

**RASSEGNA**

# NUOVE PROSPETTIVE PER LE TERAPIE ANTI-INFIAMMATORIE NELL'ATEROSCLEROSI. QUALI EVIDENZE DALLA RICERCA DI BASE E CLINICA?

## New perspectives for anti-inflammatory therapies in the atherosclerosis. Which evidence from basic and clinical research?

**ANDREA BARAGETTI<sup>1,2</sup>, FABRIZIA BONACINA<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio Lipoproteine, Immunità ed Aterosclerosi,

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

<sup>2</sup>Centro SISA per lo Studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milano

### SUMMARY

Research from both the bench and clinic has led to the understanding that cholesterol metabolism and immune response are tightly connected. The exclusive role of lipids in the onset of cardiovascular diseases and, particularly, atherosclerosis has nowadays been replaced by the emerging concept of an interplay between metabolic function and activation of immune cells. In this scenario, the CANTOS trial has provided for the first time a reliable rationale for targeting inflammation beyond controlling plasma lipids to limit CVD risk. The aim of the present review is to provide a broad comprehension of the molecular circuits that couple intracellular lipid metabolism to the innate and adaptive immune response and their relevance in clinic application. While it is thoroughly accepted that dysregulation of immune response participates to atherogenesis, it is becoming clear that dysmetabolism may directly affect functions of immune cell by shaping their metabolic requirements. Therefore, looking to immunity has emerged as a novel option for the treatment of inflammation associated to cardiovascular diseases, on top of lipid-lowering drugs, although more clinical data are needed to test the synergistic effect of anti-inflammatory and CVD therapies; on the other hand, growing data from basic research suggest that targeting intracellular lipid metabolism, especially cholesterol, would potentially promise a novel therapeutic management of inflammatory conditions.

**Keywords:** *Cholesterol metabolism, inflammation, immune response, atherosclerosis.*

*Indirizzo per la corrispondenza*

Fabrizia Bonacina, Ph.D.

Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences

Via Balzaretti 9, 20133 Milano

E-mail: [fabrizia.bonacina@unimi.it](mailto:fabrizia.bonacina@unimi.it)

### **Colesterolo e infiammazione nell'aterosclerosi: la doppia faccia della stessa medaglia?**

La scoperta delle statine, inibitori competitivi delle HMGCoA reduttasi, ha fornito la prima solida evidenza della correlazione tra ipercolesterolemia e malattie cardiovascolari tanto che, a distanza di 40 anni, rappresentano ancora il cardine della terapia ipolipemizzante.

Tuttavia, già a partire dagli anni '80, numerosi studi sperimentali e clinici suggerivano uno scenario più complesso della fisiopatologia delle malattie cardiovascolari: non solo l'analisi bioptica delle placche aterosclerotiche rivelò la presenza di differenti popolazioni di cellule immunitarie, ma divenne chiaro, grazie al Physicians' Health Stud, che i livelli plasmatici al baseline del marcatore di infiammazione proteina C-reattiva ad alta sensibilità (hsCRP) erano in grado di predire il rischio di infarto miocardico e ictus in soggetti apparentemente sani, indipendentemente dalla presenza di tradizionali fattori di rischio.

Queste evidenze portarono alla fine degli anni '90 alla ridefinizione dell'aterosclerosi quale patologia infiammatoria cronica guidata da una condizione di dislipidemia, definizione tutt'oggi ancora valida.

#### *Accumulo di colesterolo intracellulare: meccanismi molecolari associati alla risposta infiammatoria*

La ritenzione di lipoproteine contenenti apo-B nell'intima delle arterie è da sempre considerato il fattore scatenante l'instaurarsi di un processo di infiammazione locale e cronica, che promuove ed aggrava la lesione aterosclerotica; tuttavia, già la sola dislipidemia contribuisce ad instaurare una risposta infiammatoria a livello sistemico, che si riflette in un aumento

dei livelli circolanti di linfociti T attivati (1, 2), suggerendo che l'alterazione sia locale che sistemica della risposta immuno-infiammatoria partecipi alla fisiopatologia delle malattie cardiovascolari.

I macrofagi sono stati per primi identificati come le cellule immunitarie implicate nel processo aterosclerotico perché responsabili dell'endocitosi di lipoproteine a bassa densità (LDL) sia nella loro forma nativa che modificata (3); mentre il primo rappresenta un processo altamente regolato dalla quantità di LDL-recettore presente in membrana, l'*uptake* di LDL modificate è responsabile dell'accumulo massivo di colesterolo intracellulare (4). Nel lisosoma, la lipasi acida lisosomiale (LAL), idrolizzando l'estere, genera colesterolo libero (FC) (5), centrale nella regolazione del metabolismo lipidico intracellulare. Difatti, la sua liberazione nel citoplasma provoca il blocco della via guidata dal fattore di trascrizione SREBP (sterol regulatory element binding protein) e l'attivazione di LXR (liver X receptor), che promuove la trascrizione di geni coinvolti nell'efflusso di colesterolo, quali i trasportatori ABCA1 e ABCG1 (ATB binding cassette) (*Figura 1*). L'evoluzione dell'aterosclerosi è strettamente dipendente da alterazioni di questi meccanismi, non solo come conseguenza della dislipidemia che ne deriva, ma anche per effetti sulla risposta infiammatoria. La compromissione dell'efflusso di colesterolo in animali *knock-out* per i trasportatori ABCA1 e ABCG1, infatti, parallelamente all'aterosclerosi, incrementa la responsività ai recettori *toll-like* (TLRs) e la produzione di citochine pro-infiammatorie come CCL2 e CCL3 da parte dei macrofagi (6). Tontonoz e colleghi furono pionieri nel rivelare i meccanismi molecolari che legano metabolismo e infiammazione dimostrando come l'attivazione di LXR nei macrofagi fosse in grado di sopprimere la trascrizio-

ne di geni pro-infiammatori quali iNOS (ossido nitrico sintetasi inducibile), COX-2 (ciclossigenasi 2) e IL-6 (interleuchina 6), tramite l'inibizione della via NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) indotta dalla stimolazione con lipopolisaccaride (LPS) (7). Recentemente, il lungo RNA non codificante (lncRNA), Maxis (Macrophage-Expressed LXR-Induced Sequence) è stato individuato quale modulatore dell'attivazione di LXR e dell'espressione di ABCA1 fornendo così nuovi dettagli sulla regolazione cellulare del metabolismo del colesterolo; topi LDLR KO trapiantati con midollo osseo di topi Maxis KO presentano infatti una ridotta espressione di ABCA1, un aumento dell'espressione di geni pro-infiammatori e un'aumentata aterosclerosi (8).

