	57.1 ± 1.9	25.5 ± 1.7	17.2 ± 0.6 ^c
TLR4KO	7.5 ± 3.6 ^a	16.9 ± 2.0 ^b	75.5 ± 2.0 ^d

A porcentagem de colesterol de cada fração foi calculada como a área sob a curva dos espectros de absorvância mostrado na figura 8. Média ± EPM, n=6 para cada grupo. ^a $p < 0.05$ TLR4KO vs LDLrKO, DKO; ^b $p < 0.05$ TLR4KO vs LDLrKO, DKO; ^c $p < 0.05$ DKO vs LDLrKO, TLR4KO. ^d $p < 0.05$ TLR4KO vs LDLrKO, DKO.

Figura 9 – Perfil de triglicérides das lipoproteínas

Tabela VI – Porcentagem de triglicérides de cada fração de lipoproteína

Grupo	% Triglicérides das Lipoproteínas		
	VLDL	LDL	HDL
LDLrKO	73.8 ± 4.8	20.8 ± 3.8	5.2 ± 1.2
DKO	70.8 ± 4.1	20.8 ± 3.7	8.3 ± 2.4
TLR4KO	57.0 ± 8.1	24.1 ± 7.9	18.8 ± 2.4 ^a

A porcentagem de triglicérides de cada fração foi calculada como a área sob a curva dos espectros de absorvância mostrado na figura 9. Média ± EPM, n=6 para cada grupo. ^ap<0.05 TLR4KO vs LDLrKO, DKO.

5.5.3 Avaliação da produção de VLDL-TG

Procuramos medir a taxa de secreção hepática de VLDL-TG em nossos animais. Após observarmos que os camundongos DKO tinham uma concentração menor de triglicérides circulantes após administração da dieta, supomos que isso ocorresse devido a uma secreção hepática maior de VLDL-TG nos camundongos LDLrKO.

Nossos resultados, no entanto, não detectaram diferenças nas taxas de secreção de VLDL-TG entre os grupos experimentais (Figura 10).

Figura 10 – Taxa de secreção hepática de VLDL-TG.

A taxa de secreção hepática de VLDL-TG foi feita administrando-se de forma intravenosa, Triton WR 1339 para inibição da lipoproteína lipase. Não foi observada diferenças nas taxas de secreção entre os animais dos diferentes grupos.

5.6 Sinalização Redox

Distúrbios na sinalização redox podem resultar em maior oxidação de lípidos circulantes que, sabidamente e a alterações na formação e estrutura da placa.

Assim, investigamos se ocorrem distúrbios da sinalização redox em camundongos deficientes em LDLr e se a associação à deficiência do TLR4 poderia corrigir esses distúrbio.

5.6.1 Produção de superóxido vascular

Inicialmente, utilizamos um método de quantificação de superóxido, através da detecção da conversão de brometo de eítdio a diidroetidina por HPLC. Observamos que não existe diferença entre os três grupos experimentais quando a produção de superóxido é analisada por esse método. Entretanto, a variabilidade foi grande e o número de experimentos pequeno, devido à dificuldade de se obter a amostra (pequena quantidade de tecido disponível) (Figura 11).

Figura 11 – Produção de superóxido vascular.

Análise indireta da produção de superóxido vascular por oxidação da DHE.

Não foi possível detectar diferenças entre os grupos. n=4.

5.6.2 Concentração sérica de anticorpos anti-LDL oxidada

Como a presença de LDL oxidada é fundamental para o início da formação da placa aterosclerótica, nós procuramos medir, de forma indireta através da detecção de anticorpos contra LDL oxidada, os níveis séricos de LDL oxidada em amostras de sangue dos camundongos de todos os grupos. Entretanto, nossa análise não revelou diferenças entre os níveis séricos de LDL oxidada entre os diferentes grupos (Figura 12).

Figura 12 – Detecção de autoanticorpos anti-LDL oxidada.

Concentração sérica LDL oxidada foi feita de forma indireta, por meio da aferição de autoanticorpos anti-LDL oxidada entre os diferentes grupos. Não foi verificada diferença em relação a quantidade de anticorpos anti-LDL oxidada entre os grupos. n=4.

5.6.3 Expressão de iNOS na parede vascular

A seguir, analisamos a expressão de NOS induzível na parede vascular. Essa enzima produz NO, que pode agir tanto no processo inflamatório quanto na sinalização redox vascular.

Através da marcação por imunohistoquímica, pudemos observar que a expressão de iNOS na placa é menos evidente nos animais DKO, quando comparados aos animais LDLr KO (Figura 13).

A análise quantitativa das lâminas, mostrou que a expressão de iNOS é aproximadamente 60% menor nos animais DKO (Figura 14).

Figura 13 – Expressão de iNOS na placa.

Análise imunohistoquímica para a expressão de iNOS na placa aterosclerótica. O grupo DKO (B) apresenta menor expressão (marcada em marrom) do que o grupo LDLrKO (A). aumento de 400X.

Figura 14 – Análise quantitativa da expressão de iNOS na placa.

Proporção, em porcentagem, da expressão de iNOS na placa aterosclerótica. Os camundongos DKO apresentaram menor expressão quando comparados com os camundongos LDLrKO. A Área marcada foi quantificada e expressa como porcentagem em relação a área média da placa. Média $\pm$ EPM, n= 7 em cada grupo. * $p < 0.05$ DKO vs LDLrKO.

5.6.4 Formação de nitrotirosina na parede vascular

Uma vez que demonstramos uma maior expressão de iNOS no grupo LDLrKO, analisamos a formação de nitrotirosina na placa aterosclerótica. A nitrotirosina é um biomarcador para a formação de peroxinitrito, resultado da reação do superóxido com o óxido nítrico. O peroxinitrito é um oxidante potente, que pode reagir com resíduos de tirosina presentes em diversas proteínas. A formação de nitrotirosina é irreversível e ocasiona, na maioria das vezes perda da função da proteína atingida.

