

CAPÍTULO 18

INOVAÇÕES NO TRATAMENTO DA ATEROSCLEROSE FOCADAS NA INFLAMAÇÃO

Nikolas Alexandro Martins Moreira Bastos

RESUMO

A aterosclerose é uma condição cardiovascular complexa, caracterizada pela formação de placas nas artérias, resultando em inflamação crônica e disfunção endotelial. Nos últimos anos, novos insights têm surgido sobre o papel da inflamação como alvo terapêutico na aterosclerose. A inflamação não é apenas um marcador da doença, mas também um componente central na sua patogênese. Estudos demonstram que mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, desempenham um papel importante na progressão da aterosclerose, influenciando a formação e a estabilidade das placas. Pesquisas têm identificado células imunes, como macrófagos e linfócitos T, como componentes principais na resposta inflamatória da aterosclerose. Sua ativação contribui para a formação de um microambiente inflamatório, que promove a instabilidade da placa. Além disso, a identificação de biomarcadores inflamatórios tem se mostrado promissora para a estratificação do risco cardiovascular e a monitorização da resposta ao tratamento. As intervenções terapêuticas focadas na modulação da inflamação, incluindo o uso de anti-inflamatórios, têm mostrado resultados encorajadores em ensaios clínicos. Por exemplo, o uso de inibidores da interleucina-1 β demonstrou reduzir eventos cardiovasculares em pacientes com risco elevado. Essas descobertas sugerem que a abordagem da aterosclerose deve ir além da redução dos níveis de lipídios, incorporando estratégias que visem a inflamação. A pesquisa em novas terapias biológicas e medicamentos direcionados à inflamação está em expansão, oferecendo esperança para tratamentos mais eficazes. A compreensão dos mecanismos subjacentes à inflamação na aterosclerose pode não apenas melhorar o manejo da doença, mas também criar novas oportunidades para a prevenção de complicações cardiovasculares. A inflamação, portanto, representa um alvo terapêutico promissor na aterosclerose, com o potencial de transformar a abordagem clínica e melhorar os resultados para os pacientes.

Palavras-chave: Aterosclerose. Inflamação. Células Imunes. Intervenções terapêuticas. Biomarcadores.

1. INTRODUÇÃO

A aterosclerose e as doenças cardiovasculares (DCV) subsequentes são as principais causas de morte em todo o mundo. Por muito tempo, a aterosclerose foi considerada uma doença predominantemente induzida por lipídios, que é caracterizada como deposição de lipídios na parede arterial. Assim, as terapias anteriores deveriam se concentrar na prevenção de fatores de risco, como hiperlipidemia, hipertensão, etc. No entanto, o risco de complicações aterotrombóticas ainda permanece alto, causando milhões de mortes em todo o mundo a cada ano. Nas últimas duas décadas, o ponto de vista da aterosclerose foi substituído gradualmente por uma doença inflamatória crônica de baixo grau da parede arterial, induzida por lipídios¹.

Com o tempo, as estratégias anti-inflamatórias estão cada vez mais sendo consideradas uma estratégia atraente para reduzir, ainda mais, o risco residual de doença cardiovascular aterosclerótica (ASCVD)^{2,3}. Sabe-se que as estatinas são os medicamentos terapêuticos mais eficientes, reduzindo os níveis de lipoproteínas aterogênicas e prevenindo grandes eventos cardiovasculares. Além disso, as estatinas também têm efeitos anti-inflamatórios independentes da redução do LDL, o que pode contribuir para o tratamento da aterogênese e de outras doenças cardiovasculares^{4,5}. No entanto, o tratamento direcionado à natureza inflamatória da aterosclerose ainda é muito limitado e merece mais atenção para combatê-la com sucesso⁶.

2. PROCESSO PATOLÓGICO DA ATEROSCLEROSE

2.1 Teoria dos lipídios e aterosclerose

O termo aterosclerose deriva das palavras gregas ‘atheroma’ que significam “macio ou semelhante a mingau” para descrever a aparência da íntima das artérias. A teoria lipídica da aterosclerose predominou como um fator de risco importante e impulsionou a maioria das abordagens terapêuticas. O acúmulo de lipídios em locais de fluxos não laminares é hoje o mais caracterizado. Resumidamente, a lipoproteína de baixa densidade (LDL) é modificada pela oxidação como uma consequência metabólica normal. Os lipídios oxidados estão entre os primeiros fatores iniciadores do desenvolvimento da aterosclerose. Em seguida, a lesão aterosclerótica começa com a entrada do colesterol LDL na íntima vascular⁷.

Posteriormente, o LDL acumulado é oxidado e a oxidação do colesterol LDL leva à expressão de moléculas de adesão e quimiotáticas. Então, os monócitos sanguíneos e vários tipos de leucócitos aderem ao endotélio e absorvem o LDL oxidado (oxLDL), levando à formação de células espumosas carregadas de colesterol e placas ateroscleróticas. As atividades subsequentes, incluindo sinalização celular, recrutamento celular, produção de enzimas e modificação de proteínas, desencadeiam uma onda de atividade que serve para progredir ainda mais no desenvolvimento da placa aterosclerótica^{8,9}.

Muitas abordagens terapêuticas foram testadas para tratar a aterosclerose e prevenir suas complicações. No entanto, o risco de complicações aterotrombóticas ainda permanece alto. A pesquisa de Ramsden et al¹⁰ relatou que a substituição de gordura saturada na dieta de ácido linoleico reduz efetivamente o colesterol sérico, mas não apoia a hipótese de que isso se traduz em um menor risco de morte por doença cardíaca coronária ou todas as causas. Pesquisas extensas destacaram novos alvos terapêuticos promissores, cada um sendo implicado em diferentes estágios da formação e progressão da placa aterosclerótica.

2.2 O papel da inflamação na aterosclerose

Nas últimas três décadas, dados crescentes passaram a sugerir que a aterosclerose é uma doença inflamatória^{11,12} e o sistema imunológico e inflamatório foi gradualmente sendo reconhecido por papel fundamental no desenvolvimento e progressão da aterosclerose^{13,14}. A aterosclerose é caracterizada pelo acúmulo de monócitos/macrófagos, células musculares lisas e linfócitos dentro da parede arterial. A captação de lipídios por monócitos/macrófagos promove sua diferenciação em grandes células espumosas carregadas de lipídios na parede do vaso. O acúmulo de células inflamatórias leva à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas¹⁵.

Por isso, a visão anterior de que o desenvolvimento da lesão aterosclerótica depende unicamente da deposição de lipídios foi substituída pelo conceito atual de que a ativação de respostas imunes e inflamatórias tem um papel central na iniciação e progressão da placa. Muitas estratégias anti-inflamatórias surgiram como tratamentos potenciais para doenças ateroscleróticas, além das terapias existentes de redução de lipídios¹⁵.

2.2.1 O papel do sistema imunológico inato na aterosclerose

Evidências crescentes apoiam o papel importante dos sistemas imunológicos inatos na formação de lesões^{6,16}. Monócitos e macrófagos são efetores celulares importantes na aterosclerose. Monócitos inflamatórios são recrutados para placas ateroscleróticas por meio dos receptores de quimiocina CCR2, CCR5 e CX3CR1 e seus ligantes¹⁷. Monócitos residentes também são recrutados para o ateroma via CCR5, com menos frequência do que monócitos inflamatórios¹⁸. Esse acúmulo resulta na formação da placa aterosclerótica¹⁹.

Monócitos e células endoteliais não são as únicas células que participam da formação de lesões. Na fase aguda após um evento isquêmico, os tecidos hematopoiéticos da medula óssea e do baço são capazes de expandir o conjunto de monócitos pró-inflamatórios que agravam a aterosclerose²⁰. Em seguida, os monócitos circulantes são expostos a um sinal típico de perigo aterosclerótico oxLDL e obtêm um estado hiperresponsivo treinado. Essas descobertas indicam que as células imunes inatas circulantes podem ser programadas para um estado pró-aterogênico²¹.