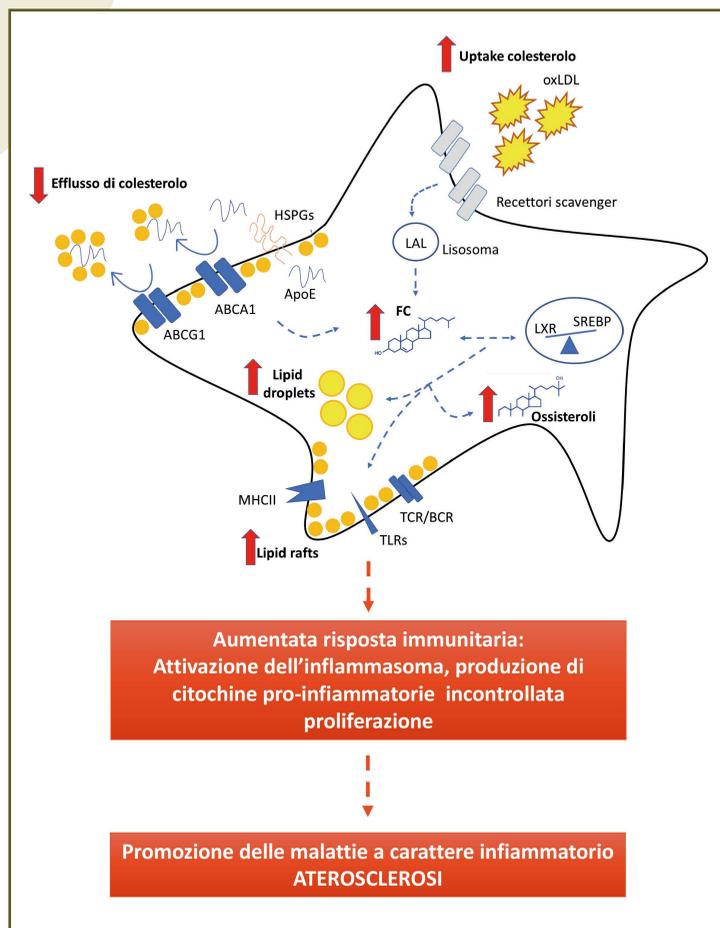
Parallelamente, è interessante osservare come, in contesti differenti dall'aterosclerosi, quali alcune malattie autoimmunitarie, vedi il lupus eritematoso sistemico (SLE) e l'artrite reumatoide (RA), alterazioni del metabolismo lipidico intracellulare ne peggiorino il quadro clinico. Topi ABCA1/G1 KO manifestano un fenotipo simile al lupus caratterizzato dall'insorgenza di glomerulonefriti, linfadenopatia e presenza di autoanticorpi (9), similmente a quanto osservato in topi apoE KO/LXR $\beta$  KO dopo trattamento con una dieta ricca in colesterolo (10). Entrambi i lavori individuano l'accumulo di colesterolo nelle cellule dendritiche come responsabile della loro iper-reattività, che si traduce in un aumento del rilascio di citochine pro-infiammatorie (IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6, IL-12) e dell'attivazione di linfociti T e B.

Un corretto bilancio della concentrazione intracellulare di colesterolo appare dunque cruciale per il controllo della fisiologica risposta immunitaria; difatti, sebbene necessario per la sopravvivenza e la proliferazione, la cellula ha elaborato

una serie di meccanismi per controllare la quantità di colesterolo libero intracellulare, così che quando in eccesso, venga accumulato in membrana plasmatica, trasformato in metaboliti meno tossici, gli ossisteroli, o ri-esterificato tramite l'enzima ACAT (acyl-CoA:cholesterol acyltransferase) e stoccato in gocce lipidiche (lipid droplets, LD).

#### *Accumulo di colesterolo nella membrana plasmatica: il ruolo dei lipid rafts nelle cellule immunitarie*

Più del 90% del colesterolo è localizzato nella membrana plasmatica dove si concentra in microdomini altamente specializzati, chiamati *lipid rafts*, che, influenzando proprietà e funzioni di proteine ivi localizzate, mediano i segnali dall'ambiente extracellulare a quello intracellulare. Le cellule immunitarie concentrano una serie di recettori, tra cui i TLRs, il recettore delle cellule T (TCR) e B (BCR), il complesso maggiore di istocompatibilità II (MHCII) nei *rafts*, la cui estensione favorisce l'accumulo di tali recettori in membrana, influenzando così la responsività e la conseguente attivazione della cellula (*Figura 1*). L'aumentata risposta infiammatoria osservata nei macrofagi privi dei trasportatori ABC trattati con oxLDL è stata infatti associata ad un'aumentata localizzazione dei TLRs nei lipid rafts (6). In modo simile, la mancanza dell'apolipoproteina E nelle cellule dendritiche promuove la localizzazione del complesso MHCII nei rafts, traducendosi in un'iper-reattività di queste cellule, che spiega in parte la maggiore attivazione della risposta immunitaria osservata in topi apoE KO (11). Inoltre, la monocitosi e neutrofilia che si accompagna all'accelerato processo aterosclerotico osservato in topi apoE KO e ABCA1/ABCG1 KO sono state associate ad un accumulo di *lipid rafts* in cellule progenitrici circolan-



**Figura 1** - Alterazioni del metabolismo intracellulare si associano ad un'aumentata risposta immuno-infiammatoria.

La quantità di colesterolo intracellulare è finemente regolata a più livelli. Una riduzione dell'efflusso di colesterolo o un aumento del suo uptake nella forma di LDL ossidate (oxLDL) aumenta la concentrazione intracellulare di colesterolo libero (FC), derivato per idrolisi della forma esterificata ad opera della LAL (lipasi acida lisosomiale). FC è il modulatore principale del metabolismo lipidico intracellulare e il suo accumulo influenza l'attività dei fattori di trascrizione LXR (liver X receptor) e SREBP (sterol element binding protein), promuovendo quella del primo e bloccando quella del secondo. Quando questo meccanismo non compensa, l'eccesso di colesterolo viene conservato in gocce lipidiche, stipato in membrana plasmatica dove partecipa alla formazione di lipid rafts e alla co-localizzazione di recettori immunitari, tra i quali TLRs (recettore toll-like), TCR e BCR (recettore delle cellule T e B) e MHCII (complesso maggiore di istocompatibilità), oppure viene convertito, per via enzimatica e non, in ossisteroli. Tali processi sono associati ad un aumento della risposta immuno-infiammatoria (attivazione dell'inflammasoma, produzione di citochine pro-infiammatorie, proliferazione cellulare incontrollata) che promuove e sostengono le patologie a carattere infiammatorio, quali appunto l'aterosclerosi.

ti (HSCs) che, promuovendo la localizzazione superficiale dei recettori dell'IL-3, IL-5 e GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), ne induce una incontrollata proliferazione (6, 12). All'opposto, l'overespressione di apoAI in questi modelli animali è stata in grado di ridurre l'ematopoiesi midollare; difatti, la promozione dell'efflusso, tramite l'uso di accettori specifici e non di colesterolo, quali le HDL, l'apo AI o la  $\beta$ -metilciclodestrina, ha dimostrato di ridurre l'estensione dei lipid rafts e la co-localizzazione dei recettori superficiali, limitando l'attivazione immunitaria (13). Il trattamento con HDL si è dimostrato anche efficace nel ridurre l'infiammazione della placca aterosclerotica in modelli animali di artrite dove l'aumentata aterosclerosi è stata associata all'eccessiva mielopoiesi per accumulo di lipid rafts nella membrana delle cellule ematopoietiche, fenomeno provocato dalla downregolazione dei trasportatori ABC e apoE indotta dalla costante infiammazione sistemica connessa alla malattia autoimmune (14).

Questi risultati suggeriscono che cambiamenti nella quantità di colesterolo in membrana possano essere sfruttati per ottenere risposte immunitarie specifiche per la condizione patologica in studio. Infatti, se da un lato, la deplezione dei rafts diminuisce la responsività immunitaria, riducendo così il fenomeno aterosclerotico, al contrario, un aumento dei rafts amplifica la risposta immunitaria. Ne è un esempio l'inibizione dell'enzima ACAT1 (acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase tipo 1) nei linfociti CD8 che, bloccandone l'esterificazione, provoca un aumento del colesterolo libero di membrana; l'accumulo di colesterolo favorisce il clustering del TCR e l'attivazione nei linfociti CD8 potenziandone così l'attività anti-tumorale (15).

