

Nicolás, Juan Carlos

Evaluación clínica de biomarcadores expresados en células mononucleares de sangre periférica: aplicación diagnóstica en pacientes con riesgo de desarrollo de ateroesclerosis

Tesis para la obtención del título de posgrado de

Doctor en Bioquímica

Director: Chiabrandó, Gustavo Alberto

Documento disponible para su consulta y descarga en Biblioteca Digital - Producción Académica, repositorio institucional de la Universidad Católica de Córdoba, gestionado por el Sistema de Bibliotecas de la UCC.



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias Químicas



**EVALUACIÓN CLÍNICA DE BIOMARCADORES EXPRESADOS EN
CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA.
APLICACIÓN DIAGNÓSTICA EN PACIENTES CON RIESGO DE
DESARROLLO DE ATEROESCLEROSIS**

**Tesis de la Facultad de Ciencias Químicas
de la Universidad Católica de Córdoba conforme a los requisitos para
obtener el título de DOCTOR en BIOQUÍMICA por**

**Juan Carlos NICOLÁS
Córdoba, Argentina**

– 2018 –

Director de Tesis

Dr. Gustavo Alberto CHIABRANDO

Departamento de Bioquímica Clínica – Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI - CONICET); Facultad Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Comisión de Tesis

Dra. Roxana Carolina CANO

Facultad Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba.

Dr. Néstor Walter SORIA

Facultad Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba.

Dr. Fernando Daniel BRITES

Departamento de Bioquímica Clínica - Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC); Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

**“No es verdad que las personas
paran de perseguir sueños porque se hacen viejos,
se hacen viejos porque paran de perseguir sus sueños”**

Gabriel García Márquez

Escritor, novelista, cuentista, guionista, editor y periodista Colombiano

(1927 – 2014)

Agradecimientos

Estoy convencido que mientras más grande es la proeza, más ayuda nos brindaron los demás para lograrla. En mi caso, muchos han contribuido a que logre lo que se materializa en este escrito, desde lo económico, hasta lo más importante que es el apoyo afectivo, aliento para no decaer y consejo, tanto académico como de vida.

En diciembre de 1985 terminaba la primaria en la escuela “Domingo Faustino Sarmiento”, de donde me quedan unos pocos recuerdos, pero mucho más importante, es que desde esa época conservo dos grandes amigos, Carlos y Juan María, compañeros de muchas charlas, risas, salidas y asados. Luego vino el secundario, haciendo lo propio en el “Colegio Nacional y Comercial Superior San Martín”, egresando con el título de Perito Mercantil en diciembre de 1990, después mi paso por la “Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de Córdoba”, obteniendo el título de Bioquímico en 1995; más tarde en el 2000, en el “Hospital Nacional de Clínicas” fui Bioquímico Especialista en Gastroenterología, gracias a Lyda, quien me acompañó en mis primeros pasos en la formación de posgrado, y con su ejemplo, comprendí la necesidad e importancia de la formación continua, un camino iniciado pero sin final, un compromiso con la profesión; y así nuevamente, en el 2002 concluí la Especialidad en Química Clínica. Esta descripción de mi carrera académica, es solo una anécdota que traigo para agradecer a quien llegó en última instancia a mi vida, incluso después que había empezado a transitar el camino de esta tesis doctoral; la que me otorgó el título que más valoro y llena de orgullo, y no es licenciado, especialista o doctor, sino “papá”, mi querido hijo, Juan Ignacio (juany) en quien siempre pienso y adoro, que tiene la risa más contagiosa que he sentido, capaz de borrar cualquier momento triste o difícil, de quien espero poder seguir aprendiendo; y por supuesto, como no agradecer a quien hizo posible concebir este bello ser, su mamá Romina, que tanto da, hace y dedica para que crezca rodeado de amor y valores nobles.

Quiero agradecer a mi familia, chica, pero no menos importante, porque siempre están, directa o indirectamente, a mi vieja, “la Irma”, que simple y sencillamente me banca, en todo sentido y de muchas formas; quien mejor que ella puede explicar lo que es reponerse de adversidades y sacar fuerzas para seguir y no dejarse caer. A mi hermano, Guille, ejemplo de intelectualidad y trabajo, constancia y dedicación; y todos los integrantes de su hermosa familia, Mary, Flopy y Juampy, porque aunque estén lejos físicamente, el sólo hecho de saber que existen, es un empujón de fuerza, contención y optimismo. Hay más integrantes, muchos ya no están físicamente (mi viejo, abuelos, tíos), viendo fotos, y recordando momentos,

algunos lejanos en el tiempo, estoy seguro que llegué aquí, a este punto académico y profesional, pero por sobre todo personal, por su obrar; tantas tareas fueron, tantos días y años, tantos aspectos en los que trabajaron y aportaron para que hoy yo pudiera llegar acá. Quiero subrayar alguien más, mi primo Luis, a quien aprecio como un hermano, un ejemplo de lo que es pelearla aunque el camino sea difícil y cuesta arriba, pero si hay voluntad de superación y objetivos nobles, se puede lograr.

Anteriormente mencioné mi paso por la Facultad de Ciencias Químicas de la UCC, a quien debo mi título de grado y ahora también el de posgrado, de la cual soy docente hace 22 años, donde siempre me sentí contenido y cómodo, ejerciendo la docencia con convicción y como reconocimiento a lo todo lo recibido, donde aprendí aspectos de la bioquímica, pero también referidos a lo personal y humano. También agradezco el apoyo económico de la Secretaría de Posgrado de la UCC, quienes creyeron, confiaron y apostaron por mi formación.

Que puedo decir de mi director de tesis, Gustavo (el flaco), que me formó académicamente y soportó personalmente. Con quien tuve contacto por primera vez en 2002, siendo evaluador en el tribunal de mi examen de especialista; profesional preparado, serio y respetable, querido y reconocido en el medio y dentro de la facultad, que me inspiró un ideal de superación constante. Poco más de 10 años después, tengo el honor que dirija mi tesis; y hoy mi perspectiva y valoración son otras; nunca dejó de ser serio o respetable, sino además, conozco sus cualidades humanas, humilde, trabajador, de trato correcto y agradable, que demostró día a día capacidad intelectual y razonamiento científico, que aceptó el desafío de tomarme bajo su dirección, porque aún sin conocerme, supo hacer las cosas amenas, llevaderas y fructíferas; y aunque su tarea está cumplida con distinciones, anhelo seguir aprovechado su guía, tanto académica como personal.