Então, os monócitos são continuamente recrutados para placas ateroscleróticas. O número de monócitos se correlaciona com a carga da placa e a inibição do influxo de monócitos pode resultar em uma diminuição na aterosclerose²²⁻²⁴. Em placas mais avançadas, os macrófagos da placa podem proliferar localmente, levando à abundância de macrófagos. A progressão das placas ateroscleróticas é impulsionada por um desequilíbrio entre a formação e a depuração de macrófagos apoptóticos, um fenômeno descrito como eferocitose defeituosa. As descobertas sobre o papel da imunidade inata na aterosclerose podem fornecer alguns novos alvos terapêuticos potenciais²⁵.

2.2.2 O papel do sistema imunológico adaptativo na aterosclerose

O sistema imunológico adaptativo também pode desempenhar um papel fundamental por meio de respostas de anticorpos ou respostas imunológicas mediadas por células. Os principais componentes do sistema imunológico adaptativo são células T, células B e células apresentadoras de antígenos (APCs). Outras células inflamatórias, mastócitos e diferentes subconjuntos de células dendríticas (CDs), também contribuem para a formação de lesões por meio do reconhecimento de antígenos e da produção de citocinas²⁶.

Nas respostas de anticorpos, as células B ativadas secretam anticorpos para bloquear a interação de antígenos especiais com seu receptor na célula hospedeira. As células B podem aparecer individualmente ou agregadas em placas ateroscleróticas²⁷. As células B são divididas em subconjuntos B1 e B2. Enquanto as células B1 produzem anticorpos IgM e são protetoras contra a aterosclerose, as células B2 produzem anticorpos IgG altamente específicos e promovem a aterosclerose^{28,29}.

As células B1 têm três subtipos diferentes, B1a, B1b e ativador de resposta inata. As células B1a produzem os anticorpos IgM, que são ateroprotetores. O papel das células B1b na aterosclerose permanece desconhecido^{30,31}. As células B2 têm dois subtipos. As células B2 convencionais desempenham um papel pró-aterogênico, ao participarem da ativação das células T CD4 e da proliferação de células T efetoras³¹. As células B reguladoras (Bregs), por sua vez, secretam IL-10 e podem desempenhar um papel ateroprotetor. As células B podem ser um alvo terapêutico potencial e podem ser usadas por meio das células B2 em estratégias de vacinação contra a aterosclerose³².

Nas respostas imunes mediadas por células, as células T ativadas respondem diretamente aos antígenos apresentados nas APCs e secretam moléculas sinalizadoras. As células T são encontradas em lesões ateroscleróticas e desempenham um papel fundamental na progressão da aterosclerose³³. Elas têm a capacidade de se diferenciar de diferentes subtipos de células T auxiliares, como Th1, Th2, Th17 e Treg. Os efeitos das células Th1 são claramente pró-aterogênicos, enquanto as células Treg são ateroprotetoras. As células Th2 presentes na lesão aterosclerótica

desempenham papéis ateroprotetores e promotores de aterosclerose, pois um alvo para o tratamento da aterosclerose permanece controverso. O papel das células Th17 na aterosclerose ainda não está claro. Portanto, interferir na sinalização de citocinas ou quimiocinas das células Th é uma abordagem emergente para o desenvolvimento do tratamento da condição³⁴.

Além disso, múltiplos estímulos antigênicos têm sido associados à patogênese da aterosclerose. A maioria deles vem de moléculas de autoantígeno modificadas, como oxLDLs, beta2 glicoproteína 1 (β 2GP1), lipoproteína a (LP(a)), proteínas de choque térmico (HSPs). Vários antígenos estranhos, como bactérias e vírus, também têm sido associados à aterosclerose, especialmente na aterogênese, como participantes causadores ou espectadores em seu desenvolvimento^{19,35}.

A família NLR, domínio de pirina contendo 3 (NLRP3) inflamossomo é um complexo de processamento de interleucina (IL)-1 β e citocina IL-18, ativado em condições inflamatórias³⁵. Estudos sugeriram que os componentes da via de sinalização do inflamossomo NLRP3 NLRP3, caspase-1, IL-1 β e IL-18 foram fortemente expressos em placas ateroscleróticas carotídeas e o inflamossomo NLRP3 desempenha um papel importante no desenvolvimento de inflamação vascular e aterosclerose^{36,37}.

2.2.3 Efeito da inflamação mediada por receptores toll like na aterosclerose

Os receptores toll like (TLRs) são os receptores de reconhecimento de padrões mais bem caracterizados do sistema imunológico inato e desempenham um papel central nas respostas imunológicas inatas e adaptativas. Os TLRs representam um elo importante entre o ateroma e a inflamação. Todas as populações de leucócitos, incluindo monócitos/macrófagos, CD4 e linfócitos T e B, parecem expressar TLRs^{38,39}.

Nos últimos anos, evidências crescentes indicam que os TLRs e seus ligantes desempenham papéis importantes em vários aspectos da formação e desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. Ligantes TLR exógenos e endógenos foram detectados em lesões ateroscleróticas. Ácidos graxos saturados induzem expressão gênica inflamatória por meio da ativação de TLR4. ApoCIII pode induzir sinais pró-inflamatórios em monócitos por TLR2⁴⁰⁻⁴³. LDLs minimamente modificados induzem ativação de TLR4 em macrófagos, por meio da via dependente de MyD88 ou da via independente de MyD88, e oxLDL aumentou a expressão gênica de quimiocina em macrófagos por meio de um heterodímero TLR4/6^{44,45}.

TLR 2 e TLR4 são os TLRs mais extensivamente estudados na aterosclerose. TLR2 desempenha um papel crítico na progressão da aterosclerose em camundongos Apo E $-/-$. O bloqueio de TLR2 é eficaz contra a ativação e amortecimento de lesões ateroscleróticas humanas e na redução da área de infarto do miocárdio em modelos murinos de isquemia aguda⁴⁶. Camundongos ApoE $-/-$ com aterosclerose avançada também apresentam expressão aumentada de TLR2 e TLR4 em células circulantes⁴⁷.

Como a deleção genética de TLR2 e TLR4 é ateroprotetora em modelos murinos de aterosclerose, o antagonismo desses receptores é uma perspectiva atraente para o tratamento da aterosclerose^{48,49}.

Portanto, os TLRs são capazes de detectar lipídios modificados, aumentar a formação de células espumosas, induzir o recrutamento de leucócitos e aumentar a produção de citocinas e metaloproteínas de matriz dentro de lesões ateroscleróticas. Os TLRs e seus ligantes estão presentes e contribuem para a formação de lesões ateroscleróticas, o que fornece um alvo terapêutico atraente para o tratamento de doenças⁴⁸.

3. ALÉM DAS ESTATINAS

Com o tempo, a mudança de risco com terapia com estatina é agora uma prática comum na prevenção primária e secundária de DCV aterosclerótica. As estatinas demonstraram anteriormente exibir efeitos anti-inflamatórios, além de reduzir os níveis de lipídios. Os ensaios que tentam quantificar a carga inflamatória geral geralmente utilizam proteína C-reativa de alta sensibilidade (hsCRP), pois é um teste cada vez mais disponível e econômico que captura a maior parte da atividade inflamatória a montante. O efeito anti-inflamatório das estatinas foi testado formalmente no ensaio Justification for the Use of Statins in Prevention: An Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER)⁴⁹.

Neste estudo, os participantes com níveis de LDL-C <3,4 mmol/L e hsCRP elevado >2 mg/L foram randomizados para receber 20 mg/dia de rosuvastatina ou placebo. Dos 17.803 indivíduos aparentemente saudáveis recrutados, aqueles tratados com rosuvastatina tiveram uma redução de risco de 44% nos primeiros eventos cardiovasculares em comparação ao grupo placebo. Relevante para a hipótese de inflamação da aterosclerose, a rosuvastatina demonstrou reduzir os níveis de hsCRP em 47% de uma mediana de 4,2 mg/L na linha de base para 2,2 mg/L no acompanhamento de 12 meses⁴⁹.