Observamos que nos camundongos LDLr KO, há uma coloração forte para nitrotirosina na parede vascular, sugerindo formação de grande quantidade de peroxinitrito (Figura 15 A). Nos camundongos DKO a presença de nitrotirosina é menor, sugerindo uma menor formação de peroxinitrito (Figura 15 B). Curiosamente, mesmo os animais TLR4 KO apresentam uma pequena quantidade de marcação na parede vascular na presença de anticorpos anti-nitrotirosina (Figura 15 C).

A análise quantitativa dos cortes histológicos mostrou que a área marcada para nitrotirosina nos animais DKO era aproximadamente 50% menor que nos animais LDLr KO, sugerindo uma menor disfunção da sinalização redox nos animais DKO (Figura 16).

Figura 15 – Marcação imunohistoquímica para nitrotirosina.

Análise imunohistoquímica para a formação de nitrotirosina, um marcador para formação de peroxinitrito. O grupo LDLrKO (A) mostrou maior formação de nitrotirosina quando comparado com os grupos DKO (B) e TLR4KO (C). Não houve diferença na formação desse marcador entre os grupos DKO e TLR4KO. Aumento de 200X.

Figura 16 – Análise quantitativa da coloração para nitrotirosina.

Formação de nitrotirosina na parede vascular de camundongos dos diferentes grupos experimentais. Os camundongos do grupo LDLrKO apresentaram maior marcação quando comparados com os outros dois grupos. Média $\pm$ EPM, n=5 em cada grupo. *p< 0.05 LDLrKO vs DKO, TLR4KO.

5.7 Inflamação

Como discutido anteriormente, inflamação é crucial para formação, desenvolvimento e ruptura da placa aterosclerótica. Diversos mediadores inflamatórios estão elevados em pacientes com doença coronariana e várias vias de sinalização estão envolvidas nesse fenômeno.

Assim, fomos analisar se a ausência do TLR4 em camundongos hipercolesterolêmicos poderia levar a uma menor reação inflamatória na parede vascular, levando assim à formação de uma placa mais estável.

5.7.1 Expressão de CD40L na placa

Usamos inicialmente como marcador a expressão de CD40L na parede vascular.

A via de sinalização é extremamente importante, tanto na gênese quanto no desenvolvimento e ruptura da placa de ateroma.

Podemos observar que ocorre uma diminuição da expressão de CD40L nos camundongos DKO, comparados aos animais LDLr KO (Figuras 17 e 18). Esses dados sugerem que a ausência do receptor TLR4 em camundongos LDLr KO induz a uma menor atividade de vias pró-inflamatórias.

Figura 17 – Expressão de CD40L na placa.

Análise imunohistoquímica para a expressão de CD40L no vaso aórtico. Grupo LDLrKO (A) com maior expressão de CD40L (marcado em marrom). Grupo DKO (B) com menor expressão em relação ao grupo LDLrKO. Aumento de 400X.

Figura 18 – Quantificação da expressão de CD40L na placa de ateroma.

Proporção, em porcentagem, da expressão de CD40L nas placas ateroscleróticas. Os camundongos DKO apresentaram menor expressão desse marcados quando comparados com os camundongos LDLr KO. Média $\pm$ EPM, n=5 em cada grupo. *p< 0.05 DKO vs LDLrKO.

5.7.2 Expressão de MMP9 na placa

A MMP9 é importante efetora do processo inflamatório, sendo necessária para a infiltração de leucócitos no sítio da inflamação, bem como para a reparação da área injuriada.

Observamos que os camundongos DKO apresentam uma menor expressão de MMP9 na parede vascular, quando comparados aos animais LDLr KO (figuras 19 e 20).

Figura 19 – Expressão de MMP9 na placa de ateroma.

Análise imunohistoquímica para a expressão de MMP9 no vaso aórtico. Grupo DKO (B) com menor expressão de MMP9 (marcado em marrom) que o grupo LDLrKO (A) com maior expressão. Aumento de 400X.

Figura 20 – Quantificação da expressão de MMP9 na placa de ateroma.

Proporção, em porcentagem, da expressão de MMP9 nas placas ateroscleróticas. Os camundongos DKO apresentaram menor expressão dessa enzima quando comparados com os camundongos LDLr KO. Média $\pm$ EPM, n=5 em cada grupo. *p<0.05 DKO vs LDLrKO.

Em conjunto, os nossos achados mostrando que diversas vias de sinalização envolvidas na inflamação, como a iNOS, o CD40L e a MMP9 têm sua expressão diminuída nos camundongos DKO, quando comparadas aos animais LDLr KO sugere que a deficiência do receptor TLR4 nos animais hipercolesterolêmicos leva a um menor processo inflamatório, podendo dessa maneira, induzir a formação de placas de ateroma mais estáveis, como as observadas nos animais DKO.

Além disso, a menor expressão de MMP9 pode ser a responsável pela maior deposição de colágeno observada nesses animais.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo comparamos a formação e desenvolvimento da placa aterosclerótica em camundongos com deficiência no receptor de LDL, associada ou não à deficiência do receptor toll-like 4. Pudemos observar que a ausência de sinalização através do TLR4 induz a formação de placas menores e com menos sinais de instabilidade, devido a uma melhora no metabolismo lipídico, nos distúrbios de sinalização redox e no processo inflamatório característico da aterosclerose.