A la comisión de tesis, Roxana Cano, Néstor García y Néstor Soria, por su calidad académica y calidez personal, tiempo dedicado, aportes y contribuciones, por hacer distendidas la reuniones y haberme abierto la cabeza. Quiero profundizar el reconocimiento para Néstor Soria, quien personalmente me brindó ayuda en mi comienzo con la biología molecular con quien compartimos distendidas y divertidas reuniones, una gran persona, más allá de lo académico; y Roxana, ejemplo de capacidad, tenacidad profesional y personal, quien fuera mi docente en el grado y en la actualidad compartimos la cátedra de Análisis Clínicos desde hace varios años.

Un párrafo lo quiero dedicar al Laboratorio LACE, donde no sólo trabajo desde hace 17 años siendo mi principal sustento económico, sino que me abrieron las posibilidades al poder disponer de tiempo y equipamiento, para la concreción del trabajo de tesis. A todos

aquellos directivos o compañeros que me ayudaron, o simplemente facilitaron mi camino para que lo recorra de manera más simple, Osvaldo, Laura, Gustavo, Susana P., Maribel, Paola, Susana V., a mi gran compañero de facultad, trabajo y salidas, colega y amigo Cristian, siempre me voy a quedar escaso de elogios, porque lo respeto como profesional, formado y competente, además aprecio como persona, dispuesta y atenta, gracias por todo, lo de antes, ahora y siempre, gracias por tu amistad.

Un reconocimiento al Laboratorio 8, el CIBICI (Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología) y la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, porque a pesar de no ser de la casa, me abrieron las puertas y trataron como si lo fuera. A los integrantes, que están y que estuvieron, Cecilia, Gustavo, Pablo, Coti, Alejandra, Javier, Valeria, Maxi, Vicki y Pauli; por su ayuda, guía y predisposición para quien era nuevo, de afuera y mayor de edad...

Especialmente quiero agradecer a Darío, porque fue directamente el más implicado en mi ayuda, desde un dato, método, software o aporte académico, totalmente desinteresado y colaborativo, incluso más allá de su responsabilidad y trabajo; espero que en cada cosa que realices, tengas la misma suerte que tuve yo, de poder contar con alguien así. Otro Profesional (bien digo con mayúsculas), es Ricardo, porque con su trabajo de reclutamiento de pacientes, análisis de parámetros, aportes de datos, etc., contribuyó de manera invaluable en la concreción de esta tesis.

No hay contribuciones pequeñas o grandes, si todas y cada una muy importantes, enumeraré a aquellas personas que tengo actualmente muy presente y seguramente debería hacerlo con más, no quisiera dejar de mencionar a nadie, pero necesitaría la misma extensión de este trabajo sólo para agradecerles y expresar mi sentimiento y reconocimiento. Este trabajo de tesis fue un camino recorrido de cuatro años, muchas personas participaron, en mayor o menor grado, de una forma u otra, directa o indirectamente, al principio o al final, siempre positivamente; miro atrás, pienso en lo hablado, lo leído o dicho, y estoy en lo cierto cuando afirmo que mi tesis fue un barco que me llevó a un nuevo destino intelectual y académico, de mayor responsabilidad y compromiso, y en ese acontecer cuantos remaron para que se pueda concretar, a todos ellos... **GRACIAS!!!**

ÍNDICE GENERAL

Índice General	i
Lista de Abreviaturas	vi
Lista de Figuras	ix
Lista de Tablas	xi
Resumen	xii
Palabras Clave	xv
Summary	xvi
Keywords	xviii

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Enfermedad cardiovascular: Generalidades	2
1.2 Riesgo cardiovascular	3
1.3 Categorización de las lesiones ateroscleróticas	5
1.4 Diagnóstico de aterosclerosis.....	7
1.5 Fisiopatogenia de la aterosclerosis.....	9
1.5.1 Disfunción endotelial	10
1.5.2 Citocinas y receptores de citocinas	12
1.5.3 Rol desempeñado por receptores <i>scavenger</i> y <i>Toll-like</i>	15
1.5.3.1 Receptores <i>scavengers</i> AI y AII.....	15
1.5.3.2 Receptor <i>scavenger</i> CD36.....	15
1.5.3.3 Otros receptores <i>Scavenger</i>	16
1.5.3.4 Receptores tipo <i>Toll</i>	16
1.5.4 Formación de <i>Foam Cells</i> en aterosclerosis.....	17
1.5.5 Migración y reclutamiento celular a la pared arterial	18
1.5.5.1 Monocitos/macrófagos	18
1.5.5.2 Otros componentes celulares	21
1.5.6 <i>LDL receptor-related protein-1</i> (LRP-1)	23
1.6 LRP-1, monocitos y aterosclerosis	26
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo General.....	29
2.2. Objetivos Específicos	29

3. PACIENTES, MATERIALES y MÉTODOS.....	30
3.1 Tipo de estudio y pacientes.....	31
3.2 Criterios de exclusión	31
3.3 Historia clínica.....	31
3.4 Evidencia de placa de ateroma.....	32
3.4.1 Estudio por Eco-Doppler de placa Carotídea (PAC)	32
3.4.2 Puntaje de calcio coronario (PCC).....	33
3.5 Determinaciones bioquímicas.....	33
3.5.1 Equipamiento	33
3.5.2 Reactivos.....	34
3.5.3 Glucosa	34
3.5.4 Insulina.....	35
3.5.5 Colesterol total.....	35
3.5.6 LDL-colesterol.....	35
3.5.7 HDL-colesterol	36
3.5.8 Triglicéridos	36
3.5.9 Apolipoproteínas A1	36
3.5.10 Apolipoproteínas B100	36
3.5.11 Lipoproteína (a).....	36
3.5.12 Proteína C reactiva ultrasensible.....	37
3.5.13 Hemoglobina glicosilada	37
3.5.14 Creatinina.....	37
3.5.15 Parámetros hematológicos	37
3.6 Estimación del riesgo cardiovascular	37
3.7 Definición de grupos comparativos para el estudio.....	38
3.8 Obtención de células mononucleares.....	39
3.8.1 Equipamiento	39
3.8.2 Reactivos.....	39
3.8.3 Procedimiento	39
3.9 Citometría de flujo y aislamientos celulares por citometría (<i>sorting</i>)	40
3.9.1 Equipamiento y análisis de datos.....	41
3.9.2 Reactivos.....	41
3.9.3 Anticuerpos	42
3.9.4 Procedimiento	42