Parece que os pacientes que recebem terapia padrão com estatinas como parte da prevenção secundária podem obter algum grau de cobertura anti-inflamatória. Apesar disso, os eventos ateroscleróticos continuam a ocorrer em taxas alarmantes, e acredita-se que o risco inflamatório residual pode ser uma força motriz por trás disso. A análise do estudo Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy (PROVE-IT) mostrou que dos 2099 pacientes que tinham histórico de síndrome coronária aguda anterior e receberam 80 mg de atorvastatina, 44% atingiram reduções na meta tanto no LDL-C (<1,8 mmol/L) quanto na hsCRP (<2 mg/L)^{50,51}.

No entanto, 29%, 13% e 14% dos pacientes ficaram com risco inflamatório residual subótimo, risco de colesterol residual ou ambos, respectivamente. Esses resultados sugerem que eventos coronários recorrentes podem ser motivados por diferentes processos biológicos que exigem diferentes estratégias de tratamento para serem abordados. Utilizando os mesmos limiares para risco residual do PROVE-IT, proporções

relativas semelhantes foram identificadas em análises secundárias do estudo Improved Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy International (IMPROVE-IT)⁵².

Este estudo randomizou 15.179 pacientes estáveis com síndrome coronária aguda para 40 mg de sinvastatina ou uma combinação de 40 mg de sinvastatina e 10 mg de ezetimiba. Ezetimiba é um medicamento hipolipemiante de segunda linha, que reduz a absorção intestinal de colesterol e é usado como terapia complementar quando a resposta às estatinas é subótima ou em caso de intolerância à estatina. A consistência dos resultados desses estudos sugere que, apesar da estatina e de outras terapias hipolipemiantes, o risco inflamatório residual é comum e mais de duas vezes mais prevalente que o risco residual de colesterol⁵³.

Além disso, os resultados do IMPROVE-IT mostram que os pacientes que atingiram uma redução no risco inflamatório residual e no risco residual de colesterol tiveram taxas mais baixas do desfecho primário, definido como um composto de evento coronário grave, acidente vascular cerebral não fatal e morte cardiovascular, em comparação com aqueles que atingiram reduções em apenas um risco residual. Portanto, há uma necessidade clara de futuras terapias inovadoras para abordar a questão atualmente não atendida do risco inflamatório residual em pacientes com inflamação persistente após o tratamento padrão⁵².

4. TERAPIA ANTICITOCINA NA ATEROSCLEROSE

O papel das citocinas na aterosclerose é complexo, com novas descobertas aumentando a compreensão sobre sua função⁵⁴. As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, produzidas por vários tipos de células, que servem para mediar as respostas inflamatórias do hospedeiro entre as células. Desde a primeira descrição de interleucinas no início da década de 1940, a classificação de citocinas se expandiu, para incluir mais de 30 interleucinas, bem como se ramificou para adicionar outras famílias funcionais de citocinas, incluindo interferons, fatores de crescimento transformadores e fatores de necrose tumoral^{55,56}.

Dados humanos que implicam citocinas, no desenvolvimento e progressão da aterosclerose, remontam a estudos de coorte conduzidos há duas décadas, dos quais o Physicians Health Study⁵⁷ e o Women's Health Study⁵⁸, financiados pelo National Institutes of Health, são os mais proeminentes. Esses estudos descobriram que níveis elevados de citocinas circulantes, como IL-6, bem como moléculas de adesão elevadas, como VCAM-1 e ICAM-1, eram preditivos de infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral futuros em indivíduos aparentemente saudáveis⁵⁷⁻⁶⁰. Os resultados foram posteriormente validados, com uma meta-análise concluindo que outras citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-18, MPP-9 (metaloproteinase-9) e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) também estão associadas ao aumento do risco de MACE⁶¹.

A via de sinalização da IL-6 surgiu como uma candidata promissora para terapia baseada em citocinas, com estudos de randomização mendeliana implicando-a tanto na aterogênese quanto na ruptura aguda da placa⁶²⁻⁶⁴. A IL-6 é produzida por vários tipos de células, incluindo monócitos, fibroblastos e células endoteliais mediante estimulação pela IL-1. A IL-1 β , a principal forma circulante da IL-1, é, por sua vez, ativada pelo inflamossomo NLRP3 – domínio de pirina da família do receptor semelhante a NOD3⁶⁵.

Os inflamossomos são complexos multiméricos de proteínas intracelulares, que desempenham papéis críticos na produção de citocinas pró-inflamatórias. O inflamossomo NLRP3 é formado pela combinação de NLRP3, proteína semelhante a speck associada à apoptose (ASC) e caspase-1. Este complexo ativa a procaspase-1 para caspase-1, que converte pro-IL-1 β e pro-IL-18 em suas formas bioativas e pró-aterogênicas, IL-1 β e IL-18. Dados que ligam IL-1 β à aterosclerose decorrem de trabalhos iniciais que demonstraram que a falta de IL-1 β diminui a gravidade da aterosclerose e que a administração de um anticorpo monoclonal direcionado contra IL-1 β limita a progressão da aterosclerose em camundongos deficientes em ApoE⁶⁶. Resultados semelhantes foram relatados em estudos pré-clínicos envolvendo IL-18^{67,68}.

Ao contrário de outros marcadores de inflamação, a hsCRP é um marcador validado de inflamação que permanece estável ao longo do tempo, não tem variação diurna e captura grande parte da cascata inflamatória a montante, incluindo a via de sinalização IL-1/IL-6^{69,70}. Embora descrita, em 1930, como um componente da resposta inflamatória aguda, ela ganhou força entre os pesquisadores cardiovasculares na década de 1990, quando estudos mostraram que níveis elevados de hsCRP estavam associados a eventos coronários agudos, morte súbita por causa cardíaca e acidente vascular cerebral⁷¹⁻⁷⁵.

A análise de dados do Physician's Health Study mostrou que níveis elevados de hsCRP eram prevalentes entre indivíduos aparentemente saudáveis antes de seu primeiro evento cardiovascular. Este estudo também destacou o valor da avaliação do estado inflamatório em pacientes de risco, com análises ajustadas multivariadas, sugerindo que a hsCRP foi um preditor mais forte de um primeiro evento cardiovascular do que o nível de LDL-C⁷⁶.

A relação entre hsCRP e resultados cardiovasculares foi posteriormente apoiada por uma meta-análise, que envolveu mais de 160.000 indivíduos, de 54 estudos prospectivos de longo prazo, acumulando quase 28.000 resultados clínicos adversos. Isso mostrou que cada aumento do desvio padrão na hsCRP log-normalizada foi associado a um aumento no risco relativo de 1,37 para DAC e 1,55 para mortalidade cardiovascular, quando ajustado para fatores de risco tradicionais⁷⁷.

Considerando o contexto, as tentativas de reduzir a carga inflamatória foram naturalmente vistas como o próximo passo para reduzir ainda mais o risco cardiovascular na era das estatinas. Devido ao crescente corpo de dados epidemiológicos e experimentais nas últimas duas décadas,

implicando vias inflamatórias na aterosclerose, os estudos agora progrediram para ensaios clínicos investigando a eficácia de vários novos agentes anti-inflamatórios na prevenção de complicações ateroscleróticas⁶⁹⁻⁷⁷.

5. ENSAIOS EM HUMANOS E INIBIÇÃO DE CITOCINAS

Os primeiros ensaios clínicos, de terapias direcionadas a citocinas para DCV, foram conduzidos no contexto de insuficiência cardíaca congestiva, com a maioria dos grandes estudos falhando em demonstrar benefícios nas taxas de mortalidade ou hospitalização nesses pacientes. Esses estudos envolveram principalmente a inibição do TNF- α com etanercepte, um receptor chamariz que reduz os níveis circulantes de TNF- α , e infliximabe, um anticorpo monoclonal para TNF- α ⁷⁸. Dada a falta de benefícios em pacientes com insuficiência cardíaca, bem como o potencial dos inibidores de TNF- α afetarem adversamente os perfis lipídicos, o interesse em direcionar o TNF- α na DCV aterosclerótica tem sido limitado⁷⁹⁻⁸¹. Os ensaios mais bem-sucedidos, envolvendo terapia anticitocina para DCV aterosclerótica, têm como alvo a IL-1 β , a principal forma circulante de IL-1, com efeitos subsequentes a jusante na IL-6. O mais proeminente deles é o estudo Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcome Study (CANTOS)⁸².