6.1 Considerações sobre o modelo experimental utilizado

O estudo da evolução natural da aterosclerose em humanos é complicado pelo fato da doença se iniciar precocemente e as lesões detectáveis e sintomas só aparecerem décadas depois. Assim, foi necessário o desenvolvimento de modelos animais para os quais se pudessem estudar as etapas iniciais da aterogênese e o desenvolvimento das placas de ateroma. Até o início da década de 1990, o estudo da aterogênese era feito utilizando-se coelhos⁵³ e camundongos submetidos à dieta rica em gordura⁵⁴. Alimentados com essa dieta, coelhos desenvolvem hipercolesterolemia, porém as placas formadas em suas artérias têm pouca semelhança morfológica com as humanas. Já os camundongos selvagens, desenvolvem hipercolesterolemia com muita dificuldade e tardiamente, mesmo com dietas ricas em gordura, o que os torna um modelo difícil de padronizar.

Recentemente, esses modelos experimentais de aterosclerose foram substituídos por duas linhagens de camundongos geneticamente

modificados: Camundongos deficientes em apolipoproteína E (Apo E $-/-$) e camundongos deficientes no receptor de LDL⁵⁵.

O uso de camundongos como modelo experimental é mais vantajoso em relação a animais de maior porte, pois a colônia ocupa pouco espaço e sua manutenção e reprodução são relativamente fáceis. Além disso, a progressão histopatológica da lesão aterosclerótica nesses animais é similar a dos seres humanos⁷.

Existem, entretanto, diferenças importantes entre essas duas linhagens de camundongos que se refletem quando comparamos nossos achados aos de outros autores.

Os camundongos Apo E $-/-$ apresentam concentração elevada de colesterol sérico (por volta de 450 mg/dL) mesmo se receberem uma dieta padrão e que pode chegar a 2000 mg/dL com dieta rica em gordura e colesterol. Essa característica faz com que eles desenvolvam precocemente lesões ateroscleróticas por toda a aorta. Contrariamente, os camundongos LDL $-/-$ apresentam concentrações séricas de colesterol em torno de 200 mg/dL quando alimentados com dieta padrão e formam somente lesões pequenas, apenas na raiz da aorta⁵⁴. Quando alimentados com dieta rica em colesterol e gordura, os níveis séricos de colesterol sobem rapidamente, atingindo por volta de 1000 mg/dL e formação de placas de ateroma extensas em toda a extensão da aorta se tornam mais visíveis e podem ser quantificadas com mais facilidade. Além disso, Veniant *et al.*⁸ mostraram que a maior parte das lipoproteínas nos camundongos Apo E $-/-$ contém apoB-48 como apolipoproteína estrutural enquanto que, nos camundongos LDL $-/-$, a maior parte das lipoproteínas contém apoB-100 como lipoproteína estrutural.

Em conjunto, essas particularidades da linhagem LDLr ^{-/-} fazem com que esses camundongos apresentem placas com características morfológicas semelhantes às humanas e com início que coincide com a introdução da dieta, podendo-se assim, saber exatamente quanto tempo de evolução têm as placas avaliadas⁵⁶

Nenhum dos modelos, entretanto, apresenta ruptura espontânea da placa e fenômenos trombóticos intravasculares. Assim, para se avaliar a instabilidade das placas formadas nesses animais, utilizamos métodos indiretos, através dos quais comparamos características das placas murinas que têm um correspondente nas placas instáveis humanas. Por exemplo, baseado em achados de necrópsias, sabemos que placas com menor deposição de colágeno exibem uma maior probabilidade de ruptura⁵⁷. Transportamos esses dados para o modelo experimental e afirmamos que uma placa murina com pequena deposição de colágeno é uma placa instável, embora a probabilidade dela romper espontaneamente como uma placa humana seja ínfima.

Tendo em mente essas considerações, discutiremos a seguir os resultados obtidos em nosso estudo.

6.2 Ausência de sinalização pelo TLR4 induz a formação de placas ateroscleróticas menores

Pudemos observar nesse trabalho que camundongos deficientes no receptor de LDL e no TLR4 desenvolvem placas ateroscleróticas que são menores e mais estáveis do que as placas presentes nos animais deficientes apenas para o receptor de LDL, sugerindo que o TLR4 é

importante não só para o crescimento e formação da placa mas também para a manutenção de sua estabilidade.

Nossos resultados são similares aos obtidos por outros grupos. Michelsen *et al.*⁴⁵ fizeram um estudo em que usavam camundongos ApoE^{-/-} e ApoE^{-/-}/TLR4^{-/-}; onde observaram a formação de uma placa reduzida no grupo duplo *knockout* e relacionaram esta redução a uma diminuição da inflamação sistêmica no animal. Resultados semelhantes foram obtidos Bjorkbacka *et al.*⁵⁸ que relacionaram a via do TLR4 com a hiperlipidemia.

Nós desenvolvemos um modelo experimental diferente, baseado em camundongos deficientes no receptor de LDL. Essa linhagem, diferentemente dos camundongos ApoE^{-/-}, desenvolvem hipercolesterolemia e formação de placa aterosclerótica somente se forem alimentados com dieta rica em gordura e colesterol. Essa característica nos permitiu determinar o início do processo aterosclerótico de maneira mais precisa e termos resultados mais homogêneos.

Em conjunto com os dados experimentais de outros autores e dados clínicos⁵⁹ podemos concluir que a presença da sinalização através do TLR4 induz a uma aterosclerose mais severa.

6.3 Ausência de sinalização pelo TLR4 induz placas ateroscleróticas mais estáveis

A deficiência no TLR4 influenciou não só no tamanho da placa mas também em sua estrutura. As placas ateroscleróticas instáveis e mais suscetíveis a ruptura que são aquelas que possuem uma capa fibrosa fina e

um núcleo lipídico rico^{60, 61}. Essas características de instabilidade já foram demonstradas em camundongos por Williams *et al*⁶² que observaram que as placas ateroscleróticas que apresentavam sinais de ruptura possuíam uma fina capa fibrosa e eram maiores e com maior núcleo lipídico do que as placas sem ruptura.