3.9.4.1 Separación de subpoblaciones de leucocitos por FACS <i>sorting</i>	43
3.9.4.2 Separación de subpoblaciones de monocitos por FACS <i>sorting</i>	43
3.9.4.3 Expresión proteica de LRP-1 y CD36 en superficie celular por FACS.....	44
3.10 Expresión proteica de LRP-1 y CD36 en lisados de leucocitos (<i>Western Blot</i>)	44
3.10.1 Equipamiento	44
3.10.2 Reactivos.....	45
3.10.3 Anticuerpos	47
3.10.4 Procedimiento	47
3.11 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR).....	47
3.11.1 Equipamiento	49
3.11.2 Reactivos.....	49
3.11.3 Diseño de cebadores.....	50
3.11.4 Procedimiento	50
3.11.4.1 Obtención del ARNm de biomarcadores y su cuantificación	50
3.11.4.2 Retrotranscripción del ARNm de los biomarcadores propuestos	52
3.11.4.3 RT-qPCR	52
3.11.4.4 Expresión de los resultados	53
3.11.4.5 Validación de los fragmentos amplificados.....	53
3.11.4.6 Estandarización de los cebadores.....	55
3.12 Análisis estadístico.....	57
4. RESULTADOS.....	59
4.1 Expresión de biomarcadores en leucocitos.....	60
4.2 Niveles de expresión proteica (LRP-1 y CD36) en leucocitos	61
4.3 Expresión de biomarcadores en leucocitos (Gradiente de Ficoll versus FACS).....	62
4.4 Expresión de biomarcadores en subpoblaciones de monocitos.....	64
4.5 Expresión de biomarcadores en individuos con bajo riesgo de ECV (BR)	

y con aterosclerosis subclínica (AtS).....	66
4.6 Expresión de LRP-1 y CD36 en superficie celular de monocitos totales y subpoblaciones monocíticas por FACS	70
4.7 Expresión de ARNm específico de LRP-1, CD36 y MSR-1 en células mononucleares por RT-qPCR	73
4.8 Expresión de ARNm de citocinas en células mononucleares por RT-qPCR	74
4.9 Expresión de ARNm de quimiocina y su receptor en células mononucleares por RT-qPCR	75
5. DISCUSIÓN	77
5.1 Perspectivas	83
6. CONCLUSIONES	85
7. BIBLIOGRAFÍA	87

Lista de Abreviaturas

ABCA-1	Del Inglés, <i>ATP-Binding Cassette Transporter 1</i>
ABCG-1	Del Inglés, <i>ATP-binding Cassette Sub-family G Member 1</i>
ACAT-1	Del Inglés, <i>Acetyl-CoA Acetyltransferase 1</i>
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AGE	Del Inglés, <i>Advanced Glycation Endproducts</i>
AHA	Del Inglés, <i>American Heart Association</i>
α_2 -M	α_2 -Macroglobulina
Apo	Apolipoproteína
APP	Del Inglés, <i>Amyloid Precursor Protein</i>
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico (mensajero)
ARNr	Ácido Ribonucleico (ribosomal)
ATP	Adenosina trifosfato
AVAD	Años de vida ajustados por discapacidad
CD	Del Inglés, <i>Cluster of Differentiation</i>
CD	Células dendríticas
CE	Células endoteliales
CML	Células musculares lisas
ECNT	Enfermedades crónicas no transmisibles
ECV	Enfermedad cardiovascular
EGF	Del Inglés, <i>Epidermal Growth Factor</i>
ELAM	Del Inglés, <i>Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule 1</i> (o E-Selectina)
eNOS	Del Inglés, <i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
FC	Del Inglés, <i>Foam Cells</i>
FGF	Del inglés, <i>Fibroblast Growth Factor</i>
FS	Del Inglés, <i>Framingham Score</i>
HDL	Del Inglés, <i>High-density Lipoproteins</i>
HSP	Del Inglés, <i>Heat Shock Proteins</i>
ICAM-1	Del Inglés, <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IMT	Del Inglés, <i>Intima-media Thickness</i>
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina

IFN	Interferón
iNOS	Del Inglés, <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
IRF-3	Del Inglés, <i>IFN-regulatory Factor 3</i>
kDa	Kilo Daltons
LDL	Del Inglés, <i>Low-density Lipoproteins</i>
LDLac	Lipoproteínas de baja densidad acetiladas
LDLox	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
LDL-R	Del Inglés, <i>Low-density Lipoproteins Receptor</i>
LFA-1	Del Inglés, <i>Lymphocyte Function-associated Antigen 1</i> o CD11a/CD18
LO	Lipooxigenasas
LOX-1	Del Inglés, <i>Lectin-like Oxidized Low-density Lipoprotein Receptor 1</i>
LPS	Lipopolisacárido
LRP-1	Del Inglés, <i>Low-density Receptor-related Protein 1</i>
LXR	Del Inglés, <i>Liver X Receptor</i>
Mac-1	Del Inglés, <i>Macrophage-1 Antigen (or Integrin $\alpha_M\beta_2$)</i> o CD11b/CD18
MCP-1	Del Inglés, <i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i> (o CCL2)
M-CSF	Del Inglés, <i>Macrophage Colony-stimulating Factor or Colony Stimulating Factor 1</i>
MHC	Del Inglés, <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIF	Intensidad de Fluorescencia Media
mm	Milímetros
MMP	Del Inglés, <i>Metalloproteinase</i>
MPO	Mieloperoxidasas
MSR-1	Del Inglés, <i>Macrophage Scavenger Receptor 1</i>
MyD88	Del Inglés, <i>Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88</i>
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH ⁺	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NCEP-ATPIII	Del Inglés, <i>The National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III</i>
NF- κ B	Del Inglés, <i>Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of Activated B Cells</i>
NK	Del Inglés, <i>Natural Killers</i>
nm	nanómetros
NMR	Del Inglés, <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>

NO	Del Inglés, <i>Nitric Oxide</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAC	Placa Ateroesclerótica Carotidea
PAI-1	Del Inglés, <i>Plasminogen Activator Inhibitor 1</i>
pb	Pares de bases
PCC	Puntaje de Calcio Coronario
PDAY	Del Inglés, <i>Pathobiologic Determinants of Atherosclerosis in Youth</i>
PDGF	Del Inglés, <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PCR	Proteína C reactiva
PROCAM	Del Inglés, <i>Prospective Cardiovascular Münster Study</i>
PRR	Del Inglés, <i>Pattern-recognition Receptor</i>
PSGL-1	Del Inglés, <i>P-Selectin Glycoprotein Ligand 1</i>
PZP	Del Inglés, <i>Pregnancy Zone Protein</i>
RE	Retículo endoplásmico
RNS	Del Inglés, <i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	Del Inglés, <i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa
SCORE	Del Inglés, <i>European Systematic Coronary Risk Evaluation</i>
SR	Del Inglés, <i>Scavenger Receptor</i>
SR-AII	Del Inglés, <i>Scavenger Receptor Class AII</i>
SR-BI	Del Inglés, <i>Scavenger Receptor Class BI</i>
TC	Tomografía Computada
Th	Linfocitos T colaboradores
TF	Del Inglés, <i>Tissue Factor (or Platelet Tissue Factor)</i>
TGF- β	Del Inglés, <i>Transforming Growth Factor β</i>
TLR	Del Inglés, <i>Toll-like Receptor</i>
TNF- α	Del Inglés, <i>Tumor Necrosis Factor α</i>
Rreg	Linfocitos T reguladores
uPAR	Del Inglés, <i>Urokinase-type Plasminogen Activator</i>
VCAM-1	Del Inglés, <i>Vascular Cell Adhesion Protein 1</i>
VEGF	Del inglés, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VLA-4	Del Inglés, <i>Very Late Antigen-4 (or Integrin $\alpha_4\beta_1$)</i>
VLDL	Del Inglés, <i>Very Low-density Lipoproteins</i>