### *Effetti di steroli e ossisteroli sulla funzionalità immunitaria*

Il deficit di mevalonato chinasi, una rara malattia ereditaria, esemplifica la relazione che intercorre tra metabolismo lipidico intracellulare e risposta infiammatoria; infatti tale patologia, caratterizzata da accumulo di mevalonato, un intermedio nella via biosintetica del colesterolo, si manifesta con ricorrenti episodi di infiammazione sistemica mediata dall'interleuchina 1 $\beta$  (16).

Il mantenimento di fisiologici livelli di colesterolo intracellulari è infatti finemente controllata dalla disponibilità sia di metaboliti intermedi della via biosintetica del colesterolo, che di ossisteroli, derivati di suoi processi di ossidazione enzimatica o radicalica, definiti nel loro complesso *steroloma*, che non sono solo coinvolti nella regolazione dell'attività di SREBP e LXR, ma anche, per l'appunto, della risposta immunitaria (*Figura 1*).

Studi recenti hanno infatti dimostrato il ruolo più o meno diretto degli steroli sulla regolazione di una serie di funzioni immunitarie.

Lo stesso colesterolo presente nella membrana plasmatica è in grado di legare direttamente il recettore TCR sui linfociti T generando effetti contrapposti, da una parte promuovendo la dimerizzazione e il *clustering* del recettore, risultando in una maggiore avidità di legame per l'antigene, fenomeno osservato nei linfociti memoria rispetto a quelli naïve (17), dall'altra, mantenendo il recettore in una conformazione allosterica inattiva che ne ostacola la fosforilazione e quindi l'attivazione (18).

Il netto effetto sulla risposta immuno-infiammatoria sembra infatti dipendere dal contesto in cui il metabolita si trova ad agire. Un interessante esempio è fornito dal 25-idrossicolesterolo (25HC), derivato della colesterolo 25-idrossilasi (Ch25h),

che limita sia la risposta infiammatoria inibendo l'inflammasoma e la produzione di IL-1 $\beta$  matura (19), che la replicazione virale bloccando la sintesi del colesterolo (20), suggerendo che la ri-programmazione del metabolismo degli steroli rappresenta un meccanismo centrale e, probabilmente primordiale, della difesa verso patogeni intracellulari.

D'altra parte, la stessa attivazione immunitaria induce profondi cambiamenti del metabolismo cellulare: la risposta antivirale sostenuta dall'interferone (IFN) riduce la sintesi di colesterolo (21), mentre, il processo di fagocitosi si accompagna all'accumulo di desmosterolo che, regolando l'attività delle vie dipendenti da LXR e SREBP, controlla la trascrizione di geni pro-infiammatori, suggerendo che l'attivazione immunitaria e il mantenimento dell'omeostasi metabolica siano strettamente integrate (22). Simili meccanismi operano nella risposta adattativa dove l'attivazione del TCR nei linfociti promuove la via biosintetica guidata da SREBP ed inibisce LXR rappresentando un adattamento metabolico necessario per sostenere la proliferazione cellulare (23).

Queste evidenze suggeriscono quindi un nuovo paradigma dove il controllo del metabolismo lipidico nelle cellule immunitarie sembra essere necessario più per modulare la risposta immunitaria che per il mantenimento dell'omeostasi cellulare.

### *Lipid droplets: organuli dinamici coinvolti nel processo infiammatorio*

Sebbene a lungo considerate semplici organelli intracellulari deputati all'accumulo di lipidi, attualmente le gocce lipidiche (*lipid droplets*) sono riconosciute come importanti modulatori sia del metabolismo lipidico intracellulare che dell'immunità. Sono infatti essenziali per supportare metabolicamente la risposta

immunitaria, partecipano alla produzione di mediatori infiammatori (eicosanoidi), alla clearance di patogeni e alla risposta indotta da IFN (24).

Caratterizzate da un core di lipidi neutri, che comprende esteri degli steroli e trigliceridi, circondato da un monostrato di fosfolipidi, le gocce lipidiche accumulate nei macrofagi della placca sono state riconosciute tra i primi segni patognomici dell'aterosclerosi (*Figura 1*). L'accumulo lipidico interessa tuttavia altre classi di cellule immunitarie e avviene anche in circolo: gocce lipidiche sono state infatti osservate in monociti, sia nella fase post-prandiale dopo un pasto ricco di grassi (25), che in condizioni di ipercolesterolemia (26). Il trattamento con agenti ipolipemizzanti, quali gli anticorpi anti-PCSK9, riducendo il numero di gocce lipidiche, ha migliorato il fenotipo pro-infiammatorio di monociti isolati da pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare (27). Non solo, queste osservazioni suggeriscono che l'iperlipidemia, provocando accumulo lipidico cellulare, agisca da *priming* sull'attivazione monocitaria, amplificandone la risposta infiammatoria una volta maturati a macrofagi nella placca. Difatti, l'accumulo di lipidi nelle cellule di origine mieloide è stato associato all'acquisizione di una memoria immunologica diversa da quella normalmente attribuita alle cellule dell'immunità adattativa e nota con il termine di *trained immunity* (28). È stato dimostrato che l'esposizione di monociti non solo a stimoli microbici, ma anche a oxLDL o lipoproteina (a) (Lp(a)) incrementa la produzione di citochine pro-infiammatorie dopo ri-stimolazione (29); tale effetto è associato a cambiamenti epigenetici, quali riorganizzazione cromatinica e modifiche istoniche, indotti dalla prima esposizione allo stimolo che up-regola i *pathway* immunologici e metabolici fornendo da una

parte le "armi", dall'altra "l'energia" per affrontare una seconda riesposizione allo stimolo. Recentemente, il mevalonato è stato individuato come fondamentale nell'attivazione della *trained immunity*, grazie alla sua capacità di aumentare l'attività del recettore IGF1 (insulin-like growth factor 1) che, tramite l'attivazione di mTOR (mammalian target of rapamycin), promuove cambiamenti epigenetici (30). Gli effetti pleiotropici di carattere antinfiammatorio delle statine possono quindi essere ricondotti alla loro capacità di ridurre l'accumulo di mevalonato, suggerendo che la modulazione del metabolismo lipidico cellulare possa assumere una rilevanza clinica nel trattamento di patologie infiammatorie.

Va ciononostante tenuto conto che la breve emivita dei monociti suggerisce che tali cambiamenti epigenetici possano avvenire già nei precursori mieloidi a livello midollare. Infatti, tale ipotesi giustifica i risultati derivati da numerosi studi epidemiologici sull'uso dei vaccini che riportano effetti non-vaccino specifici; ne è un esempio il vaccino contro la tubercolosi (BCG) per il quale sono state riportate funzioni protettive che vanno oltre quelle descritte contro il *Mycobacterium tuberculosis* (31).