Em nosso estudo, os camundongos DKO possuíam uma placa aterosclerótica com núcleo lipídico menos proeminente, aproximadamente 25% menor que os observados em placas de camundongos LDLr KO. Além disso, a deposição de colágeno nas placas dos camundongos DKO era também muito mais evidente, aproximadamente 50% maior que a observada nos camundongos deficientes somente em receptor de LDL. Interessante notar também que a deposição de colágeno nos animais DKO ocorreu principalmente na periferia das placas, gerando uma camada fibrosa envolvendo o núcleo lipídico. Esse padrão de distribuição não era tão evidente nos camundongos LDLr KO.

Assim, podemos dizer que a ausência de sinalização pelo TLR4 induz a formação de placas menores e mais estáveis. A seguir, exploramos os mecanismos pelos quais a ausência do receptor poderia influenciar o tamanho e a estrutura da placa aterosclerótica.

6.4 Ausência do receptor TLR4 altera os lípidos circulantes

Em nosso modelo experimental, verificamos que os animais do grupo DKO apresentavam uma concentração sérica menor de triglicérides do que os animais do grupo LDLrKO após a administração da dieta, enquanto os níveis séricos de colesterol não eram diferentes. Outros autores descreveram

que camundongos duplo *knockout* para o TLR4 e ApoE não apresentaram qualquer anomalia no perfil de lípides circulantes⁴⁵. Como descrito anteriormente, os níveis séricos de lípides em camundongos ApoE KO é muito mais alto que nos animais LDLr KO, o que pode ter impedido outros autores de detectarem o efeito do TLR4 nos TG circulantes.

Nossa primeira hipótese foi que a deficiência do receptor TLR4 poderia comprometer o transporte de lipídes através das membranas. No entanto, experimentos realizados por nosso grupo não foram capazes de detectar diferenças na captação de colesterol por macrófagos provenientes de animais DKO, comparados aos dos animais LDLr KO (dados não mostrados).

Uma segunda hipótese estudada foi a de que os animais DKO tinham uma menor produção hepática de triglicérides, comparados aos animais LDLrKO. Para confirmar essa hipótese, bloqueamos a hidrólise dos triglicérides pela lipoproteína lipase através da injeção intravenosa de Triton WR1339 como proposto por Otway *et al.*⁶³ para medir a produção endógena de triglicérides em nossos animais. Nossos resultados não mostraram diferenças na produção de hepática de triglicérides nos levando a crer que talvez seja um distúrbio na remoção de lípidos e não na sua produção. Estudos para a confirmação dessa hipótese ainda precisam ser realizados.

Podemos especular também que a ausência do TLR4 poderia levar a um aumento compensatório na expressão de receptores envolvidos no acúmulo e metabolismo lipídico, como os receptores *scavenger* ou, ainda, um aumento da atividade de receptores ativados por proliferadores de

peroxissoma (PPARs) que são fatores de transcrição importantes para o metabolismo lipídico⁶⁴. Essas hipóteses são puramente especulativas, por enquanto e ainda não foram testadas experimentalmente.

As lipoproteínas têm um papel importante na deposição e remoção dos lipídios que se acumulam nas lesões ateroscleróticas⁶⁵. Nossos dados mostraram que camundongos DKO tinham mais partículas de HDL-colesterol do que o grupo LDLrKO o que pode ter contribuído para o resultado que tivemos em relação ao tamanho da placa e núcleo lipídico já que a HDL diminui a lesão aterosclerótica em modelo experimental de aterosclerose⁶⁶. O mecanismo pelo qual um receptor de imunidade inata, no caso o TLR4, influencia o metabolismo lipídico não foi aprofundado em nosso estudo, mas é, sem dúvida, um dado interessante que merece ser melhor investigado.

Em resumo, podemos concluir que a deficiência do receptor TLR4 ocasiona alterações no metabolismo lipídico de maneira que pode influenciar positivamente a evolução da placa aterosclerótica, tornando-a menor e mais estável.

6.5 Sinalização Redox

Existem dados experimentais sugerindo que a sinalização através do TLR4 induz a geração de espécies reativas de oxigênio. Em neutrófilos, a ativação do TLR4 parece ser necessária para a produção de superóxido pela NADPH oxidase⁶⁷. Em vasos isolados, a exposição ao LPS, ligante do TLR4, aumenta a produção de superóxido e diminui a reatividade vascular dependente de endotélio por diminuir a biodisponibilidade do NO⁶⁸. É

também sabido que vasos ateroscleróticos apresentam distúrbios na sinalização redox⁶⁹.

Baseado nesses dados, procuramos determinar se a ausência da sinalização pelo TLR4 poderia corrigir os distúrbios apresentados pelos camundongos LDLr KO.

Inicialmente, determinamos de maneira indireta, através da mensuração de DHE, a produção de superóxido pelas artérias. Esse método foi recém desenvolvido e foi padronizado para artérias de coelho e não para artérias de camundongo⁷⁰. As amostras utilizadas para se fazer o ensaio eram muito pequenas e parte da amostra acabava sendo perdida no processamento, o que impediu que fossem realizados um grande número de experimentos. Assim, com um “n” reduzido, não conseguimos significância estatística em nossas medidas e a produção de superóxido nos três grupos foi semelhante.