5.1 Canacinumabe

O CANTOS⁸² foi um ensaio randomizado, duplo-cego, controlado por placebo de 10.061 pacientes com DAC estável, que sofreram um IM anterior e tiveram um estado inflamatório elevado, definido como hsCRP maior que 2 mg/L. Para abordar questões relacionadas ao risco inflamatório residual, apesar do tratamento padrão, mais de 90% dos participantes do estudo estavam em terapia com estatina, 80% foram tratados para hipertensão e 40% estavam em tratamento para diabetes mellitus. Os pacientes foram designados para quatro grupos que receberam três injeções subcutâneas mensais de canacinumabe, um anticorpo monoclonal humano direcionado à IL-1 β , em três doses diferentes (50 mg, 150 mg ou 300 mg) ou placebo.

O canacinumabe é aprovado para síndromes autoinflamatórias raras, como a síndrome de Muckle-Wells, e como um agente biológico de segunda linha para doenças reumatóides. As doses selecionadas para este ensaio foram baseadas em um estudo piloto envolvendo 566 pacientes de alto risco que tinham diabetes mellitus bem controlado e receberam doses variando de 5 mg a 150 mg. Embora nenhuma alteração nos níveis de LDL-C tenha sido observada neste estudo menor, o canacinumabe reduziu os níveis de hsCRP em aproximadamente 65% sem efeito claro de resposta à dose⁸³.

Portanto, as doses mais altas e mais baixas ancoradas em torno de 150 mg usadas no CANTOS foram selecionadas para abordar questões relacionadas à segurança e à resposta à dose. Após 48 meses, os participantes do estudo, que receberam 150 mg ou 300 mg de canacinumabe, tiveram reduções de 35% a 40% no hsCRP em comparação ao placebo, sem

reduções significativas no LDL-C. Uma magnitude semelhante de redução foi observada nos níveis de IL-6 medidos em 12 meses⁸².

O desfecho primário do estudo foi a primeira ocorrência de um MACE, que foi definido como um composto de IM, AVC não fatal ou morte cardiovascular. O canacinumabe reduziu significativamente esse desfecho para 3,86 eventos por 100 pessoas-ano no grupo de 150 mg, em comparação com 4,5 por 100 pessoas-ano no grupo placebo, traduzindo-se em uma redução de risco relativo de 15% para MACE. Embora uma redução de risco semelhante também tenha sido observada no grupo de dose de 300 mg, o valor de p limite para significância não foi atingido. Nenhum benefício significativo quando comparado ao placebo foi alcançado em participantes que receberam 50 mg, sugerindo que doses de pelo menos 150 mg são necessárias para proteção cardiovascular significativa⁸².

A análise de subgrupos de participantes do CANTOS mostrou que aqueles que atingiram níveis de hsCRP <2 mg/L em canacinumabe, denominados respondedores de citocina, tiveram uma redução de 25% em MACE, enquanto os não respondedores de citocina não tiveram benefício significativo. Da mesma forma, entre 4833 participantes que tiveram níveis de IL-6 medidos na linha de base, aqueles que atingiram níveis de tratamento abaixo da mediana do estudo de 1,65 ng/L tiveram uma redução impressionante de 32% em MACE⁸⁵.

O CANTOS, portanto, fornece evidências robustas de que a inibição de vias pró-inflamatórias, pelo menos na cascata de sinalização IL-1 β /IL-6, pode produzir redução significativa no risco cardiovascular, que é independente de qualquer efeito de redução de lipídios. Esse benefício se aplica a indivíduos que têm uma resposta clara de biomarcador inflamatório ao canacinumabe e é adicional ao uso de farmacoterapias convencionais para DAC⁸²⁻⁸⁵.

Uma consideração importante para todos os ensaios envolvendo novas terapias farmacológicas são os eventos adversos. Em relação aos agentes anti-inflamatórios, o principal efeito adverso previsto é a redução da imunidade do hospedeiro com subsequente aumento das taxas de infecção. No CANTOS, os pacientes que receberam canacinumabe tiveram uma incidência significativamente maior de infecção fatal e sepse em comparação ao placebo. A maioria dessas infecções foi devido a organismos gram-positivos em vez de infecções oportunistas ou reativação da tuberculose⁸².

Embora essas infecções possam ser tratadas com antibióticos, os resultados do CANTOS destacam a importância da vigilância clínica após a administração de qualquer agente anti-inflamatório. Outra preocupação dos agentes anti-inflamatórios tem o potencial para câncer, dado o papel que o sistema imunológico tem na vigilância do câncer. No CANTOS, nenhuma diferença significativa na incidência de câncer foi observada entre os pacientes que receberam canacinumabe, em comparação com aqueles que receberam placebo. Em vez disso, os pacientes que receberam canacinumabe tiveram uma taxa de mortalidade por câncer significativamente

menor do que o grupo placebo. Este benefício deveu-se a uma redução na taxa de câncer do pulmão, especificamente do câncer do pulmão de células maiores⁸⁶.

Dados os resultados positivos do CANTOS com canacinumabe, o interesse agora se voltou para a melhor forma de reduzir o risco inflamatório residual em pacientes com DAC aterosclerótica na prática. Um desafio enfrentado pelo uso do canacinumabe é que seu alto custo torna improvável que seja adotado para uso generalizado, dada a alta prevalência de DAC aterosclerótica. Dada a natureza multifacetada da inflamação em processos ateroscleróticos, uma estratégia alternativa atraente é a reutilização de medicamentos genéricos estabelecidos que têm amplas propriedades anti-inflamatórias para ateroproteção. Dois candidatos potenciais que foram investigados em ensaios clínicos são o metotrexato e a colchicina⁸²⁻⁸⁷.

5.2 Metotrexato e redução da inflamação cardiovascular

Em contraste com o CANTOS⁸², que empregou uma abordagem de espectro relativamente estreito e específica para a via de tratamento da inflamação, o Cardiovascular Inflammation Reduction Trial (CIRT)⁸⁷ teve como objetivo determinar se o metotrexato em baixa dosagem, um medicamento anti-inflamatório de amplo espectro, também poderia atingir reduções em eventos cardiovasculares.

O metotrexato é um medicamento estabelecido e com custo acessível, com atividade anti-inflamatória pleiotrópica, usado como terapia de primeira linha para condições caracterizadas por inflamação sistêmica, como artrite reumatoide e psoríase. Em contraste com o metotrexato em alta dosagem, que atua por meio de um mecanismo citotóxico antiproliferativo, o metotrexato em baixa dosagem regula a inflamação por meio da inibição do ribonucleotídeo aminoimidazol-4-carboximida (AICAR), o que resulta em níveis aumentados de adenosina. Considera-se que isso reduza a inflamação por meio de vários mecanismos, incluindo a supressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IL-6 e TNF- α , aumentando a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e antagonista do receptor de IL-1, e reduzindo a ativação de macrófagos e a resposta do T-helper-1^{88,89}.

O estudo CIRT foi elaborado com base em vários estudos observacionais que mostram que o metotrexato usado para condições reumatóides estava associado a um menor risco de DCV^{90,91}, incluindo uma meta-análise⁹², que encontrou um risco 21% menor de DCV total e 18% menor de IM especificamente. O CIRT randomizou 4786 participantes com histórico de IM prévio e diabetes tipo 2 ou síndrome metabólica para metotrexato em uma dose oral semanal alvo de 15 a 20 mg ou placebo⁸⁷.