#### *Colesterolo e inflammasoma: l'anello di congiunzione tra aterosclerosi e risposta immunitaria*

L'inflammasoma è un complesso molecolare citoplasmatico formato in seguito al riconoscimento da parte dei recettori NOD (recettori NOD-like) di particolari strutture associate a patogeni (PAMPs) Pathogen Associated Molecular Patterns o al danno cellulare (DAMPs) Damage-associated molecular patterns, che risulta nell'attivazione della caspasi-1 la quale, attraverso taglio proteolitico, attiva il precursore dell'IL-1 $\beta$  e dell'IL-18 (32). L'eccesso di colesterolo, depositato in forma di cri-

stalli, attiva l'inflammasoma NLRP3 risultando nel rilascio dell'IL-1 $\beta$  e dell'IL-18 mature, fenomeno associato ad un'aumentata aterosclerosi (33); al contrario, la mancanza della caspasi-1 ha un effetto protettivo (34). L'accumulo di colesterolo rappresenta il principale *trigger* di NLRP3, tanto che la mancanza dei trasportatori ABC nelle cellule mieloidi di topi LDLR KO stimola la sua attivazione sia nei monociti/macrofagi che nei neutrofilo, incrementando il loro accumulo nella placca (35). Dati recenti suggeriscono che le oxLDL possano agire da primo stimolo nell'attivazione di NLRP3, infatti sebbene il passaggio da una dieta arricchita in colesterolo ad una standard riduca l'infiammazione sistemica in topi LDLR KO, le cellule mieloidi conservano una risposta decisamente aumentata ad uno stimolo immunitario, ipotizzando che lo stesso NLRP3 possa avere un ruolo nella riprogrammazione epigenetica delle cellule mieloidi (36).

### **L'infiammazione nel fenomeno dell'aterosclerosi: dalla patologia alle prospettive cliniche**

*L'infiammazione nell'aterosclerosi o causa dell'aterosclerosi?*

Quando nel 1999 Russel Ross scrisse che "L'aterosclerosi è una malattia infiammatoria", si rese ancora più evidente che l'infiammazione non è soltanto conseguente all'accumulo di cellule immunitarie e ai meccanismi responsabili dell'insorgenza del fenomeno aterosclerotico che esse stesse orchestrano ma risulta essere anche causa del "circolo vizioso" che ne fomenta l'evoluzione.

Questa concezione si è sviluppata ancor prima, quando già nel 1929, Samuel A. Levine, cardiologo e pioniere in ambito di trombosi coronarica, osservava che "il grado di febbre e la leucocitosi forse

dipende dall'estensione della regione miocardica infartuata". e che "il tessuto infartuato... probabilmente libera sostanze tossiche che esacerbano la febbre e la leucocitosi... la conta leucocitaria tende ad aumentare parallelamente con l'aumento della febbre... la presenza di leucocitosi è uno dei segni dei più costanti sintomi della trombosi coronarica..." (Levine SA. *Medicine*. 1929; 8: 245-418).

Con il passare degli anni siamo stati in grado di identificare i marcatori che contribuiscono a questa semeiotica e la biologia ci elenca una serie ben più estesa di citochine, chemochine e complessi multiproteici che vengono rilasciati da cellule del sistema immunitario, partecipando nel fenomeno dell'aterosclerosi. È altresì vero che la rilevanza di tutti questi meccanismi non si apprezza soltanto durante le fasi acute e la manifestazione clinica dell'aterosclerosi, ma anche cronicamente lungo il suo sviluppo. La moltitudine di dati epidemiologici ci evidenzia come tutto questo sia esacerbato da complicanze, quali diabete, ipertensione, dislipidemia e scorrette abitudini alimentari, mentre la clinica fornisce un'ampia serie di "modelli" nei quali infiammazione cronica, comorbidità cliniche e metaboliche si incontrano, determinando un elevato rischio cardiovascolare già in età premature.

*Le malattie reumatiche e autoimmuni: un modello clinico di infiammazione e aterosclerosi prematura*

Anche escludendo le forme più segregate e ancor meno comuni di infiammazione vascolare (la sindrome di Churg-Strauss oppure la granulomatosi di Wegener), i pazienti affetti da malattie reumatiche croniche e autoimmuni (dal Lupus Sistemico Eritematoso (SLE) all'Artrite Reumatoide (RA), dalla spondilite anchilosante alle arteriti di Takayasu (TA)) mostrano un'am-

plificata mortalità cardio-coronarica già durante le più precoci decadi. Ad esempio le malattie cardiovascolari su base ischemica rappresentano oltre il 50% della mortalità in età precedente la sesta decade di vita in pazienti affetti da RA (37). Nello SLE il rischio di infarto acuto del miocardio è fino a dieci volte più elevato in donne con età comprese tra i 35 e i 40 anni rispetto alla popolazione generale; inoltre, nelle stesse decadi è possibile riscontrare aterosclerosi subclinica carotidea in oltre il 30% dei pazienti affetti da SLE e, in particolare, in quelli con i maggiori indici di attività della malattia (38).

È atteso che fattori come il fumo oppure la disabilità fisica causata da RA esacerbino ulteriormente la patologia cardiovascolare in queste malattie. Inoltre, il cronico grado di infiammazione nonché le aggressive terapie antiinfiammatorie con cortisonici favoriscono lo sviluppo di insulino-resistenza e dell'alterazione metabolica di queste patologie. Mentre l'ipertensione spesso accompagna diverse patologie reumatiche, diversi studi hanno dimostrato alterazioni nella composizione e, quindi, nel potenziale aterogeno di alcune frazioni lipoproteiche (39).

Alla luce di tutte queste osservazioni, è tuttavia utile notare inoltre che la maggior parte degli studi epidemiologici in queste coorti ad oggi non ha raggiunto ancora un *consensus* in merito al peso esercitato dai fattori di rischio tradizionali (37) sull'*outcome* cardiovascolare.

Inoltre il beneficio delle terapie ipolipemizzanti nella riduzione del rischio cardiovascolare non è ad oggi confermato nei pazienti reumatologici e non sono disponibili né robusti trials a supporto di beneficio delle terapie con statine né specifici target nella riduzione di LDL-C in queste tipologie di pazienti, come riconosciuto recentemente anche da diverse Linee Guida

Internazionali, tra cui quelle della Società Europea di Aterosclerosi (40).

Altresì viene sempre più comprovata l'importanza dell'infiammazione come target terapeutico in pazienti reumatologici, ancor più rispetto a pazienti non affetti da tali patologie (37). Diversi trials interventistici hanno raccolto importanti osservazioni sul beneficio delle terapie anti-infiammatorie non soltanto nel decorso della malattia reumatologica ma anche nello sviluppo e manifestazione clinica del fenomeno aterosclerotico.

Una metanalisi di dieci studi su pazienti con RA, psoriasi e poliartrite ha osservato che il trattamento con metotressato si associava a una riduzione del 20% della mortalità cardiovascolare e del 18% nello specifico per infarto acuto del miocardio (41).

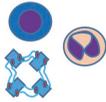
Malgrado queste evidenze, il restante ampio spettro di terapie anti-reumatiche (noto come "disease-modifying anti-rheumatic drug (DMARD)") rappresenta sì un valido approccio nel ridurre i livelli di biomarcatori pro-infiammatori (Proteina C-reattiva, IL-6, Fibrinogeno) ma ha suscitato pareri contrastanti nella riduzione degli eventi cardiovascolari. Alcuni di questi, infatti, hanno addirittura mostrato un peggioramento nel rischio di eventi cardiovascolari (tra cui cortisonici (42), FANS e COXIB e Ciclosporina), mentre per altri pochi sono i dati validi a disposizione (tra cui Micofenolato Mofetile, e Tocilizumab (anticorpo monoclonale contro il recettore solubile per IL-6 (42))). Malgrado siano ancora in corso studi con end-point cardiovascolare in pazienti trattati con terapie soppressive della risposta linfocitaria del comparto B (vedasi Rituximab (43)), è stata riportata una riduzione dell'attività della malattia SLE parallelamente a una riduzione dello sviluppo di aterosclerosi subclinica carotidea in pazienti trattati con

Belimumab (anticorpo monoclonale IgG1-lambda specifico per la proteina solubile umana che stimola i linfociti B (BLyS, B-Lymphocyte Stimulator (38)).