Medimos também anticorpos contra LDL oxidada, como uma medida indireta da oxidação de lípidos por espécies reativas de oxigênio na parede vascular. Além disso, Mertens *et al.*⁷¹ relatam que concentrações séricas elevadas de LDL oxidada atuam como fatores de risco para doenças cardiovasculares. Entretanto, nossos ensaios para medir os níveis séricos de LDL oxidada foram incapazes de detectar qualquer diferença entre nossos grupos de estudo o que nos leva a crer que tal resultado talvez se deva ao fato de termos utilizado um número pequeno de amostras para cada grupo (n=4) já que nem mesmo o grupo TLR4KO, que não forma placa, apresentou diferenças quanto a quantidade de anticorpos contra LDL oxidada.

Passamos, posteriormente a analisar as espécies reativas de nitrogênio. Inicialmente procuramos a expressão da NOS2 pelo fato dessa enzima estar envolvida no processo inflamatório e na sinalização redox vascular. A NO sintase induzida (iNOS ou NOS2) é uma molécula alvo da ativação da via de sinalização do TLR4 por LPS microbiano e o NO por ela produzido exerce vários papéis importantes em respostas inflamatórias⁷². Nosso estudo revelou uma menor expressão de iNOS nas placas do grupo DKO quando comparadas com as placas do grupo LDLrKO. Esse fato também vai de encontro com o proposto pela literatura. Lee *et al.*⁷³ demonstraram que a ativação do TLR4 em macrófagos leva a produção de iNOS. Outros estudos mostraram que a deficiência para iNOS reduziu a lesão aterosclerótica em camundongos ApoE^{-/-}^{74,75} sugerindo que essa enzima tem um papel importante na progressão da lesão aterosclerótica e colaborando para os resultados por nós obtido.

O óxido nítrico pode exercer efeitos anti-inflamatórios como também efeitos proinflamatórios, dependendo da quantidade produzida e da reação com outras espécies reativas de oxigênio, como o superóxido. O óxido nítrico reage com o superóxido formando peroxinitrito que, por sua vez, modifica as tirosinas em proteínas formando as nitrotirosinas⁷⁶. O peroxinitrito é capaz de oxidar as LDL⁷⁷ tornando-as capazes de serem fagocitadas pelos macrófagos no início da aterogênese.

Em nossos grupos experimentais pudemos observar que os animais DKO apresentavam uma menor presença de nitrotirosina que os animais LDLr KO. Considerando-se que não mostramos aumento na geração de

superóxido, podemos postular que isso ocorreu devido a uma maior reação do superóxido com NO produzido em excesso por um aumento da expressão de NOS2. Nos animais DKO, uma menor expressão de iNOS causou uma menor formação de peroxinitrito e conseqüentemente, de nitrotirosina.

Em resumo, podemos concluir que a ausência de sinalização pelo receptor TLR4 induz uma menor expressão de NOS2, uma provável diminuição da geração de superóxido, com conseqüente menor formação de peroxinitrito na parede vascular, quando comparado aos animais deficientes somente em LDLr.

6.6 Inflamação

Há um consenso de que a inflamação é crucial para formação e desenvolvimento da placa aterosclerótica. As lesões ateroscleróticas instáveis contêm macrófagos ativados e células T, moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas, enzimas degradadoras de matriz e fatores protrombóticos^{78,79}. Também foi demonstrado que, em placas estáveis, há menos infiltrado inflamatório do que nas placas instáveis^{78,80} destacando a importância da inflamação na progressão da lesão aterosclerótica.

Para determinarmos a extensão na qual a ausência do receptor TLR4 influencia o processo inflamatório na parede vascular, utilizamos inicialmente o CD40L como um marcador.

A via de sinalização CD40/CD40L foi descrita como fundamental em todo o processo da aterogênese e importante na determinação da gordura

da placa, na sua estabilidade e ruptura⁸¹. Além disso, a expressão de CD40L correlaciona-se positivamente com outros sinais de instabilidade da placa.

Nosso grupo DKO apresentou menor expressão de CD40L em suas placas em relação ao grupo LDLrKO. A expressão de CD40L já foi descrita como sendo inversamente proporcional a deposição de colágeno²⁹, um fenômeno também encontrado em nossos grupos experimentais. Ainda não está claro como a falta do TLR4 pode interferir na expressão de CD40L. Em plaquetas, a ativação do TLR4 por LPS induziu a liberação de sCD40L⁸², entretanto este fenômeno ainda não foi descrito para células da placa aterosclerótica.

Todos os receptores toll-like ativam uma via de sinalização em comum que termina na ativação do fator de transcrição nuclear – κ B (NF- κ B), assim como as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), quinase regulada por sinal extracelular (ERK), p38 e quinase c-Jun N-terminal (JNK)⁸³ mostrando o seu potencial em promover a resposta inflamatória. Entretanto, a falta de um TLR4 funcionante, pode ser responsável por um sinal defeituoso tanto no interior das células do sistema imune quanto também nas células da parede vascular. O comprometimento dessa via de sinalização pode levar a menos inflamação na parede vascular e a formação de placas menores e mais estáveis.

Os macrófagos ativados pelo estímulo do LPS aumentam a produção de collagenase⁸⁴, dando suporte a hipótese de que os macrófagos do nosso

grupo DKO, sendo incapazes de serem ativados pelo TLR4, eram, então, menos propensos a secretar metaloproteinases. Como resultado dessa deficiência na sinalização, haveria mais colágeno e uma placa com fenótipo mais estável. Nós testamos e confirmamos essa hipótese. Nosso grupo LDLrKO apresentou uma marcação maior para MMP9, uma metaloproteinase que aumenta a degradação de elastina deixando a placa mais suscetível a ruptura⁸⁵.