Semelhante ao CANTOS⁸², ambos os grupos de estudo também receberam tratamento padrão, com mais de 85% dos participantes em terapia com estatina. Após um acompanhamento mediano de 2,3 anos, o metotrexato em baixa dose não reduziu significativamente os níveis de IL-1 β , IL-6 ou hsCRP em comparação ao placebo. Além disso, não impactou

significativamente o desfecho primário da primeira ocorrência de MACE, definido como um composto de IM não fatal, acidente vascular cerebral não fatal e morte cardiovascular, nem o desfecho composto secundário que compreendeu MACE e apresentações de angina instável que exigiram revascularização não planejada⁸⁷.

Os resultados neutros do CIRT são consistentes com ensaios clínicos anteriores, que também falharam em mostrar benefício de outras abordagens anti-inflamatórias para tratar aterosclerose. Isso inclui estudos de losmapimod⁹³, um inibidor da quinase p38 MAP (proteína ativada por mitógeno) e darapladib⁹⁴, um inibidor da fosfolipase A2 associada à lipoproteína (Lp-PLA2). Níveis elevados de ativação imune mediada por Lp-PLA2 e p38 MAP quinase foram hipotetizados como envolvidos na patogênese da aterosclerose⁹⁵. Portanto, nem todas as terapias com supostos efeitos anti-inflamatórios são capazes de atingir resultados clinicamente significativos em pacientes com DAC, com os resultados do CANTOS destacando que a via IL-1 β /IL-6 é um alvo especialmente promissor⁸².

5.3 Alvos alternativos na via de sinalização IL-1 β /IL-6

Os resultados do CANTOS⁸², que identificou a IL-1 β como um alvo eficaz para mitigar o risco inflamatório residual, motivaram um campo incipiente. Com isso, o interesse se voltou para o fluxo de citocinas, visando atingir os inflamossomas, dos quais o NLRP3, um ativador conhecido da IL-1 β , é melhor caracterizado⁹⁶. Os vários mecanismos que levam à ativação e montagem do inflamossoma ainda são uma área de pesquisa em andamento, com inúmeras vias identificadas até o momento, uma das quais foi demonstrada após a exposição de neutrófilos e macrófagos a cristais de colesterol na placa aterosclerótica^{97,98}.

OxLDL e outros tipos de cristais, incluindo cristais de ácido úrico, como visto na gota, também são conhecidos por ativar a resposta pró-inflamatória NLRP3⁹⁹. Sozinhos, esses ativadores são incapazes de iniciar a montagem do inflamossomo NLRP3, a menos que ocorra uma etapa de preparação inicial¹⁰⁰. Considera-se que isso seja devido aos baixos níveis de proteína de NLRP3 em macrófagos não preparados. A preparação de macrófagos é mediada pela sinalização NF- κ B, com o estímulo fornecido por citocinas endógenas, como IL-1 e TNF- α , bem como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) em moléculas microbianas que interagem com receptores toll-like (TLR). Isso, por sua vez, regula a expressão de NLRP3 e pro-IL-1 β , fornecendo assim os reagentes necessários para a formação e função do inflamossomo NLRP3¹⁰¹.

Até o momento, estudos em animais utilizando inibidores de NLRP3 em modelos de doenças cardiovasculares mostraram resultados encorajadores^{102,103}. Um deles mostrou reduções significativas no desenvolvimento do tamanho da lesão aterosclerótica, além da expressão de mRNA de VCAM-1 e ICAM-1, em camundongos hiperlipidêmicos quando

receberam MCC950, um inibidor seletivo de NLRP3, em comparação aos controles¹⁰³. Embora a infiltração de macrófagos na placa tenha sido reduzida, possivelmente devido à redução da adesão de monócitos via regulação negativa de VCAM-1 e ICAM-1, pesquisas adicionais são necessárias para elucidar os mecanismos subjacentes a essas descobertas. A redução no tamanho do infarto e a preservação da fração de ejeção do ventrículo esquerdo também foram relatadas para MCC950 em um modelo suíno de IM¹⁰².

A inibição da IL-6, que está a jusante da IL-1 β , também é vista como um alvo potencial para intervenção anti-inflamatória. Dados experimentais iniciais, implicando a IL-6 na aterosclerose, demonstraram que a injeção exógena de IL-6 em camundongos hiperlipidêmicos aumentou significativamente o tamanho da lesão aterosclerótica¹⁰⁴. Posteriormente, dados mostraram que a administração de MR16-1, um anticorpo murino do receptor de IL-6, produz ateroproteção significativa em camundongos hiperlipidêmicos¹⁰⁵. Portanto, agentes que têm como alvo a ligação da IL-6, como o tocilizumabe, ou alteram a atividade do receptor de IL-6, como o sarilumabe, justificam a investigação de benefícios ateroprotetores em pacientes com aterosclerose^{104,105}.

Resultados promissores, de um pequeno ensaio randomizado, mostraram que uma única dose de tocilizumabe reduziu os níveis de troponina em pacientes com síndrome coronariana aguda, sugerindo uma possível redução no tamanho do infarto¹⁰⁶. Embora o tocilizumabe seja usado clinicamente em pacientes com artrite reumatoide, ele tem sido associado ao aumento do LDL-C e ao ganho de peso, o que, em teoria, poderia promover a aterosclerose e potencialmente anular qualquer benefício a longo prazo obtido com suas ações anti-inflamatórias^{107,108}.

5.4 Estudo sobre colchicina

Outro candidato emergente para reposicionamento na aterosclerose é a colchicina, um medicamento anti-inflamatório usado para tratar gota e outros distúrbios inflamatórios, como febre familiar do Mediterrâneo (FMF) e pericardite recorrente. A colchicina se liga às extremidades dos microtúbulos e inibe os processos dos microtúbulos citoesqueléticos. Portanto, ela afeta vários processos dependentes de microtúbulos, como quimiotaxia de neutrófilos, fagocitose e excreção de proteínas¹⁰⁹.

Também foi demonstrado que ela limita a expressão de moléculas de adesão na superfície de leucócitos e células endoteliais¹¹⁰. Além disso, um avanço foi a descoberta da ativação atenuada do inflamossomo NLRP3 em neutrófilos e macrófagos tratados com colchicina, em resposta a cristais de urato monossódico no contexto da gota. Isso levou à especulação de que a colchicina também pode mitigar a inflamação induzida por cristais de colesterol, por meio da atenuação do NLRP3 na placa aterosclerótica¹¹¹. Desde a aprovação da Food and Drug Administration (FDA), em 2009, para seu uso em gota e FMF, vários estudos relataram que a colchicina pode ser

benéfica em diferentes estados de doenças cardiovasculares¹¹². Isso é consistente com observações retrospectivas, que encontraram uma menor taxa de IM em pacientes com gota e FMF que são tratados com o medicamento^{113,114}.

Com base neste crescente corpo de evidências, o estudo Low Dose Colchicine for Secondary Prevention of Cardiovascular Disease (LoDoCo)¹¹⁵ foi um ensaio controlado por placebo e cego ao observador, que randomizou 532 pacientes com aterosclerose estável para receber 0,5 mg/dia de colchicina ou placebo, além do tratamento padrão. Após um acompanhamento mediano de 3 anos, os participantes que receberam colchicina tiveram uma redução acentuada em um desfecho composto consistindo de IM, parada cardíaca ou acidente vascular cerebral não cardioembólico em comparação ao placebo. Embora o mecanismo de benefício da colchicina não tenha sido investigado neste estudo, a colchicina demonstrou reduzir agudamente a produção local de citocinas relacionadas ao inflamossomo NLRP3, IL-1 β , IL-18 e IL-6, no leito vascular coronário de pacientes com síndrome coronária aguda¹¹⁶.

Um estudo usando angiografia por tomografia computadorizada (TC) coronária descobriu que o uso regular de colchicina, na dose de 0,5 mg/dia, alterou favoravelmente a composição de lesões ateroscleróticas coronárias, reduzindo o volume da placa de baixa atenuação, um preditor conhecido de MACE futuro¹¹⁷. Semelhante ao canacinumabe e em contraste com o metotrexato, a colchicina demonstrou reduzir a hsCRP em mais de 50% em pacientes com DAC estável com níveis elevados de inflamação, em adição à terapia com estatina¹¹⁸.