Lista de Figuras

Figura 1: Causas de muerte a nivel mundial según el sexo.....	2
Figura 2: Migración y reclutamiento celular.....	11
Figura 3: Evolución de la placa de aterosclerosis.....	12
Figura 4: Citocinas.....	14
Figura 5: Metabolismo del colesterol en macrófagos.....	18
Figura 6: Moléculas expresadas en superficie de las subpoblaciones de monocitos humanos.....	19
Figura 7: LDL receptor-related protein-1 (LRP-1).....	23
Figura 8: Representación esquemática de la citometría de flujo y FACS <i>sorting</i>	41
Figura 9: Representación esquemática de RT-qPCR.....	48
Figura 10: Electroforesis de ARN.....	52
Figura 11: Electroforesis de fragmentos amplificados (LRP-1; CD36; MSR-1; CCL2).....	54
Figura 12: Electroforesis de fragmentos amplificados (TNF- α ; CCR2; GADPH; IL-1 β).....	54
Figura 13: Curvas T _m (LRP-1; CD36; MSR-1; GADPH; TNF- α ; IL-1 β ; CCL2; CCR2).....	55
Figura 14: Curvas de eficiencia de amplificación.....	57
Figura 15: Citometría de flujo (FACS) de células de sangre periférica.....	60
Figura 16: Expresión relativa de ARNm de biomarcadores en leucocitos de sangre periférica.....	61
Figura 17: Ensayos de <i>Western Blot</i> para LRP-1 y CD36 en subpoblaciones de leucocitos separadas por FACS.....	62
Figura 18: Análisis comparativo de biomarcadores de monocitos aislados por FACS versus células mononucleares obtenidas por gradiente de Ficoll.....	63
Figura 19: Estrategia de separación de subpoblaciones de monocitos.....	64
Figura 20: Expresión relativa de ARNm de biomarcadores en subpoblaciones de monocitos de sangre periférica.....	65
Figura 21: Perfil monocítico en sangre periférica.....	69
Figura 22: LRP-1 en superficie celular de monocitos totales.....	70
Figura 23: LRP-1 en superficie celular de subpoblaciones de monocitos.....	71
Figura 24: CD36 en superficie celular de monocitos totales.....	72
Figura 25: CD36 en superficie celular de subpoblaciones de monocitos.....	73
Figura 26: Expresión de ARNm de biomarcadores en células mononucleares de sangre periférica.....	74
Figura 27: Expresión de ARNm de biomarcadores inflamatorios en células	

mononucleares de sangre periférica	x
mononucleares de sangre periférica	75
Figura 28: Expresión de ARNm de CCL2 y CCR2 en células mononucleares de sangre periférica.....	76

Lista de Tablas

Tabla I: Algoritmo de clasificación de riesgo de ECV usado por NCEP-ATPIII.....	4
Tabla II: IMT en sujetos sin aterosclerosis (mm)	8
Tabla III: Clasificación del puntaje de calcio coronario según la severidad de la aterosclerosis.....	8
Tabla IV: Fenotipos de macrófagos M1 y M2	21
Tabla V: Anticuerpos para citometría de flujo (FACS y FACS <i>sorting</i>).....	42
Tabla VI: Anticuerpos para <i>Western Blot</i> de LRP-1 y CD36 en lisados de leucocitos.....	47
Tabla VII: Cebadores utilizados para RT-qPCR	50
Tabla VIII: Eficiencia de RT-qPCR de los genes estudiados.....	56
Tabla IX: Características antropométricas, clínicas y bioquímicas de los individuos estudiados	67
Tabla X: Puntajes de riesgo cardiovascular de los individuos estudiados.....	68
Tabla XI: Parámetros leucocitarios de las muestras estudiadas	69

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) ocupan el primer lugar mundial en cuanto a morbilidad y mortalidad, con un estimado de 17,5 millones de muertes en 2014, lo que representa el 31% de todas las muertes. La causa principal de ECV, es la aterosclerosis, la cual se define como un proceso inflamatorio crónico de la pared arterial, originado por disfunción endotelial que conlleva a la acumulación subendotelial, mediada por una marcada dislipemia, de lipoproteínas de baja densidad (LDL), que se vuelven susceptibles a modificaciones oxidativas o enzimáticas, convirtiéndose en lipoproteínas modificadas que no pueden ser reconocidas por su receptor natural (LDL-R). Esta acumulación anómala de LDL modificadas origina que células endoteliales (CE), expresen diversas moléculas de adhesión (I-CAM y V-CAM), que facilitan el reclutamiento y adhesión de leucocitos circulantes. Se desencadena así, una marcada secreción de quimiocinas que promueven la infiltración y proliferación celular a nivel de la íntima arterial de monocitos, linfocitos T, neutrófilos y células musculares lisas (CML). En particular, los monocitos circulantes reconocen las moléculas de adhesión expresadas en las CE iniciando de manera temprana los procesos de adhesión y diapédesis a nivel endotelial, para luego transformarse en macrófagos en el espacio subendotelial, capaces de internalizar lipoproteínas modificadas por endocitosis mediada por receptores del tipo LRP-1 (por *low density lipoprotein receptor-related protein 1*) y receptores *scavenger*, como CD36 (del inglés, *Cluster of Differentiation*, también conocido como *Platelet Glycoprotein 4*) y MSR-1 (del inglés, *Macrophage Scavenger Receptor*), entre otros. De esta manera, la captación mediante éstos receptores induce la transformación de los monocitos-macrófagos en *Foam Cells* (FC) que componen la llamada estría grasa, primera manifestación del proceso aterosclerótico. Los macrófagos activados liberan enzimas lisosomales y especies reactivas que inducen muerte celular y degradación de la matriz extracelular, además de otras citocinas proinflamatorias.