È stato osservato un 13% maggiore uptake di  $^{18}\text{F}$ -fluorodesossiglucosio (radio-tracciato attraverso tomografia ad emissione di positroni, PET) in aorte di pazienti affetti da RA rispetto a pazienti con malattia coronarica ischemica stabile e con profilo clinico e biochimico paragonabile, ad indicare un maggior grado di flogosi vascolare (42) indipendentemente da altri fattori di rischio cardiovascolare classici. Pur tuttavia, questo segnale veniva significativamente ridotto dopo otto settimane di trattamento alla massima dose con etanercept (immunoglobulina

chimerica umana IgG1 fusa con il recettore umano p75 per il fattore TNF-alpha) e di infliximab (che determina significative riduzioni nel profilo di diverse citochine pro-infiammatorie (32)). Al contrario, in uno studio indipendente tuttavia, l'utilizzo di etanercept in pazienti con più lunghi follow-up di malattia e con una maggiore compromissione cardio-metabolica sortiva l'effetto opposto, questionando ancora l'effetto dei fattori di rischio in presenza di elevati livelli di infiammazione (44).

Le malattie reumatologiche rappresentano dei modelli utili a riconoscere l'effetto rilevante dell'infiammazione nel fenomeno aterosclerotico, malgrado in queste stesse patologie rimanga ancora poco chiaro se vi sia un effetto benefico delle terapie anti-

	 ↓ <b>Infiammazione</b>	 ↓ <b>Colesterolo</b>	 ↓ <b>CVD</b>	<b>Ref</b>
DMARDs				
<i>Metotressato</i>	√√	X	?	[37,38,41, 42]
<i>Cortisonici</i>	√√	X	X	[37,38, 42]
<i>NSAIDs</i>	√√	X	X	[37,42]
<i>Etanercept</i>	√√	X	X	[42, 53]
<i>Infliximab</i>	√√	X	X	[42, 54]
<i>Canakinumab</i>	√√	X	√	[55]
Ipolipemizzanti				
<i>Statine</i>	?	√√	√	[48,49]
<i>Anti-PCSK9 mAbs</i>	?	√√	√	[50,51]
<i>Anti Lp(a) ASO</i>	√	√√	?	[52]

**Figura 2** - *Terapie antinfiammatorie e terapie ipolipemizzanti per la riduzione del rischio cardiovascolare.*

Nella tabella si riassume quanto riportato dai maggiori trials circa l'effetto nel contrastare l'infiammazione, nel ridurre la colesterolemia e nel ridurre il rischio di eventi cardiovascolari da parte di terapie antinfiammatorie e ipolipemizzanti. "√" in verde indica associazione positiva tra il trattamento farmacologico e l'outcome; "X" in rosso indica mancata correlazione tra il trattamento farmacologico e l'outcome; "?" in giallo indica mancata informazione oppure dati contrastanti in merito all'associazione tra il trattamento farmacologico e l'outcome. "DMARDs" = disease-modifying anti-rheumatic drug; "NSAIDs" = Non-steroidal anti-inflammatory drugs; "ASO" = Oligonucleotide Antisense; "mAbs" = Anticorpi monoclonali; "Ref" = Referenze bibliografiche.

infiammatorie (*Figura 2*). Quest'incertezza può essere spiegata non soltanto dalle confondenti pluri-terapie ma anche dall'alterazione nel controllo metabolico, tra cui quello lipidico, che risulta essere un denominatore comune della maggior parte di queste.

Quest'ultima riflessione polarizza nuovamente l'attenzione su quale sia la relazione tra l'infiammazione e colesterolemia nel fenomeno dell'aterogenesi.

*L'infiammazione nelle ipercolesterolemie: una "chiamata alle armi" per nuovi approcci terapeutici*

Rispetto ai pazienti affetti da RA, un similare grado di uptake aortico di  $^{18}\text{F}$ -fluorodesossiglucosio tracciato attraverso PET è stato riscontrato in pazienti affetti da Ipercolesterolemia Familiare Eterozigote (HeFH), probandi per mutazioni sul recettore per le lipoproteine LDL (*LDLR*). Questo segnale era esacerbato in pazienti affetti da iperlipemia familiare combinata (FCH) (45) mentre esso si riduceva mediamente del 12% in seguito a un dimezzamento non farmacologico della colesterolemia LDL, mediante aferesi lipoproteica (46). A tutte queste eleganti osservazioni si allineano altre considerazioni a sostegno del controllo del colesterolo per la riduzione della flogosi vascolare. Infatti, l'aumentato uptake di  $^{18}\text{F}$ -fluorodesossiglucosio in pazienti ipercolesterolemici correlava positivamente con l'attivazione cellulare e l'espressione di recettori per il legame di chemochine di parete (tra cui C-C chemokine receptor type 2, "CCR2") da parte di monociti circolanti (47).

La ricchezza di tutte queste evidenze, in aggiunta a quelle provenienti dalla ricerca di base, evocano una vera e propria "chiamata alle armi" al fine di contrastare sia l'ipercolesterolemia sia l'infiammazione sistemica.

*Ridurre il colesterolo per contrastare l'infiammazione nelle malattie cardiovascolari*

È indiscusso l'effetto benefico delle terapie "classiche" con statine, le quali permettono sia una riduzione lineare del 23% del rischio di eventi cardiovascolari per ogni mmol/L di LDL-C ridotta (48) sia una regressione del 3% nel volume percentuale di stenosi nei maggiori distretti coronarici riducendo LDL-C fino a 60 mg/dL (49). Pur tuttavia, i recenti dati dello Studio FOURIER (Further Cardiovascular Outcomes Research With PCSK9 Inhibition in Patients With Elevated Risk) hanno dimostrato che è possibile agire su un "rischio cardiovascolare residuo" (*Figura 2*). Infatti, in seguito al dato principale dello studio, per cui possiamo guadagnare un'ulteriore riduzione del 15% degli eventi cardiovascolari se aggiungiamo Evolocumab (anticorpo monoclonale anti-PCSK9) sul solo trattamento con statine (50), un'analisi spin-off ha studiato se vi fosse un parallelo beneficio in pazienti ad elevato rischio cardiovascolare e ad elevato grado di infiammazione, rappresentato dai livelli circolanti di proteina C-reattiva.

Il lavoro ha analizzato l'efficacia di Evolocumab per la riduzione di eventi in pazienti ad elevato rischio CV stratificati in funzione a) dei soli livelli di Proteina C-Reattiva ad alta sensibilità (hsCRP), e b) intersecando questi ultimi con i livelli di LDL-C raggiunti dopo il primo mese di trattamento.

Al termine del follow-up, i pazienti che più hanno beneficiato del trattamento non erano coloro che hanno soltanto raggiunto target più significativi di riduzione di LDL-C a un mese di trattamento con evolocumab, ma coloro che al contempo mostravano anche livelli di hsCRP più elevati alla randomizzazione.

I dati incoraggianti ottenuti da questo trial non sono stati, d'altro canto, replicati dai recenti dati combinati degli studi SPIRE-1 e SPIRE-2 (Studies of PCSK9 Inhibition and the Reduction in Vascular Events). Infatti, in questa esperienza soltanto i pazienti trattati con statina alla massima dose tollerabile e Bococizumab che raggiungevano un target di LDL-C 30-50 mg/dL a quattordici settimane di trattamento beneficiavano di una riduzione del rischio di di eventi cardiovascolari. Lo stesso dato non si osservava, invece in pazienti con hs-CRP superiore a 3 mg/L dopo trattamento, che mostravano un rischio comunque superiore rispetto ai pazienti con hsCRP inferiore a 1 mg/L (51).