Além disso, a ativação do TLR4 pelo LPS também induz a produção de MCP-1⁸⁶ uma quimiocina essencial para o recrutamento de macrófagos para o endotélio⁸⁷ e expressão aumentada dos genes da IL-6, IL-8 e VCAM-1⁸⁸. A ausência desses mediadores inflamatórios em nosso grupo DKO, pode explicar, pelo menos parcialmente, porque nosso grupo DKO apresentou placas menores do que as do grupo LDLrKO já que essas citocinas e moléculas de adesão estão envolvidas na iniciação, pela ativação endotelial e adesão leucocitária, do processo aterosclerótico⁸⁹.

É necessário ressaltar que esses autores sempre descreveram o LPS como o ligante do TLR4. Nós não tivemos qualquer evidência de que nossos animais entraram em contato com LPS em quantidades biologicamente relevantes. Portanto, é necessário propor que o TLR4 teve uma ativação endógena contínua que manteve a via de sinalização inflamatória continuamente ativada. O TLR4 tem um amplo espectro de agonistas de origem não microbiana como a proteína de choque térmico 60 (HSP-60), a fibronectina, o taxol, a proteína de cobertura do vírus sincicial respiratório e ácidos graxos saturados⁹⁰. Além disso, nossa dieta contém

12% de óleo de coco que é uma fonte rica de ácido laurico⁹¹ que também é capaz de ativar o TLR4⁹⁰. Portanto, podemos supor que o TLR4 foi continuamente ativado por qualquer uma dessas moléculas endógenas ou exógenas administradas juntamente com a dieta, mantendo os eventos inflamatórios durante a progressão da lesão aterosclerótica.

Assim, a diminuição do processo inflamatório em camundongos deficientes em TLR4 foi demonstrada por uma menor expressão de NOS2, CD40L e de MMP9 na parede vascular e na placa aterosclerótica, quando comparado aos animais LDLr KO.

6.7 Considerações finais

Através dos dados apresentados nesse estudo, podemos concluir que a deficiência do receptor TLR4 em um modelo experimental de aterosclerose induz à formação de placas ateroscleróticas menores e mais estáveis.

Quando analisamos os mecanismos responsáveis por esses achados, nos deparamos com inúmeras surpresas.

Um menor processo inflamatório e menor distúrbio da sinalização redox nesses animais eram até esperados, já que eliminamos uma via pró-inflamatória, capaz de desencadear a produção de ROS.

Curiosamente, observamos que a deficiência do TLR4 acarretou também, modificações no metabolismo lipídico, com menor concentração de triglicérides circulantes e aumento de HDL. Esses dados abrem algumas perspectivas interessantes que merecerão investigação futura.

Um outro ponto importante é o fato do TLR4 influenciar diversos mecanismos envolvidos na aterogênese. Assim, se conseguirmos manipular

a atividade do TLR4 de tal maneira que efeitos indesejáveis de imunossupressão não ocorram, poderemos estar diante de uma alternativa terapêutica muito interessante para a aterosclerose, pois seria uma terapia que agiria nos fatores de risco (lípidos), nos mecanismos fisiopatológicos (sinalização redox e inflamação), tendo como consequência um paciente que desenvolveria placas menores e mais estáveis. Embora ainda muito distante, essa alternativa merece atenção e estudo aprofundado.

7 CONCLUSÕES

1. A deficiência no receptor toll-like 4 reduziu o tamanho e a quantidade de gordura na placa aterosclerótica em camundongos deficientes para o receptor de LDL após dieta rica em gordura e colesterol independente de colesterolemia.
2. A deficiência no receptor toll-like 4 levou a formação de placa aterosclerótica com fenótipo mais estável com maior quantidade de colágeno ao redor do núcleo lipídico.
3. A deficiência no receptor toll-like 4 interferiu no metabolismo lipídico, diminuindo a concentração sérica de triglicérides.
4. A deficiência no receptor toll-like 4 levou a um menor distúrbio na sinalização redox na placa aterosclerótica.
5. A deficiência no receptor toll-like 4 levou a uma menor inflamação durante a formação da placa aterosclerótica.

8 REFERÊNCIAS

1. Libby P, Ridker PM, Maseri A Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105:1135-1143
2. Ross R The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362:801-809
3. Cusack M, Redwood S, Coltart J Recent advances in ischaemic heart disease. *Postgrad Med J* 2000; 76:542-546
4. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987; 316:1371-1375
5. von Birgelen C, Mintz GS, de Vrey EA, Serruys PW, Kimura T, Nobuyoshi M, Popma JJ, Leon MB, Erbel R, *et al.* Preintervention lesion remodelling affects operative mechanisms of balloon optimised directional coronary atherectomy procedures: a volumetric study with three dimensional intravascular ultrasound. *Heart* 2000; 83:192-197
6. Rader DJ Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest* 2006; 116:3090-3100
7. Coleman R, Hayek T, Keidar S, Aviram M A mouse model for human atherosclerosis: long-term histopathological study of lesion development in the aortic arch of apolipoprotein E-deficient (E0) mice. *Acta Histochem* 2006; 108:415-424
8. Veniant MM, Sullivan MA, Kim SK, Ambroziak P, Chu A, Wilson MD, Hellerstein MK, Rudel LL, Walzem RL, *et al.* Defining the atherogenicity of large and small lipoproteins containing apolipoprotein B100. *J Clin Invest* 2000; 106:1501-1510
9. Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 1999; 274:32048-32054
10. Hiltunen TP, Yla-Herttuala S Expression of lipoprotein receptors in atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 1998; 137 Suppl:S81-88
11. Ikonen E Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. *Physiol Rev* 2006; 86:1237-1261
12. Rader DJ, Daugherty A Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* 2008; 451:904-913