En este microambiente subendotelial, se ha constatado previamente que LRP-1 desempeña varias funciones protectoras contra el desarrollo y progresión de la aterosclerosis. Los mediadores inflamatorios producen disminución de LRP-1 en macrófagos. Por otro lado, LRP-1 es capaz de regular negativamente la vía inflamatoria NF- κ B, limitando la expresión de citocinas proinflamatorias como CCL2 y el reclutamiento celular a la placa. Además, controla la actividad de metaloproteasas, lo cual lo transforma en un regulador de la integridad vascular y el destino de la placa. Asimismo, en etapas avanzadas de la aterosclerosis, se ha demostrado que LRP-1 está altamente expresado en CML y macrófagos,

donde media la captación e internalización de LDL agregadas, llevando a la acumulación de ésteres de colesterol y formación de FC, un acontecimiento clave en el inicio y la progresión de la placa.

En la práctica clínica, los algoritmos de predicción de riesgo, se han utilizado para identificar individuos con alto riesgo de desarrollar ECV a corto plazo, sin embargo, presentan limitaciones y no indican que el paciente haya iniciado o tenga enfermedad aterosclerótica al momento de su evaluación clínica. Una opción para mejorar la certeza de riesgo, es incorporar nuevos biomarcadores y/o métodos de predicción/diagnóstico que identifiquen de manera subclínica la aparición de lesiones ateroscleróticas.

De acuerdo a los antecedentes mencionados, como primera hipótesis se propuso que el nivel de expresión de LRP-1 y de receptores *scavengers* (CD36 y MSR-1) a nivel de la superficie celular del monocito, así como en subpoblaciones monocíticas, resultarían clave en el proceso de adhesión-migración del monocito a nivel de la pared endotelial así como en la expresión de factores proinflamatorios (TNF- α , IL-1 β , CCL2, CCR2) durante la etapa temprana de la aterosclerosis. En este sentido, y como una segunda hipótesis, se plantea que una eventual disminución en la expresión de LRP-1, conjuntamente con un aumento de receptores *scavengers* y factores proinflamatorios en monocitos servirían desde un punto clínico y diagnóstico como biomarcadores tempranos de la aterosclerosis. Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo de tesis fue *“Estudiar potenciales biomarcadores de desarrollo de aterosclerosis desde un enfoque inflamatorio de la enfermedad”* abordando los siguientes objetivos específicos: *“i) Cuantificar el nivel de expresión de LRP-1, receptores scavengers (CD36 y MSR-1) y factores proinflamatorios en la población total de monocitos de sangre periférica; y ii) Medir la expresión diferencial de LRP-1 y receptores scavengers (CD36 y MSR-1) en subpoblaciones de monocitos”*.

Desde lo experimental, se desarrolló un estudio de investigación clínica, observacional prospectivo caso-control, realizado sobre una muestra poblacional de individuos con diferente estratificación de riesgo de ECV, sobre la cual se estudiaron potenciales biomarcadores (LRP-1, CD36, MSR-1, CCL2, TNF- α , IL-1 β y CCR2) abordado desde un enfoque inflamatorio de la aterosclerosis. Para ello se estudiaron individuos clasificados como de “bajo riesgo” de desarrollo de ECV (n=21; 12 mujeres/9 hombres; edad promedio: 36,1 \pm 9,1 años) e individuos con “aterosclerosis subclínica” (n=42; 17 mujeres/25 hombres; edad promedio: 50,4 \pm 8,3 años) determinados mediante parámetros clínicos, bioquímicos y de imágenes (Ecografía Doppler de carótida), analizándose los potenciales biomarcadores a nivel transcripcional (ARNm) y proteico en células mononucleares y monocitos de sangre periférica por ensayos

qRT-PCR y de citometría de flujo (FACS), respectivamente.

Los resultados obtenidos demostraron que los biomarcadores analizados son expresados mayoritariamente en monocitos circulantes con débil o no detectable expresión en otras poblaciones leucocitarias, principalmente linfocitos. Estos resultados permitieron definir que la expresión de los biomarcadores propuestos en células mononucleares de sangre periférica fueron representativos de la expresión en monocitos totales. A su vez, también se observó que los biomarcadores estudiados fueron mayoritariamente expresados en la subpoblación clásica de monocitos ($CD14^{++}/CD16^{-}$), que representa el 80% de los monocitos totales, respecto a lo medido en subpoblaciones intermedias ($CD14^{++}/CD16^{+}$) y no clásicas ($CD14^{+}/CD16^{++}$), con lo cual se estableció que las variaciones de los biomarcadores estudiados en monocitos totales reflejaron los cambios ocurridos a nivel de la subpoblación monocítica clásica.

En ambos grupos de individuos estudiados se establecieron claras diferencias en los parámetros clínicos, antropométricos y bioquímicos que determinaron individuos de bajo y alto riesgo de ECV. No obstante, ambos grupos no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el recuento de leucocitos, porcentaje de monocitos totales y distribución relativa de las subpoblaciones monocíticas. A nivel proteico se observó una marcada disminución de LRP-1 ($p=0,0260$), combinado con el aumento de CD36 y MSR-1 en la superficie celular de monocitos totales en individuos con aterosclerosis subclínica respecto a lo observado en individuos con bajo riesgo. A nivel transcripcional se observó una expresión disminuida del ARNm específico para LRP-1 en células mononucleares de individuos con aterosclerosis subclínica respecto a individuos con bajo riesgo ($p=0,0002$). En cuanto a CD36 ($p=ns$) y MSR-1 ($p<0,0001$) se observó una expresión incrementada a nivel del ARNm en individuos con aterosclerosis subclínica comparado con los de bajo riesgo. Cuando se analizaron los niveles de ARNm para los factores proinflamatorios (TNF- α , IL-1 β , CCL2, CCR2) se observó una significativa activación proinflamatoria en células mononucleares circulantes de individuos con aterosclerosis subclínica respecto a los de bajo riesgo, con aumento en la expresión del ARNm específicos para IL-1 β ($p=0,0014$) y TNF- α ($p=0,0121$) conjuntamente con un aumento en la expresión de la quimiocina CCL2 ($p=0,0069$) y su receptor CCR2 ($p=0,0429$).

En conjunto, estos resultados demuestran que la disminución de LRP-1 combinado con aumentos en los niveles de receptores *scavengers* (CD36 y MSR-1) y factores proinflamatorios en células mononucleares y monocitos totales circulantes representarían nuevos biomarcadores de aterosclerosis subclínica. En este sentido se propone que la

medición de estos biomarcadores en asociación con el seguimiento clínico regular y realización de exámenes de diagnóstico por imágenes constituirían una sustancial mejora en la predicción de ocurrencia de eventos ateroscleróticos y enfermedad cardiovascular.