L'effetto su marcatori surrogati di infiammazione sistemica da parte degli anticorpi monoclonali anti-PCSK9 non sembra pertanto essere all'altezza della loro efficacia sul profilo lipidico. Va riconosciuto che la combinazione tra statine e anticorpi monoclonali anti-PCSK9 sembra non completamente rispondere all'esigenza di contrastare i meccanismi infiammatori sistemici, rappresentati dagli elevati livelli circolanti di proteina C-reattiva. D'altro canto questi ultimi non riflettono gli eventi aterotrombotici, rappresentati maggiormente dalla solida relazione tra danno endoteliale e ossidazione delle LDL.

In questa direzione, paralleli approcci sperimentali hanno supportato l'effetto pro-infiammatorio degli anticorpi monoclonali anti-PCSK9. È stato infatti proposto che il trattamento di ventiquattro settimane con Evolocumab riduceva la capacità dei monociti di trasmigrare *in vitro* attraverso un monostrato di cellule endoteliali (linea HUVEC), parallelamente a una riduzione dell'espressione di membrana di CCR2 (27). Maggiori replicazioni, ad ogni modo, sono richieste in questa direzione,

dato che rimane da chiedersi se è pensabile un approccio farmacologico diretto contro l'infiammazione vascolare e volto a contrastare i meccanismi cellulari che ne fomentano l'evoluzione.

Lp(a) ha rappresentato soprattutto negli ultimi anni un target altrettanto *appealing* non soltanto dal punto di vista lipidologico ma anche al fine di contrastare l'elevato rischio dei pazienti con suoi elevati livelli plasmatici (*Figura 2*).

Monociti isolati da pazienti ipercolesterolemici con elevati livelli di Lp(a), unico marcatore di aumentato rischio di stenosi valvolare aortica, mostravano sia un'aumentata capacità di trasmigrazione endoteliale *in vitro* su un monostrato di cellule HUVEC (rispetto a quelli isolati non soltanto da soggetti controllo ma anche da soggetti ipercolesterolemici con ridotti livelli di Lp(a) (29)) sia un'aumentata produzione di citochine pro-infiammatorie *in vitro* non soltanto dopo isolamento, ma in misura maggiore dopo una seconda stimolazione con uno stimolo pro-infiammatorio.

Studi randomizzati, in doppio cieco, controllati da placebo che hanno considerato l'utilizzo di oligonucleotidi antisense (ASO) alla massima dose diretti contro la componente proteica di questa lipoproteina, non soltanto hanno mostrato schiacciati riduzioni di Lp(a) (fino al 75% dei valori basali), ma hanno anche permesso riduzioni fino al 50% dei fosfolipidi ossidati dell'ApoB e di apo(a) parallelamente a significative riduzioni nella capacità dei monociti di trasmigrare (52) attraverso un monostrato di cellule HUVEC.

#### *Contrastare l'infiammazione per la prevenzione delle malattie cardiovascolari*

Se non si considera lo Studio CIRT (Cardiovascular Inflammation Reduction Trial) volto a valutare l'effetto ateropro-

tettivo di Metotressato e recentemente sospeso (sebbene non per motivi di sicurezza), pochi risultati (e non tutti incoraggianti) sono disponibili circa le terapie antiinfiammatorie in ambito cardiovascolare (Figura 2).

Lo Studio RENEWAL (Randomized Etanercept Worldwide Evaluation), un'analisi combinata di due dataset indipendenti (RENAISSANCE e RECOVER) coinvolgendo oltre duemila pazienti con scompenso cardiaco (dal grado II al IV secondo New York Heart Association e con frazione di eiezione residua inferiore al 30%) (53), ha fallito nell'intento di riportare un effetto benefico di Etanercept (antagonista del recettore solubile per il Tumor Necrosis Factor, TNF) nella prevenzione della mortalità e l'ospedalizzazione. In aggiunta, una tendenza al peggioramento di questo rischio rivelata dall'analisi RENAISSANCE, ha allertato i clinici, invocando cautela nell'utilizzo di Etanercept in questa classe di pazienti. Risultati del tutto analoghi erano stati osservati in seguito a trattamento con Infliximab (anticorpo monoclonale diretto contro TNF), alla dose di 10 mg/kg corporeo, in pazienti con scompenso cardiaco di gradi ancora più avanzati (54), ulteriormente riducendo la validità di questi approcci anti-infiammatori, che prescindono dal controllo della colesterolemia, nella prevenzione della patologia cardiovascolare.

Recenti approcci traslazionali hanno, invece, dimostrato che alterazioni nella mobilitazione cellulare del colesterolo determinano una significativa attivazione dell'inflammasoma NOD-Like Receptor Protein 3 (NLRP3).

Infatti l'osservazione che il trapianto di midollo osseo da topi ABCA1/G1 knock-out a modelli di aterosclerosi LDLR knock-out portava ad aumentati livelli di IL-1 $\beta$  e all'attivazione di NLRP3

(repressa, silenziando contemporaneamente il gene *Nlrp3*) (35), è stato tradotto nell'uomo utilizzando i modelli di ipoalfalipoproteinemia genetica, ovvero i portatori della malattia di Tangier. Infatti, cellule mieloidi isolate da questi soggetti (portatori di mutazioni "loss-of-function" sul gene *ABCA1* e caratterizzati da elevata mortalità coronarica) mostravano massicci accumuli di colesterolo intracellulare che coincidevano con elevati livelli circolanti di IL-1 $\beta$  (49).

Queste osservazioni razionalizzano l'approccio recentemente proposto dallo studio CANTOS (Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study), uno studio randomizzato in doppio cieco che ha studiato l'efficacia di Canakinumab, un anticorpo monoclonale anti-IL-1 $\beta$ , nella riduzione del rischio di infarto acuto del miocardio, *stroke* non fatale oppure l'evento cardiovascolare fatale, somministrato per quattro anni con iniezione sottocutanea ogni tre mesi a pazienti in prevenzione secondaria per un infarto acuto del miocardio e con livelli di hsCRP superiori a 2 mg/L (55).

Al termine del follow-up, la dose intermedia (150 mg) di Canakinumab garantiva una riduzione circa del quindici per cento (rispetto al placebo) per il rischio di mortalità cardiovascolare, supportando quindi l'efficacia di una terapia anti-infiammatoria, indipendentemente dalla colesterolemia.

Va sottolineato che la riduzione sull'*endpoint* cardiovascolare era specifico, in quanto Canakinumab non dimostrava effetto benefico sulla riduzione della mortalità per tutte le cause e si associava altresì a un significativo, seppur minoritario, aumento di neutropenia, trombocitopenia e infezioni fatali.

Se paragonati ai risultati dello Studio FOURIER, i dati dello studio CANTOS

sono simili per quanto riguarda il rispettivo target di colesterolo e infiammazione. Tuttavia, è la riduzione del rispettivo endpoint studiato che differisce per le risposte ai due farmaci: il trattamento antinfiammatorio ha ridotto la mortalità cardiovascolare ma non quella per tutte le cause, mentre il trattamento ipolipemizzante più aggressivo ha sortito effetti opposti. In aggiunta, successiva a questa prima analisi, una valutazione post-hoc dello studio CANTOS ha inoltre fatto emergere un effetto più ampio da parte di Canakinumab sull'endpoint cardiovascolare e una riduzione concomitante anche della mortalità per tutte le cause soltanto in pazienti con hsCRP basale inferiore a 2 mg/L. Questo dato suggerisce pertanto che la terapia con Canakinumab permetteva una maggiore protezione cardiovascolare in pazienti a target per la "riduzione infiammatoria (55)".