A reutilização da colchicina para uso na aterosclerose não está isenta de desafios, dada sua propensão bem conhecida de causar efeitos colaterais gastrointestinais em até 25% dos pacientes. Por isso, a prova definitiva da eficácia, bem como uma compreensão mais mecanicista de como a colchicina atenua o risco cardiovascular na DAC facilitará a confiança na prescrição deste medicamento, como foi o caso das estatinas durante seu desenvolvimento inicial¹¹⁹.

6. Novo fator de risco para aterosclerose

A hematopoiese clonal de potencial indeterminado (CHIP) ocorre com o envelhecimento normal e é o resultado de mutações somáticas acumuladas em células-tronco da medula óssea^{120,121}. Essas mutações somáticas fornecem vantagens seletivas sobre células-tronco não afetadas, resultando em uma proporção relativa aumentada desses clones na circulação periférica, sem causar quaisquer outras anormalidades hematológicas. Os genes mais afetados por mutações em CHIP, em ordem de frequência decrescente, são os regulares epigenéticos DNMT3A (DNA metiltransferase-3-alfa), TET2 (Tet-metilcitosina- dioxigenase2) e ASXL1. Os resultados de estudos de coorte confirmam que CHIP é um distúrbio relacionado à idade, que afeta até 16,4%

das pessoas com mais de 80 anos, em comparação com menos de 1% das pessoas com menos de 40 anos¹²⁰.

Embora o CHIP transmita um risco aumentado de malignidade hematológica, os portadores de suas mutações associadas também têm 1,9 vezes mais probabilidade do que os não portadores de ter DAC e 4 vezes mais probabilidade de ter um IM. Portanto, a DCV pode ser responsável por um número desproporcional de mortalidades não hematológicas em portadores de CHIP. Tentativas de investigar esse fenômeno em estudos pré-clínicos mostraram resultados promissores que ligam suas mutações associadas ao desenvolvimento de aterosclerose. Camundongos propensos à aterosclerose, transplantados com células-tronco hematopoiéticas deficientes em TET2, desenvolveram lesões ateroscleróticas maiores do que os controles, sem diferenças significativas nos níveis de lipídios¹²².

A análise de macrófagos extraídos desses camundongos deficientes em TET2 mostrou níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β e IL-6. Além disso, em um modelo murino de insuficiência cardíaca, a disfunção cardíaca associada à deficiência de TET2 foi associada a um aumento correspondente nos níveis de IL-1 β . Ainda neste estudo, o tratamento com MCC950, um inibidor seletivo de NLRP3, protegeu contra o desenvolvimento de insuficiência cardíaca em camundongos deficientes em TET2. Por isso, pesquisas adicionais sobre o CHIP e suas mutações associadas podem fornecer outro alvo para futuros agentes terapêuticos, visando atenuar o risco cardiovascular aumentado associado¹²³.

REFERÊNCIAS

1. Seneviratne AN, Monaco C. Role of inflammatory cells and tolllike receptors in atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol* 2015; 13: 146-60.
2. Back M, Hansson GK. Anti-inflammatory therapies for atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 2015; 12: 199-211.
3. Ridker PM, Luscher TF. Anti-inflammatory therapies for cardiovascular disease. *Eur Heart J* 2014; 35: 1782-91.
4. Antonopoulos AS, Margaritis M, Lee R, et al. Statins as antiinflammatory agents in atherogenesis: molecular mechanisms and lessons from the recent clinical trials. *Curr Pharm Des* 2012; 18: 1519-30.
5. Mihos CG, Pineda AM, Santana O. Cardiovascular effects of statins, beyond lipid-lowering properties. *Pharmacol Res* 2014; 88: 12-9.
6. Verweij SL, van der Valk FM, Stroes ES. Novel directions in inflammation as a therapeutic target in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2015; 26: 580-5.

7. Mo ZC, Xiao J, Tang SL, et al. Advanced oxidation protein products exacerbates lipid accumulation and atherosclerosis through downregulation of ATP-binding cassette transporter A1 and G1 expression in apolipoprotein E knockout mice. *Circ J* 2014; 78: 2760-70.
8. Muntyanu AI, Raika M, Zota EG. Immunohistochemical study of the role of mast cells and macrophages in the process of angiogenesis in the atherosclerotic plaques in patients with metabolic syndrome. *Arkh Patol* 2016; 78: 19-28.
9. Yu XH, Zheng XL, Tang CK. Nuclear Factor-kappaB activation as a pathological mechanism of lipid metabolism and atherosclerosis. *Adv Clin Chem* 2015; 70: 1-30.
10. Ramsden CE, Zamora D, Majchrzak-Hong S, et al. Re-evaluation of the traditional diet-heart hypothesis: analysis of recovered data from Minnesota Coronary Experiment (1968-73). *BMJ* 2016; 353: i1246.
11. Full LE, Ruisanchez C, Monaco C. The inextricable link between atherosclerosis and prototypical inflammatory diseases rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 217.
12. Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Pecoraro R, et al. Atherosclerosis as an inflammatory disease. *Curr Pharm Des* 2012; 18: 4266-88.
13. Philip S, Ponnusamy T, Rao LN, et al. Regulating inflammatory immune response to atherogenic antigens prevents development and progression of atherosclerosis in new zealand white rabbits. *Can J Cardiol* 2015; pii: S0828-282X(15)01491-9.
14. Fredman G, Spite M. Recent advances in the role of immunity in atherosclerosis. *Circ Res* 2013; 113: e111-114.
15. Poupel L, Combadiere C. Atherosclerosis: on the trail of chemokines. *Biol Aujourd'hui* 2010; 204: 285-93.
16. Ketelhuth DF, Hansson GK. Adaptive Response of T and B Cells in Atherosclerosis. *Circ Res* 2016; 118: 668-78.
17. Golbus JR, Stitzel NO, Zhao W, et al. Common and rare genetic variation in CCR2, CCR5, or CX3CR1 and risk of atherosclerotic coronary heart disease and glucometabolic traits. *Circ Cardiovasc Genet* 2016; 9: 250-8.
18. Fernandez-Sender L, Alonso-Villaverde C, Rull A, et al. A possible role for CCR5 in the progression of atherosclerosis in HIVinfected patients: a cross-sectional study. *AIDS Res Ther* 2013; 10: 11.

19. Milioti N, Bermudez-Fajardo A, Penichet ML, et al. Antigeninduced immunomodulation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Dev Immunol* 2008; 2008: 723539.
20. Robbins CS, Chudnovskiy A, Rauch PJ, et al. Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation* 2012; 125: 364-74.
21. Bekkering S, Quintin J, Joosten LA, et al. Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34: 1731-8.
22. Kircher MF, Grimm J, Swirski FK, et al. Noninvasive in vivo imaging of monocyte trafficking to atherosclerotic lesions. *Circulation* 2008; 117: 388-95.
23. Leuschner F, Dutta P, Gorbato R, et al. Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice. *Nat Biotechnol* 2011; 29: 1005-10.
24. van der Valk FM, Kroon J, Potters WV, et al. In vivo imaging of enhanced leukocyte accumulation in atherosclerotic lesions in humans. *J Am Coll Cardiol* 2014; 64: 1019-29.
25. Schrijvers DM, De Meyer GR, Kockx MM, et al. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1256-61.
26. Weber C, Zernecke A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 802-15.
27. Binder CJ. Natural IgM antibodies against oxidation-specific epitopes. *J Clin Immunol* 2010; 30 Suppl 1: S56-60.
28. Ait-Oufella H, Herbin O, Bouaziz JD, et al. B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice. *J Exp Med* 2010; 207: 1579-87.
29. Kyaw T, Tay C, Krishnamurthi S, et al. B1a B lymphocytes are atheroprotective by secreting natural IgM that increases IgM deposits and reduces necrotic cores in atherosclerotic lesions. *Circ Res* 2011; 109: 830-40.
30. Hosseini H, Li Y, Kanellakis P, et al. Phosphatidylserine liposomes mimic apoptotic cells to attenuate atherosclerosis by expanding polyreactive IgM producing B1a lymphocytes. *Cardiovasc Res* 2015; 106: 443-52.