13. Cazita PM. A expressão do gene humano da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) em camundongos atenua o desenvolvimento de aterosclerose experimental após ovariectomia. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. 2002.
14. Steinberg D Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy: part II: the early evidence linking hypercholesterolemia to coronary disease in humans. *J Lipid Res* 2005; 46:179-190
15. Watanabe H, Yamane K, Fujikawa R, Okubo M, Egusa G, Kohno N Westernization of lifestyle markedly increases carotid intima-media wall thickness (IMT) in Japanese people. *Atherosclerosis* 2003; 166:67-72
16. Augusto O (2006) Radicais Livres bons, maus e naturais. Oficina de textos, São Paulo.
17. Stokes KY, Clanton EC, Russell JM, Ross CR, Granger DN NAD(P)H oxidase-derived superoxide mediates hypercholesterolemia-induced leukocyte-endothelial cell adhesion. *Circ Res* 2001; 88:499-505
18. Droge W Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82:47-95
19. Souza HP, Laurindo FR, Ziegelstein RC, Berlowitz CO, Zweier JL Vascular NAD(P)H oxidase is distinct from the phagocytic enzyme and modulates vascular reactivity control. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H658-667
20. Cai H, Harrison DG Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87:840-844
21. Marletta MA Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993; 268:12231-12234
22. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142
23. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:29-38
24. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002; 105:1656-1662

25. Yoon Y, Song J, Hong SH, Kim JQ Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clin Chem* 2000; 46:1626-1630
26. Wever R, Stroes E, Rabelink TJ Nitric oxide and hypercholesterolemia: a matter of oxidation and reduction? *Atherosclerosis* 1998; 137 Suppl:S51-60
27. Phipps RP Atherosclerosis: the emerging role of inflammation and the CD40-CD40 ligand system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:6930-6932
28. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* 1998; 394:200-203
29. Lutgens E, Daemen MJ CD40-CD40L interactions in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12:27-32
30. Kiener PA, Moran-Davis P, Rankin BM, Wahl AF, Aruffo A, Hollenbaugh D Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J Immunol* 1995; 155:4917-4925
31. Jawien J New insights into immunological aspects of atherosclerosis. *Pol Arch Med Wewn* 2008; 118:127-131
32. Vats D, Mukundan L, Odegaard JI, Zhang L, Smith KL, Morel CR, Wagner RA, Greaves DR, Murray PJ, *et al.* Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab* 2006; 4:13-24
33. Kirii H, Niwa T, Yamada Y, Wada H, Saito K, Iwakura Y, Asano M, Moriwaki H, Seishima M Lack of interleukin-1 β decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:656-660
34. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Libby P Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 748:501-507
35. Branen L, Hovgaard L, Nitulescu M, Bengtsson E, Nilsson J, Jovinge S Inhibition of tumor necrosis factor- α reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:2137-2142

-
36. Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:2364-2367
 37. Song L, Schindler C IL-6 and the acute phase response in murine atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2004; 177:43-51
 38. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:446-458
 39. Kiechl S, Wiedermann CJ, Willeit J Toll-like receptor 4 and atherogenesis. *Ann Med* 2003; 35:164-171
 40. Zhang SY, Jouanguy E, Sancho-Shimizu V, von Bernuth H, Yang K, Abel L, Picard C, Puel A, Casanova JL Human Toll-like receptor-dependent induction of interferons in protective immunity to viruses. *Immunol Rev* 2007; 220:225-236
 41. Lien E, Ingalls RR Toll-like receptors. *Crit Care Med* 2002; 30:S1-S11
 42. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* 2002; 105:1158-1161
 43. Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, Luthringer D, Xu XP, Rajavashisth TB, *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; 104:3103-3108
 44. Vink A, Schoneveld AH, van der Meer JJ, van Middelaar BJ, Sluijter JP, Smeets MB, Quax PH, Lim SK, Borst C, *et al.* In vivo evidence for a role of toll-like receptor 4 in the development of intimal lesions. *Circulation* 2002; 106:1985-1990
 45. Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, Doherty TM, Akira S, Rajavashisth TB, Arditi M Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:10679-10684
 46. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123:1939-1951

-
47. Sparrow CP, Parthasarathy S, Steinberg D A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1989; 264:2599-2604
 48. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955; 34:1345-1353
 49. Gidlund, Damasceno NR, Lindoso JA, Abdalla DS, Goto H Monoclonal antibodies against low density lipoprotein with various degrees of oxidative modifications. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29:1625-1628
 50. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 1987; 68:231-240
 51. Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyft JG, Clift SM Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature* 1991; 353:265-267
 52. Johns C, Gavras I, Handy DE, Salomao A, Gavras H Models of experimental hypertension in mice. *Hypertension* 1996; 28:1064-1069
 53. Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol* 2006; 1:297-329
 54. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:133-140
 55. Veniant MM, Withycombe S, Young SG Lipoprotein size and atherosclerosis susceptibility in Apoe(-/-) and Ldlr(-/-) mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1567-1570
 56. Tangirala RK, Rubin EM, Palinski W Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res* 1995; 36:2320-2328
 57. Virmani R, Burke AP, Kolodgie FD, Farb A Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *J Interv Cardiol* 2002; 15:439-446
 58. Bjorkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, Koehn S, Ordija CM, Lee MA, Means T, Halmen K, Luster AD, *et al.* Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med* 2004; 10:416-421