Palabras Clave

Aterosclerosis – inflamación – monocitos – biomarcadores

Summary

Cardiovascular diseases (CVD) rank first in terms of morbidity and mortality, with an estimated 17.5 million deaths in 2014, representing 31% of all deaths. The main cause of CVD is atherosclerosis, which is defined as a chronic inflammatory process of the arterial wall, caused by endothelial dysfunction that leads to subendothelial accumulation, mediated by dyslipidemia with enhanced plasma levels of low density lipoprotein (LDL), that becomes susceptible to oxidative or enzymatic modifications, becoming modified lipoproteins that can not be recognized by their natural receptor (LDL-R). This abnormal accumulation of modified LDL causes endothelial cells (EC) to express various adhesion molecules (I-CAM and V-CAM), which facilitates the recruitment and adhesion of circulating leukocytes. It triggers a marked secretion of chemokines that promote cellular infiltration and proliferation of monocytes, T lymphocytes, neutrophils and smooth muscle cells (SMC) at the level of the intimal arterial wall. In particular, circulating monocytes recognize the adhesion molecules expressed in EC, initiating early cell adhesion and diapedesis at the endothelial level, and then they are transformed to macrophages in the subendothelial space, capable of internalizing modified lipoproteins, by endocytic receptor, such as low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) and scavenger receptors, including CD36 and Macrophage Scavenger Receptor (MSR-1). In this way, uptake by these receptors induce the cellular transformation of monocytes-macrophages in Foam Cells (FC) that make up the so-called fatty streak, the first manifestation of the atherosclerotic process. Activated macrophages release lysosomal enzymes and reactive species that induce cell death and degradation of the extracellular matrix, in addition to other proinflammatory cytokines.

It has been previously established that LRP-1 plays protective functions against the development and progression of atherosclerosis. Inflammatory factors produce a decrease in LRP-1 in macrophages. On the other hand, LRP-1 is able to regulate in a negative form the NF- κ B inflammatory pathway, limiting the expression of proinflammatory cytokines, such as CCL2, and cellular recruitment into the atherosclerotic plaque. In addition, LRP-1 also controls the activity of metalloproteases, vascular integrity and plaque stability. Likewise, in advanced stages of atherosclerosis, it has been shown that LRP-1 is highly expressed in SMC and macrophages, mediating the uptake and internalization of modified LDL, leading to cholesterol esters accumulation and FC formation, a key event in the progression of the atherosclerotic plaque.

The risk prediction algorithms have been used to identify individuals with high risk of

CVD development in a short term. However, they have limitations and do not predict atherosclerotic disease at the time of clinical examination. One option to improve the certainty of score risk for CVD is to incorporate new biomarkers and/or predictive/diagnostic methods allowing to identify subclinical atherosclerosis.

According to the aforementioned antecedents, as a first hypothesis it was proposed that the expression level of LRP-1 and scavenger receptors (CD36 and MSR-1) at the level of the monocyte cell surface, as well as in monocytic subsets, would be a key in the adhesion-migration process of the monocyte at the level of the endothelial wall as well as the expression of proinflammatory factors (TNF- α , IL-1 β , CCL2, CCR2) during the early stage of atherosclerosis. In this sense, and as a second hypothesis, it is proposed that a possible decrease in the expression of LRP-1, together with an increase in scavenger receptors and proinflammatory factors in monocytes would serve as early biomarkers for the diagnosis of atherosclerosis. Therefore, the general objective of this thesis was to "*Study potential biomarkers of atherosclerosis from an inflammatory approach for this disease*" addressing the following specific objectives: "i) *Quantify the expression level of LRP-1, scavengers receptors (CD36 and MSR-1) and proinflammatory factors in the total peripheral blood monocyte subsets; and ii) Measure the differential expression of LRP-1 and scavenger receptors (CD36 and MSR-1) in monocyte subsets*".

From the experimental procedure, a clinical, prospective observational control case study was conducted on a subset sample of individuals with different risk stratification of CVD, on which potential biomarkers were studied (LRP-1, CD36, MSR-1, CCL2, TNF- α , IL-1 β and CCR2) addressed from an inflammatory approach to atherosclerosis. Hence, individuals classified as "low risk" of CVD development were studied (n=21; 12 women/9 men, average age: 36.1 \pm 9.1 years) and individuals with "subclinical atherosclerosis" (n=42; 17 women/25 men, average age: 50.4 \pm 8.3 years) determined by clinical, biochemical and imaging parameters (carotid Doppler ultrasound), analyzing potential biomarkers at the transcriptional (mRNA) and protein level in mononuclear cells and peripheral blood monocytes by qRT-PCR and flow cytometry assays (FACS), respectively.

The results obtained showed that the biomarkers are mostly expressed in the subset of circulating monocytes with weak or undetectable expression in other leukocyte subsets, mainly lymphocytes. These results allowed defining that the expression of the biomarkers in peripheral blood mononuclear cells correlated with the expression in total monocytes. In turn, it was also observed that the biomarkers studied were mostly expressed in the classical monocyte subset (CD14⁺⁺/CD16⁻), which represents 80% of total monocytes, compared to

that measured in intermediate (CD14⁺⁺/CD16⁺) and non-classical (CD14⁺/CD16⁺⁺) subsets, which established that the variations of the biomarkers studied in total monocytes reflected the changes that occurred at the level of the classical monocyte subset.

In both groups of individuals studied, clear differences were established in the clinical, anthropometric and biochemical parameters that determined individuals with low and high risk of CVD. However, both groups did not show statistically significant differences in the leukocyte count, percentage of total monocytes and relative distribution of monocyte subsets. At the protein level, a significant decrease in LRP-1 was observed ($p=0,0260$), combined with an increase of CD36 and MSR-1 in the cell surface of total monocytes in individuals with subclinical atherosclerosis with respect to individuals with low risk. At the transcriptional level, a decreased expression of specific LRP-1 mRNA was observed in mononuclear cells from individuals with subclinical atherosclerosis with respect to low risk individuals ($p=0,0002$). Regarding CD36 ($p=ns$) and MSR-1 ($p<0,0001$), an increased expression at the mRNA level was observed in individuals with subclinical atherosclerosis compared with low risk individuals. When mRNA levels were analyzed for proinflammatory factors (TNF- α , IL-1 β , CCL2, CCR2), significant activation was observed in circulating mononuclear cells of individuals with subclinical atherosclerosis with respect to those with low risk, with an increased mRNA expression for IL-1 β ($p=0,0014$) and TNF- α ($p=0,0121$) together with an increased expression of CCL2 ($p=0,0069$) and its receptor, CCR2 ($p=0,0429$).