31. Kyaw T, Tay C, Hosseini H, et al. Depletion of B2 but not B1a B cells in BAFF receptor-deficient ApoE mice attenuates atherosclerosis by potentially ameliorating arterial inflammation. *PLoS One* 2012; 7: e29371.
32. Gjurich BN, Taghavi-Moghadam PL, Ley K, et al. L-selectin deficiency decreases aortic B1a and Breg subsets and promotes atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2014; 112: 803-11.
33. Andersson J, Libby P, Hansson GK. Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol* 2010; 134: 33-46.
34. Taleb S, Tedgui A, Mallat Z. Adaptive T cell immune responses and atherogenesis. *Curr Opin Pharmacol* 2010; 10: 197-202.
35. Paramel Varghese G, Folkersen L, Strawbridge RJ, et al. NLRP3 inflammasome expression and activation in human atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* 2016; 5: e003031.
36. Shi X, Xie WL, Kong WW, et al. Expression of the nlrp3 inflammasome in carotid atherosclerosis. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2015; 24: 2455-66.
37. Yamaguchi Y, Kurita-Ochiai T, Kobayashi R, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in *Porphyromonas gingivalis* accelerated atherosclerosis. *Pathog Dis* 2015; 73.
38. Lin J, Kakkar V, Lu X. Essential Roles of Toll-Like Receptors in Atherosclerosis. *Curr Med Chem* 2016; 23: 431-54.
39. Cole JE, Georgiou E, Monaco C. The expression and functions of toll-like receptors in atherosclerosis. *Mediators Inflamm* 2010; 2010: 3939-46.
40. Yang L, Chu Y, Wang L, et al. Overexpression of CRY1 protects against the development of atherosclerosis via the TLR/NF-kappaB pathway. *Int Immunopharmacol* 2015; 28: 525-30.
41. Curtiss LK, Black AS, Bonnet DJ, et al. Atherosclerosis induced by endogenous and exogenous toll-like receptor (TLR)1 or TLR6 agonists. *J Lipid Res* 2012; 53: 2126-32.
42. Rocha DM, Caldas AP, Oliveira LL, et al. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis* 2016; 244: 211-5.
43. Abe Y, Kawakami A, Osaka M, et al. Apolipoprotein CIII induces monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin 6 expression via Toll-like receptor 2

pathway in mouse adipocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 30: 2242-8.

44. Bae YS, Lee JH, Choi SH, et al. Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinasedependent activation of NADPH oxidase 2. *Circ Res* 2009; 104: 210-8, 221.

45. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* 2010; 11: 155-61.

46. Liu X, Ukai T, Yumoto H, et al. Toll-like receptor 2 plays a critical role in the progression of atherosclerosis that is independent of dietary lipids. *Atherosclerosis* 2008; 196: 146-54.

47. Schoneveld AH, Hoefer I, Sluijter JP, Laman JD, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Atherosclerotic lesion development and Toll like receptor 2 and 4 responsiveness. *Atherosclerosis* 2008; 197: 95-104.

48. Malgor R, Bhatt PM, Connolly BA, et al. Wnt5a, TLR2 and TLR4 are elevated in advanced human atherosclerotic lesions. *Inflamm Res* 2014; 63: 277-85.

49. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJP, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008;359(21):2195–207.

50. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, et al. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2004;350(15):1495–504.

51. Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, Rifai N, Rose LM, McCabe CH, et al. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med*. 2005;352(1):20–8.

52. Bohula EA, Giugliano RP, Cannon CP, Zhou J, Murphy SA, White JA, et al. Achievement of dual low-density lipoprotein cholesterol and high-sensitivity C-reactive protein targets more frequent with the addition of ezetimibe to simvastatin and associated with better outcomes in IMPROVE-IT. *Circulation*. 2015;132(13):1224–33.

53. Cannon CP, Blazing MA, Giugliano RP, McCagg A, White JA, Theroux P, et al. Ezetimibe added to statin therapy after acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2015;372(25):2387–97.

54. Tousoulis D, Oikonomou E, Economou EK, Crea F, Kaski JC. Inflammatory cytokines in atherosclerosis: Current therapeutic approaches. *Eur Heart J*. 2016;37(22):1723–32.
55. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*. 2007;37(Suppl 1):S34–45.
56. Dinarello CA. Anti-inflammatory agents: Present and future. *Cell*. 2010;140(6):935–50.
57. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med*. 1997;336(14):973–9.
58. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*. 2000;342(12):836–43.
59. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet*. 1998;351(9096):88–92.
60. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*. 2000;101(15):1767–72.
61. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor- α and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*. 2000;101(18):2149–53.
62. Everett BM, MacFadyen JG, Thuren T, Libby P, Glynn RJ, Ridker PM. Inhibition of interleukin-1 β and reduction in atherothrombotic cardiovascular events in the CANTOS trial. *J Am Coll Cardiol*. 2020;76(14):1660–70.
63. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med*. 2017;377(12):1119–31.
64. Ridker PM, Devalaraja M, Baeres FMM, Engelmann MD, Henson K, Furie KL, et al. IL-6 inhibition with ziltivekimab in patients at high atherosclerotic risk (RESCUE): A double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet*. 2021;397(10289):2060–9.

65. Tardif JC, Kouz S, Waters DD, Bertrand OF, Diaz R, Maggioni AP, et al. Efficacy and safety of low-dose colchicine after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2019;381(26):2497–505.
66. Nidorf SM, Fiolet ATL, Mosterd A, Eikelboom JW, Schut A, Opstal TSJ, et al. Colchicine in patients with chronic coronary disease. *N Engl J Med*. 2020;383(19):1838–47.
67. Tardif JC, Kouz S, Waters DD, Hsue P, Tanguay JF, Wright SR, et al. Colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep*. 2020;22(12):75.
68. Bikdeli B, Chatterjee S, Kirtane AJ. Ticagrelor and the risk of major adverse cardiovascular events and bleeding in patients with established coronary artery disease: Insights from the THEMIS trial. *Circulation*. 2020;141(18):1450–9.
69. Bhatt DL, Steg PG, Mehta SR, Leiter LA, Simon T, Fox K, et al. Ticagrelor in patients with stable coronary disease and diabetes. *N Engl J Med*. 2019;381(14):1309–20.
70. Cannon CP, Steg PG, Eagle KA, Smith SC, Goto S, Ohman EM, et al. Comparative effectiveness of antiplatelet therapies in secondary prevention of cardiovascular disease: A systematic review and network meta-analysis. *Lancet*. 2020;395(10233):1305–17.
71. Eikelboom JW, Connolly SJ, Bosch J, Dagenais GR, Hart RG, Shestakovska O, et al. Rivaroxaban with or without aspirin in stable cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2017;377(14):1319–30.
72. Fox KAA, Patel MR, Bhatt DL, Verheugt FWA, Hacke W, Haukoos JS, et al. Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med*. 2012;366(1):9–19.
73. Mega JL, Braunwald E, Mohanavelu S, Burton P, Poulter R, Misselwitz F, et al. Rivaroxaban versus placebo in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2012;366(1):19–29.
74. Anand SS, Bosch J, Eikelboom JW, Connolly SJ, Diaz R, Widimsky P, et al. Rivaroxaban in patients with stable atherosclerotic vascular disease. *Circulation*. 2018;138(14):1359–69.
75. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473(7347):317–25.