-
59. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002; 347:185-192
 60. Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, Sukhova GK, Lee RT Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7:330-335
 61. van der Wal AC, Becker AE Atherosclerotic plaque rupture--pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovasc Res* 1999; 41:334-344
 62. Williams H, Johnson JL, Carson KG, Jackson CL Characteristics of intact and ruptured atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries of apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:788-792
 63. Otway S, Robinson DS The use of a non-ionic detergent (Triton WR 1339) to determine rates of triglyceride entry into the circulation of the rat under different physiological conditions. *J Physiol* 1967; 190:321-332
 64. Sprecher DL Lipids, lipoproteins, and peroxisome proliferator activated receptor-delta. *Am J Cardiol* 2007; 100:n20-24
 65. Santamarina-Fojo S, Gonzalez-Navarro H, Freeman L, Wagner E, Nong Z Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1750-1754
 66. Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, Vahabzadeh K, Hama S, Hough G, *et al.* The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res* 2004; 45:993-1007
 67. Remer KA, Brcic M, Jungi TW Toll-like receptor-4 is involved in eliciting an LPS-induced oxidative burst in neutrophils. *Immunol Lett* 2003; 85:75-80
 68. Brandes RP, Koddenberg G, Gwinner W, Kim D, Kruse HJ, Busse R, Mugge A Role of increased production of superoxide anions by NAD(P)H oxidase and xanthine oxidase in prolonged endotoxemia. *Hypertension* 1999; 33:1243-1249
 69. Krieger MH, Santos KF, Shishido SM, Wanschel AC, Estrela HF, Santos L, De Oliveira MG, Franchini KG, Spadari-Bratfisch RC, *et al.* Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide* 2006; 14:12-20

-
70. Fernandes DC, Wosniak J, Jr., Pescatore LA, Bertoline MA, Liberman M, Laurindo FR, Santos CX Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292:C413-422
 71. Mertens A, Holvoet P Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *Faseb J* 2001; 15:2073-2084
 72. Uno K, Kato K, Atsumi T, Suzuki T, Yoshitake J, Morita H, Ohara S, Kotake Y, Shimosegawa T, *et al.* Toll-like receptor (TLR) 2 induced through TLR4 signaling initiated by *Helicobacter pylori* cooperatively amplifies iNOS induction in gastric epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293:G1004-1012
 73. Lee JY, Lowell CA, Lemay DG, Youn HS, Rhee SH, Sohn KH, Jang B, Ye J, Chung JH, *et al.* The regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase by Src-family tyrosine kinases mediated through MyD88-independent signaling pathways of Toll-like receptor 4. *Biochem Pharmacol* 2005; 70:1231-1240
 74. Kuhlencordt PJ, Chen J, Han F, Astern J, Huang PL Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 2001; 103:3099-3104
 75. Detmers PA, Hernandez M, Mudgett J, Hassing H, Burton C, Mundt S, Chun S, Fletcher D, Card DJ, *et al.* Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Immunol* 2000; 165:3430-3435
 76. Beckman JS, Koppenol WH Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271:C1424-1437
 77. Lai HH, Yen GC Inhibitory effect of isoflavones on peroxynitrite-mediated low-density lipoprotein oxidation. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; 66:22-28
 78. Becker AE, de Boer OJ, van Der Wal AC The role of inflammation and infection in coronary artery disease. *Annu Rev Med* 2001; 52:289-297
 79. Mehta JL, Romeo F Inflammation, infection and atherosclerosis: do antibacterials have a role in the therapy of coronary artery disease? *Drugs* 2000; 59:159-170
 80. Mauriello A, Sangiorgi G, Fratoni S, Palmieri G, Bonanno E, Anemona L, Schwartz RS, Spagnoli LG Diffuse and active inflammation occurs in both vulnerable and stable plaques of the entire coronary tree: a

- histopathologic study of patients dying of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45:1585-1593
81. Libby P, Schoenbeck U, Mach F, Selwyn AP, Ganz P Current concepts in cardiovascular pathology: the role of LDL cholesterol in plaque rupture and stabilization. *Am J Med* 1998; 104:14S-18S
 82. Cognasse F, Lafarge S, Chavarin P, Acquart S, Garraud O Lipopolysaccharide induces sCD40L release through human platelets TLR4, but not TLR2 and TLR9. *Intensive Care Med* 2007; 33:382-384
 83. Barton GM, Medzhitov R Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 2003; 300:1524-1525
 84. Cury JD, Campbell EJ, Lazarus CJ, Albin RJ, Welgus HG Selective up-regulation of human alveolar macrophage collagenase production by lipopolysaccharide and comparison to collagenase production by fibroblasts. *J Immunol* 1988; 141:4306-4312
 85. Gough PJ, Gomez IG, Wille PT, Raines EW Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 2006; 116:59-69
 86. Ghosh TK, Mickelson DJ, Fink J, Solberg JC, Inglefield JR, Hook D, Gupta SK, Gibson S, Alkan SS Toll-like receptor (TLR) 2-9 agonists-induced cytokines and chemokines: I. Comparison with T cell receptor-induced responses. *Cell Immunol* 2006; 243:48-57
 87. Tiwari RL, Singh V, Barthwal MK Macrophages: An elusive yet emerging therapeutic target of atherosclerosis. *Med Res Rev* 2008; 28:483-544
 88. Sawa Y, Ueki T, Hata M, Kana I, Tsuruga E, Kojima H, Ishikawa H, Yoshida S LPS-induced IL-6, IL-8, VCAM-1, and ICAM-1 Expression in Human Lymphatic Endothelium. *J Histochem Cytochem.* 2007.
 89. Tsirpanlis G Is inflammation the link between atherosclerosis and vascular calcification in chronic kidney disease? *Blood Purif* 2007; 25:179-182
 90. Lee JY, Plakidas A, Lee WH, Heikkinen A, Chanmugam P, Bray G, Hwang DH Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 2003; 44:479-486
 91. de Roos N, Schouten E, Katan M Consumption of a solid fat rich in lauric acid results in a more favorable serum lipid profile in healthy men and women than consumption of a solid fat rich in trans-fatty acids. *J Nutr* 2001; 131:242-245