Taken together, these results demonstrate that decreased level of LRP-1 combined with increased expression of scavenger receptors (CD36 and MSR-1) and proinflammatory factors in circulating mononuclear cells and total monocytes would represent new biomarkers of subclinical atherosclerosis diagnosis. In this sense, it is proposed that the measurement of these biomarkers in association with regular clinical follow-up and imaging tests would constitute a substantial improvement in the prediction of occurrence of atherosclerotic events and cardiovascular disease.

Keywords

Atherosclerosis - inflammation - monocytes - biomarkers

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad cardiovascular: Generalidades

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) son de larga duración y evolución lenta. Se estima que seis de cada diez muertes y el 70% de los años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) se deben a las ECNT. Asimismo, se proyecta que para el 2030, más de 3/4 partes de las muertes serán por estas causas, lo que representará el 66% de la carga de enfermedad mundial. En nuestro continente aproximadamente el 77% de las muertes y el 69% de la carga de enfermedad se atribuyen a las ECNT (1, 2).

Los cuatro tipos principales de ECNT son las enfermedades cardiovasculares (como ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares), el cáncer, las enfermedades respiratorias crónicas (como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y el asma) y la diabetes. Estos grupos de enfermedades son responsables de alrededor del 82% de las muertes por ECNT y afectan desproporcionadamente a los países de ingresos bajos y medios, donde se registran casi el 75% de las muertes por ECNT, con un estimado de 28 millones por año de personas menores a los 70 años de edad (2).

Desde el siglo pasado las enfermedades cardiovasculares (ECV) dominan la escena de las ECNT, ocupando el primer lugar en el mundo en cuanto a morbilidad y mortalidad, con un estimado de 17,5 millones de muertes en 2014, lo que representa el 31% de todas las muertes mundiales (Figura 1).

CAUSAS DE MUERTE A NIVEL MUNDIAL

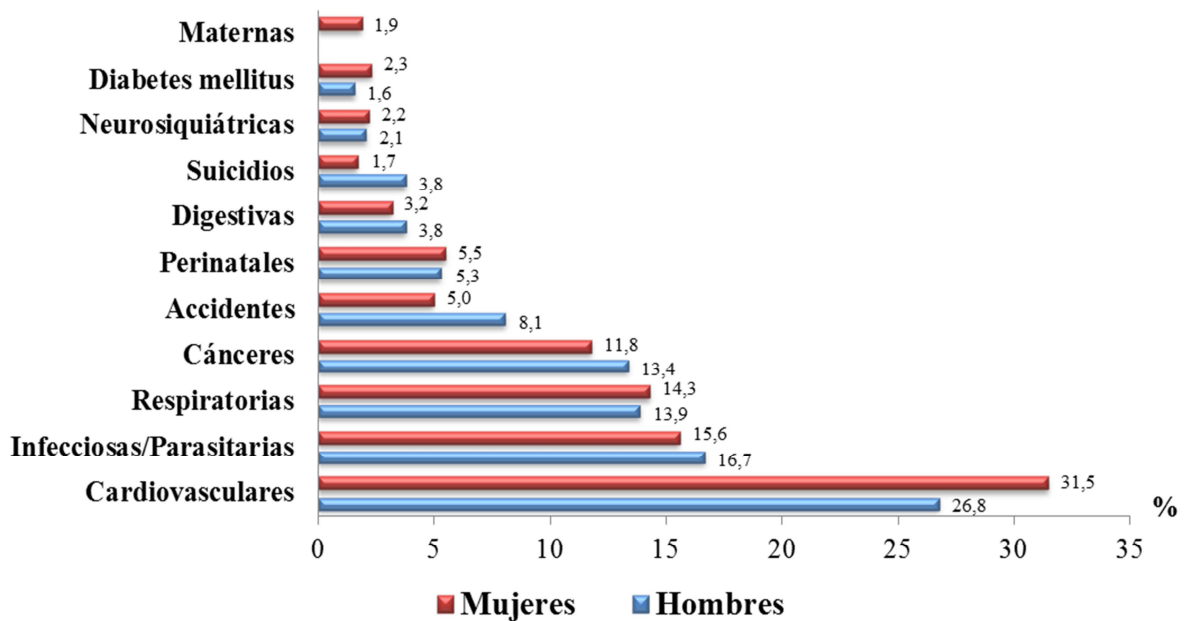


Figura 1 : Causas de muerte a nivel mundial según el sexo [Adaptado de (1)]

De estas muertes, se estima que 7,4 millones se debieron a enfermedad coronaria y 6,7 millones a accidentes cerebrovasculares (1, 2). En Argentina, las ECV asociadas con la producción de aterosclerosis, constituyen un problema sanitario de primer orden, puesto que la tasa de mortalidad ajustada por la edad para hombres y mujeres en 2012 (incluidas las enfermedades coronarias y los accidentes cerebrovasculares), fue de 206,4 por cada 100.000 habitantes (265,4 eventos por cada 100.000 hombres y 161,8 eventos por cada 100.000 mujeres), lo que representa el 34,2% de las muertes (3).

La causa principal de ECV, es la aterosclerosis, del Griego [*ἀθήρα* - *athēr* “pasta grumosa” y *σκλήρωσις* - *sklēr-ōsis* “endurecimiento”], descrita por Galeno de Pérgamo en el año 200 de nuestra era. Las ECV, son un grupo de desórdenes del corazón y de los vasos sanguíneos, entre los que se incluyen: cardiopatía coronaria, enfermedades cerebrovasculares, arteriopatías periféricas, cardiopatía reumática, cardiopatías congénitas, trombosis venosas profundas y embolias pulmonares. Específicamente, dentro de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica, encontramos las siguientes formas de presentación clínica: el síndrome coronario agudo, infarto de miocardio, angina estable o inestable, cirugía de revascularización coronaria u otra cirugía de revascularización, accidente cerebrovascular, ataque isquémico transitorio o enfermedad arterial periférica presuntamente de origen aterosclerótico (4).

1.2 Riesgo cardiovascular

Como consecuencia del envejecimiento poblacional global, y el aumento de ECNT asociadas, pocos temas han recibido tanta atención como la predicción de riesgo cardiovascular. La evaluación del riesgo de ECV, ha sido un elemento clave en los esfuerzos por definir los factores de riesgo, identificar nuevos marcadores, delinear y evaluar posibles objetivos terapéuticos y mejorar la implementación de programas de prevención, tanto primaria como secundaria. Con la publicación del NCEP - ATP III (del inglés, *The National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*) en 2001, y directrices similares de otros organismos nacionales e internacionales, la predicción de riesgo asumió un papel central en el campo de la prevención de las ECV (5 – 7) (Tabla I).