## Conclusione

Alla luce di questi dati, all'apice del concetto "*the lower, the better*", nell'ambito della ricerca farmacologica cardiovascolare si riaccende la questione su quale sia il target prioritario, tra ipercolesterolemia e infiammazione, nella prevenzione cardiovascolare. Considerando che in entrambi i trials pocanzi descritti tutti i pazienti randomizzati erano già trattati con le terapie più aggressive, rimane da chiedersi quale beneficio possa aggiungere una terapia antinfiammatoria *on top of* una terapia con statine già alla massima dose rispetto a una ulteriore terapia ipolipemizzante. Questo è il quesito che passa nelle mani dei clinici.

Malgrado IL-1 $\beta$  rappresenti soltanto una citochina tra la vasta costellazione di tante altre, ulteriori sviluppi ne hanno riaffermato ulteriormente la rilevanza

come "player" e, quindi, come target terapeutico.

È stato infatti dimostrato che nelle fasi acute di un infarto acuto del miocardio si osservano aumenti vertiginosi di IL-1 $\beta$  in circolo, nel tessuto cardiaco e nel midollo, benché, anche settantadue ore dopo, questi stessi rimangano elevati soltanto nel terzo compartimento. Queste osservazioni ricapitolano gli elevati uptake di <sup>18</sup>F-fluorodesossiglucosio splenici in pazienti con sindromi coronariche acute (56). Inoltre, topi wild-type, trapiantati con midollo osseo di donatori deficienti per il gene *IL1R1* (recettore per IL-1 $\beta$ ), mostravano una ridotta proliferazione delle cellule progenitrici del comparto ematopoietico anche dopo giorni seguenti un infarto acuto del miocardio (57), suggerendo che la modulazione del signaling di questa citochina permetta di controllare la leucocitosi in seguito a un evento aterosclerotico. IL-1 $\beta$  rappresenta, quindi, un valido esempio di "sostanza tossica" descritta dalle ipotesi di Levine e si pone come attore importante nello sviluppo di un fenomeno "a eco" che esacerba l'evoluzione del fenomeno cardiovascolare.

L'osservazione che il sistema dell'infiammasoma sia iper-attivato e che vi sia un'aumentata secrezione di IL-1 $\beta$  da parte di macrofagi residenti nelle lesioni aterosclerotiche e deficienti del gene *TET2*, codificante per Tet metil-citosina diossigenasi-2 (un essenziale regolatore epigenetico per l'espansione clonale del comparto ematopoietico) sostengono ulteriormente la rilevanza dello studio farmacologico di questo *pathway* (58). Si apre, in questo modo, la prospettiva di nuove possibilità terapeutiche volte a controllare l'iper-attivazione immuno-infiammatoria e abbattere il rischio cardiovascolare residuo, laddove non riescono le consolidate terapie ipolipemizzanti.

**RIASSUNTO**

Evidenze derivanti dalla ricerca sia sperimentale che clinica suggeriscono che il metabolismo del colesterolo e la risposta immunitaria siano strettamente connessi. Il ruolo esclusivo dei lipidi nell'insorgenza delle malattie cardiovascolari e, in particolare, dell'aterosclerosi è stato ad oggi sostituito dall'emergente concenazione dell'esistenza di un'interazione tra le funzioni metaboliche e l'attivazione delle cellule immunitarie. In questo scenario, lo studio CANTOS ha fornito, per la prima volta, un valido razionale per considerare il targeting dell'infiammazione, in aggiunta al controllo dei lipidi plasmatici, come ulteriore nuovo approccio per limitare il rischio cardiovascolare. Lo scopo della presente review è di fornire un'ampia comprensione dei circuiti molecolari che accoppiano il metabolismo lipidico cellulare alla risposta immunitaria innata e adattativa e la loro rilevanza nell'applicazione clinica. Mentre è pienamente accettato che la disregolazione della risposta immunitaria partecipi all'aterogenesi, sta diventando chiaro che le cellule immunitarie modellano la loro *macchina metabolica* per soddisfare requisiti funzionali. Pertanto, la modulazione della risposta immunitaria è emersa come una nuova opzione terapeutica per le malattie cardiovascolari, in aggiunta al trattamento ipolipemizzante, sebbene maggiori dati clinici per testare l'effetto sinergico delle terapie anti-infiammatorie e cardiovascolari "classiche" siano necessari; d'altra parte, i dati della ricerca di base suggeriscono che il targeting del metabolismo lipidico intracellulare, in particolare quello del colesterolo, potrebbe potenzialmente promettere una nuova gestione terapeutica delle patologie a carattere infiammatorio.

**Parole chiave:** *Metabolismo del colesterolo, infiammazione, risposta immunitaria, aterosclerosi.*

**Bibliografia**

1. Ammirati E, Cianflone D, Vecchio V, et al. Effector Memory T cells Are Associated With Atherosclerosis in Humans and Animal Models. *J Am Heart Assoc.* 2012; 1: 27-41.
2. Proto JD, Doran AC, Subramanian M, et al. Hypercholesterolemia induces T cell expansion in humanized immune mice. *J Clin Invest.* 2018; 128: 2370-2375.
3. Torzewski M, Lackner KJ. Initiation and progression of atherosclerosis-enzymatic or oxidative modification of low-density lipoprotein? *Clin Chem Lab Med.* 2006; 44: 1389-1394.
4. Moore KJ, Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 1702-1711.
5. Goldstein JL, Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem.* 1977; 46: 897-930.
6. Westerterp M, Murphy AJ, Wang M, et al. Deficiency of ATP-binding cassette transporters A1 and G1 in macrophages increases inflammation and accelerates atherosclerosis in mice. *Circ Res.* 2013; 112: 1456-1465.
7. Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, et al. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med.* 2003; 9: 213-219.
8. Sallam T, Jones M, Thomas BJ, et al. Transcriptional regulation of macrophage cholesterol efflux and atherogenesis by a long noncoding RNA. *Nat Med.* 2018; 24: 304-312.
9. Westerterp M, Gautier EL, Ganda A, et al. Cholesterol Accumulation in Dendritic Cells Links the Inflammation to Acquired Immunity. *Cell Metab* 2017; 25: 1294-1304 e6.
10. Ito A, Hong C, Oka K, et al. Cholesterol Accumulation in CD11c(+) Immune Cells Is a Causal and Targetable Factor in Autoimmune Disease. *Immunity* 2016; 45: 1311-1326.
11. Bonacina F, Coe D, Wang G, et al. Myeloid apolipoprotein E controls dendritic cell antigen presentation and T cell activation. *Nat Commun.* 2018; 9: 3083.
12. Murphy AJ, Akhtari M, Tolani , et al., ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. *J Clin Invest.* 2011; 121: 4138-4149.
13. Wang SH, Yuan SG, Peng DQ, et al. HDL and ApoA-I inhibit antigen presentation-mediated T cell activation by disrupting lipid rafts in antigen presenting cells. *Atherosclerosis.* 2012; 225: 105-114.
14. Dragoljevic D, Kraakman MJ, Nagareddy PR, et al. Defective cholesterol metabolism in haematopoietic stem cells promotes monocyte-driven atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Eur Heart J.* 2018; 39: 2158-2167.
15. Yang W, Bai Y, Xiong Y, et al. Potentiating the antitumour response of CD8(+) T cells by modulating cholesterol metabolism. *Nature.* 2016; 531: 651-655.
16. Masters SL, Simon A, Aksentijevich I, et al.

- Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease (\*). *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 621-68.
17. Molnar E, Swamy M, Holzer M, et al. Cholesterol and sphingomyelin drive ligand-independent T-cell antigen receptor nanoclustering. *J Biol Chem.* 2012; 287: 42664-42674.
  18. Swamy M, Beck-Garcia K, Beck-Garcia E, et al. A Cholesterol-Based Allosteric Model of T Cell Receptor Phosphorylation. *Immunity.* 2016; 44: 1091-1101.
  19. Reboldi A, Dang EV, McDonald JG, et al. Inflammation. 25-Hydroxycholesterol suppresses interleukin-1-driven inflammation downstream of type I interferon. *Science.* 2014; 345: 679-684.
  20. Blanc M, Hsieh WY, Robertson KA, et al. The transcription factor STAT-1 couples macrophage synthesis of 25-hydroxycholesterol to the interferon antiviral response. *Immunity.* 2013; 38: 106-118.
  21. York AG, Williams KJ, Argus JP, et al. Limiting Cholesterol Biosynthetic Flux Spontaneously Engages Type I IFN Signaling. *Cell.* 2015; 163: 1716-1729.
  22. Spann NJ, Garmire LX, McDonald JG, et al. Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses. *Cell.* 2012; 151: 138-152.
  23. Kidani Y, Elsaesser H, Hock MB, et al. Sterol regulatory element-binding proteins are essential for the metabolic programming of effector T cells and adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2013; 14: 489-499.
  24. den Brok MH, Raaijmakers TK, Collado-Camps E, et al. Lipid Droplets as Immune Modulators in Myeloid Cells. *Trends Immunol.* 2018; 39: 380-392.
  25. Khan IM, Pokharel Y, Dadu RT, et al. Postprandial Monocyte Activation in Individuals With Metabolic Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016; 101: 4195-4204.
  26. Xu L, Dai Perrard X, Perrard JL, et al. Foamy monocytes form early and contribute to nascent atherosclerosis in mice with hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35: 1787-1797.
  27. Bernelot Moens SJ, Neele AE, Kroon J, et al. PCSK9 monoclonal antibodies reverse the pro-inflammatory profile of monocytes in familial hypercholesterolaemia. *Eur Heart J.* 2017; 38: 1584-1593.
  28. Netea MG, Joosten LA, Latz E, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science.* 2016; 352: aaf1098.
  29. van der Valk FM, Bekkering S, Kroon J, et al. Oxidized Phospholipids on Lipoprotein(a) Elicit Arterial Wall Inflammation and an Inflammatory Monocyte Response in Humans. *Circulation.* 2016; 134: 611-624.
  30. Bekkering S, Arts RJW, Novakovic B, et al. Metabolic Induction of Trained Immunity through the Mevalonate Pathway. *Cell.* 2018; 172: 135-146 e9.
  31. Benn CS, Netea MG, Selin LK, et al. A small jab - a big effect: nonspecific immunomodulation by vaccines. *Trends Immunol.* 2013; 34: 431-439.
  32. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.* 2002; 10: 417-426.
  33. Karasawa T, Takahashi M. Role of NLRP3 Inflammasomes in Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2017; 24: 443-451.
  34. Hendriks T, Jeurissen ML, van Gorp PJ, et al. Bone marrow-specific caspase-1/11 deficiency inhibits atherosclerosis development in Ldlr(-/-) mice. *FEBS J.* 2015; 282: 2327-2338.
  35. Westerterp M, Fotakis P, Ouimet M, et al. Cholesterol Efflux Pathways Suppress Inflammasome Activation, NETosis and Atherogenesis. *Circulation.* 2018.
  36. Christ A, Gunther P, Lauterbach MAR, et al. Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming. *Cell.* 2018; 172: 162-175 e14.
  37. Mason JC, Libby P. Cardiovascular disease in patients with chronic inflammation: mechanisms underlying premature cardiovascular events in rheumatologic conditions. *Eur Heart J.* 2015; 36: 482-489c.
  38. Baragetti A, Ramirez GA, Magnoni M, et al. Disease trends over time and CD4(+)CCR5(+) T-cells expansion predict carotid atherosclerosis development in patients with systemic lupus erythematosus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2018; 28: 53-63.
  39. Ammirati E, Bozzolo EP, Contri R, et al. Cardiometabolic and immune factors associated with increased common carotid artery intima-media thickness and cardiovascular disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2014; 24: 751-759.
  40. Authors/Task Force M, Catapano AL, Graham I, et al. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias: The Task Force for the Management of Dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Atherosclerosis.* 2016; 253: 281-344.

41. Micha R, Imamura F, Wyler von Ballmoos M, et al. Systematic review and meta-analysis of methotrexate use and risk of cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2011; 108: 1362-1370.
42. Skaggs BJ, Hahn BH, McMahon M. Accelerated atherosclerosis in patients with SLE—mechanisms and management. *Nat Rev Rheumatol.* 2012; 8: 214-223.
43. Ramos-Casals M, Sanz I, Bosch X, et al. B-cell-depleting therapy in systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 2012; 125: 327-336.
44. Bernelot Moens SJ, van der Valk FM, Strang AC, et al. Erratum to: Unexpected arterial wall and cellular inflammation in patients with rheumatoid arthritis in remission using biological therapy: a cross-sectional study. *Arthritis Res Ther.* 2016; 18: 298.
45. Toutouzas K, Skoumas J, Koutagiar I, et al. Vascular inflammation and metabolic activity in hematopoietic organs and liver in familial combined hyperlipidemia and heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol.* 2018; 12: 33-43.
46. van Wijk DF, Sjouke B, Figueroa A, et al. Non-pharmacological lipoprotein apheresis reduces arterial inflammation in familial hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2014; 64: 1418-1426.
47. Verweij SL, Duivenvoorden R, Stiekema LCA, et al. CCR2 expression on circulating monocytes is associated with arterial wall inflammation assessed by 18F-FDG PET/CT in patients at risk for cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2018; 114: 468-475.
48. Silverman MG, Ference BA, Im K, et al. Association Between Lowering LDL-C and Cardiovascular Risk Reduction Among Different Therapeutic Interventions: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA.* 2016; 316: 1289-1297.
49. Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I, et al. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA.* 2006; 295: 1556-1565.
50. Sabatine MS, Giugliano RP, Pedersen TR. Evolocumab in Patients with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2017; 377: 787-788.
51. Pradhan AD, Aday LM, Rose LM, et al. Residual Inflammatory Risk on Treatment With PCSK9 Inhibition and Statin Therapy. *Circulation.* 2018; 138: 141-149.
52. Viney NJ, van Capelleveen JC, Geary RS, et al. Antisense oligonucleotides targeting apolipoprotein(a) in people with raised lipoprotein(a): two randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trials. *Lancet.* 2016; 388: 2239-2253.
53. Mann DL, McMurray JJ, Packer M, et al. Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL). *Circulation.* 2004; 109: 1594-1602.
54. Chung ES, Packer KH, Lo KH, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor- $\alpha$ , in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. *Circulation.* 2003; 107: 3133-3140.
55. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al. Anti-inflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med.* 2017; 377: 1119-1131.
56. Emami H, Singh P, MacNabb M, et al. Splenic metabolic activity predicts risk of future cardiovascular events: demonstration of a cardiosplenic axis in humans. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2015; 8: 121-130.
57. Sager HB, Heidt T, Hulsmans M, et al. Targeting Interleukin-1 $\beta$  Reduces Leukocyte Production After Acute Myocardial Infarction. *Circulation.* 2015; 132: 1880-1890.
58. Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science.* 2017; 355: 842-847.