76. Hansson GK, Libby P, Tabas I. Inflammation and plaque vulnerability. *J Intern Med*. 2015;278(5):483–93.
77. Libby P. Interleukin-1 beta as a target for atherosclerosis therapy: Biological basis of CANTOS and beyond. *J Am Coll Cardiol Basic Transl Sci*. 2017;2(6):643–53.
78. Hansson GK, Robertson A-KL, Söderberg-Nauclér C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:297–329.
79. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115–26.
80. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: Current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011;17(11):1410–22.
81. Curtis JR, John A, Baser O. Dyslipidemia and changes in lipid profiles associated with rheumatoid arthritis and initiation of anti-tumor necrosis factor therapy. *Arthritis Care Res*. 2012;64(9):1282–91.
82. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Anti-inflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med*. 2017;377(12):1119–31.
83. Ridker PM, Howard CP, Walter V, Everett B, Libby P, Hensen J, et al. Effects of interleukin-1 β inhibition with canakinumab on hemoglobin A1c, lipids, C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen: A phase IIb randomized, placebo-controlled trial. *Circulation*. 2012;126(23):2739–48.
84. Ridker PM, MacFadyen JG, Everett BM, Libby P, Thuren T, Glynn RJ. Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: A secondary analysis from the CANTOS randomized controlled trial. *Lancet*. 2018;391(10118):319–28.
85. Ridker PM, Libby P, MacFadyen JG, Thuren T, Ballantyne C, Fonseca F, et al. Modulation of the interleukin-6 signalling pathway and incidence rates of atherosclerotic events and all-cause mortality: Analyses from the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Eur Heart J*. 2018;39(38):3499–507.
86. Ridker PM, MacFadyen JG, Thuren T, Everett BM, Libby P, Glynn RJ. Effect of interleukin-1 β inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: Exploratory results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2017;390(10105):1833–42.

87. Malaviya AN, Sharma A, Agarwal D, Kapoor S, Garg S, Sawhney S. Low-dose and high-dose methotrexate are two different drugs in practical terms. *Int J Rheum Dis*. 2010;13(4):288–93.
88. Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Serio B, Straub RH. Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2001;60(8):729–35.
89. Choi HK, Hernan MA, Seeger JD, Robins JM, Wolfe F. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: A prospective study. *Lancet*. 2002;359(9313):1173–7.
90. Van Halm VP, Nurmohamed MT, Twisk JW, Dijkmans BA, Voskuyl AE. Disease-modifying antirheumatic drugs are associated with a reduced risk for cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: A case-control study. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(5):R151.
91. Naranjo A, Sokka T, Descalzo MA, Calvo-Alen J, Horslev-Petersen K, Luukkainen RK, et al. Cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: Results from the QUEST-RA study. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(2):R30.
92. Micha R, Imamura F, Wyler von Ballmoos M, Solomon DH, Hernan MA, Ridker PM, et al. Systematic review and meta-analysis of methotrexate use and risk of cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2011;108(9):1362–70.
93. O'Donoghue ML, Glaser R, Cavender MA, Aylward PE, Bonaca MP, Budaj A, et al. Effect of losmapimod on cardiovascular outcomes in patients hospitalized with acute myocardial infarction: A randomized clinical trial. *JAMA*. 2016;315(15):1591–9.
94. O'Donoghue ML, Braunwald E, White HD, Steen DL, Lukas MA, Tarka E, et al. Effect of darapladib on major coronary events after an acute coronary syndrome: The SOLID-TIMI 52 randomized clinical trial. *JAMA*. 2014;312(10):1006–15.
95. Mallat Z, Lambeau G, Tedgui A. Lipoprotein-associated and secreted phospholipases A2 in cardiovascular disease: Roles as biological effectors and biomarkers. *Circulation*. 2010;122(21):2183–200.
96. Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):210–5.

97. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010;464(7293):1357–61.
98. Rajamaki K, Lappalainen J, Oorni K, Valimäki E, Matikainen S, Kovanen PT, et al. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: A novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One*. 2010;5(7):e11765.
99. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006;440(7081):237–41.
100. Zhou W, Chen C, Chen Z, Liu L, Jiang J, Wu Z, et al. NLRP3: A novel mediator in cardiovascular disease. *J Immunol Res*. 2018;2018:5702103.
101. He Y, Hara H, Nunez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends Biochem Sci*. 2016;41:1012–21.
102. Van Hout GP, Bosch L, Ellenbroek GH, de Haan JJ, van Solinge WW, Cooper MA, et al. The selective NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 reduces infarct size and preserves cardiac function in a pig model of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2017;38:828–36.
103. Van der Heijden T, Kritikou E, Venema W, van Duijn J, van Santbrink PJ, Sluiter B, et al. NLRP3 inflammasome inhibition by MCC950 reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37:1457–61.
104. Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2364–7.
105. Akita K, Isoda K, Sato-Okabayashi Y, Kadoguchi T, Kitamura K, Ohtomo F, et al. An interleukin-6 receptor antibody suppresses atherosclerosis in atherogenic mice. *Front Cardiovasc Med*. 2017;4:84.
106. Kleveland O, Kunszt G, Bratlie M, Ueland T, Broch K, Holte E, et al. Effect of a single dose of the interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab on inflammation and troponin T release in patients with non-ST-elevation myocardial infarction: A double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 trial. *Eur Heart J*. 2016;37:2406–13.

107. Hirabayashi Y, Ishii T, Harigae H. Clinical efficacy of tocilizumab in patients with active rheumatoid arthritis in real clinical practice. *Rheumatol Int.* 2010;30:1041–8.
108. Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/GP130 signaling. *J Clin Investig.* 2011;121:3375–83.
109. Leung YY, Yao Hui LL, Kraus VB. Colchicine – update on mechanisms of action and therapeutic uses. *Semin Arthritis Rheum.* 2015;45:341–50.
111. Demidowich AP, Davis AI, Dedhia N, Yanovski JA. Colchicine to decrease NLRP3-activated inflammation and improve obesity-related metabolic dysregulation. *Med Hypotheses.* 2016;92:67–73.
112. Verma S, Eikelboom JW, Nidorf SM, Al-Omran M, Gupta N, Teoh H, et al. Colchicine in cardiac disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Cardiovasc Disord.* 2015;15:96.
113. Crittenden DB, Lehmann RA, Schneck L, Keenan RT, Shah B, Greenberg JD, et al. Colchicine use is associated with decreased prevalence of myocardial infarction in patients with gout. *J Rheumatol.* 2012;39:1458–64.
114. Langevitz P, Livneh A, Neumann L, Buskila D, Shemer J, Amolsky D, et al. Prevalence of ischemic heart disease in patients with familial Mediterranean fever. *Isr Med Assoc J.* 2001;3:9–12.
115. Nidorf SM, Eikelboom JW, Budgeon CA, Thompson PL. Low-dose colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61:404–10.
116. Martínez GJ, Robertson S, Barraclough J, Xia Q, Mallat Z, Bursill C, et al. Colchicine acutely suppresses local cardiac production of inflammatory cytokines in patients with an acute coronary syndrome. *J Am Heart Assoc.* 2015;4:e002128.
117. Vaidya K, Arnott C, Martínez GJ, Ng B, McCormack S, Sullivan DR, et al. Colchicine therapy and plaque stabilization in patients with acute coronary syndrome. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2018;11:305–16.
118. Nidorf M, Thompson PL. Effect of colchicine (0.5 mg twice daily) on high-sensitivity C-reactive protein independent of aspirin and atorvastatin in patients with stable coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2007;99:805–7.

119. Hemkens LG, Ewald H, Gloy VL, Arpagaus A, Olu KK, Nidorf M, et al. Colchicine for prevention of cardiovascular events. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016.
120. Pillinger MH, Krasnokutsky S, Slobodnick A, Shah B. Update on colchicine, 2017. *Rheumatology*. 2017;57:i4–i11.
121. Heuser M, Thol F, Ganser A. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential. *Dtsch Arztebl Int*. 2016;113:317–22.
122. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371:2488–98.
123. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, Gibson CJ, Bick AG, Shvartz E, et al. Clonal hematopoiesis and risk of atherosclerotic cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2017;377:111–21.
124. Sano S, Oshima K, Wang Y, MacLauchlan S, Katanasaka Y, Sano M, et al. TET2-mediated clonal hematopoiesis accelerates heart failure through a mechanism involving the IL-1 β /NLRP3 inflammasome. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71:875–86.