Tabla I: Algoritmo de clasificación de riesgo de ECV usado por NCEP-ATPIII

CATEGORÍA DE RIESGO	DEFINICIÓN	PROYECCIÓN DE RIESGO 10 AÑOS
ALTO	* ECV * ECV de riesgo equivalente (enfermedad arterial periférica, aneurisma aórtico abdominal y enfermedad arterial carotídea o diabetes mellitus) * ≥ 2 factores de riesgo	>20%
MODERADO-ALTO	≥ 2 factores de riesgo	10 – 20%
MODERADO	≥ 2 factores de riesgo	<10%
BAJO	0 – 1 factores de riesgo	-

ECV (enfermedad cardiovascular)

En la práctica clínica, los algoritmos de predicción de riesgo, se han utilizado para identificar individuos con alto riesgo de desarrollar ECV a corto plazo, siendo la manera más apropiada para estratificar individuos que requieren un control médico intensivo de los que, por su bajo riesgo, no lo requieren (6).

Los factores de riesgo coronarios son marcadores en los cuales se ha podido evidenciar una relación causa-efecto entre la presencia del factor y la génesis de la ECV. Existen factores de riesgo clásicos modificables y no modificables (4, 8). Los factores no modificables, son la edad, el género masculino y el antecedente familiar de enfermedad coronaria precoz en parientes directos. Los factores modificables, son las dislipemias que cursan con aumento de LDL (del inglés, *Low-density Lipoproteins*); y disminución de HDL (del inglés, *High-density Lipoproteins*), la hipertensión arterial, el tabaquismo y la diabetes mellitus (4), además se reconocen otros indicadores, como el sedentarismo y la hipertrigliceridemia. En publicaciones recientes se han incorporado otros parámetros, como los aumentos de fibrinógeno, lipoproteína (a), homocisteína, proteína C reactiva (PCR), y la evidencia serológica de infección por *Chlamidia pneumoniae*. Estos últimos los podemos llamar los nuevos factores de riesgo o emergentes (4, 9).

Las evaluaciones de riesgo presentan limitaciones provenientes de las variaciones de factores poblacionales, étnicos e individuales y sólo predicen la posibilidad relativa que un evento cardiovascular (fatal o no fatal) pueda ocurrir en un determinado periodo de tiempo (7). Estos *scores* (puntajes) aplican modelos matemáticos en los que se asignan pesos (puntos) a los niveles de factores de riesgo tradicionales, constituidos por variables continuas (colesterol, HDL; y presión arterial sistólica) y categóricas (diabetes, fumadores, y tratamiento antihipertensivo), que predicen de manera relativa por separado para hombres y

mujeres, la ocurrencia de un evento cardiovascular (10, 11).

Existen varias ecuaciones, como el algoritmo SCORE (del inglés, *European Systematic Coronary Risk Evaluation*) y PROCAM (del inglés, *Prospective Cardiovascular Münster Study*) (6), siendo el más utilizado a nivel mundial, es el puntaje de Framingham (FS, del inglés, *Framingham Score*) con un horizonte a 10 años (FS10) o 30 años (FS30) (11). Sin embargo, presenta algunas debilidades, fundamentalmente el hecho de subestimar el riesgo en jóvenes o mujeres. Numerosos estudios sobre validación del FS10, determinaron fallas en la clasificación de riesgo, de ahí que la recomendación actual es utilizar el FS30 por poseer mejor desempeño diagnóstico (12). No obstante, ninguno de los FS indica que el paciente haya iniciado o tenga enfermedad aterosclerótica al momento de su evaluación clínica. Aproximadamente 1/3 de las personas con 0 ó 1 factor de riesgo, desarrollan enfermedades coronarias y hasta el 40% de los individuos con niveles de colesterol por debajo de la media poblacional mueren de ECV. Una opción para mejorar la certeza de riesgo, sería incorporar nuevos biomarcadores y/o métodos de diagnóstico que identifiquen de manera subclínica la aparición de lesiones ateroscleróticas. Así, una amplia lista de biomarcadores, polimorfismos, métodos de imágenes determinando grosor de la capa íntima-media de carótida y depósitos de calcio de las arterias coronarias, han sido aplicados para evaluación de riesgo (13). En este sentido, el diagnóstico de placa aterosclerótica carotídea (PAC) constituye un predictor directo de eventos coronarios. Por el contrario, un resultado negativo de PAC no indica ausencia de formación de placa en otras arterias. Se ha demostrado que hasta un 20% de individuos con bajo riesgo de enfermedad cardiovascular calculado por FS10 fueron PAC positivos (12). No obstante, por una cuestión de costos, no todos los centros de atención médica disponen de métodos de detección para PAC. En cuanto a la opción de incluir nuevos biomarcadores de detección de aterosclerosis, los avances en el campo de la Bioquímica y de la Biología Molecular y Celular están dando la posibilidad de encontrar indicadores que mejoren la predicción de ocurrencia de eventos ateroscleróticos y enfermedad cardiovascular (14, 15). Un ejemplo es la inclusión de PCR ultrasensible a un modelo con factores de riesgo tradicionales. Mujeres con riesgo previsto por FS de 5-9%, y PCR > 3,0 mg/L; tuvieron una tasa de eventos observados igual o superior a la de mujeres con un riesgo predicho por FS \geq 10% (6).

1.3 Categorización de las lesiones ateroscleróticas

A mediados de la década del 90' la AHA (del inglés, *American Heart Association*),

recomendó una nueva clasificación morfológica basada en seis tipos de lesión (actualmente la categoría 5 y 6 fueron descartadas), que se basan en la progresión de la aterosclerosis (16).

El cambio vascular más temprano descrito microscópicamente, es el engrosamiento de la íntima (tipo I de AHA), que consiste en la acumulación de células musculares lisas (CML) y componentes de la matriz extracelular. Aunque el engrosamiento es más frecuente en arterias propensas a aterosclerosis, tales como arterias coronarias, carotídeas, abdominal descendente, y arteria ilíaca, el cambio se considera adaptativo (no aterosclerótico), porque las CML posteriormente, muestran una actividad proliferativa muy baja y un fenotipo antiapoptótico (17).

El denominado “xantoma de la íntima” o “estría grasa” (tipo II), es una lesión compuesta principalmente por macrófagos cargados de lípidos o *foam cells* (FC) entremezcladas con CML dentro de la íntima rica en proteoglicanos. De los datos surgidos del estudio PDAY (del inglés, *Pathobiologic Determinants of Atherosclerosis in Youth*), está claro que las lesiones pueden regresar con el avance de la edad (15-34 años), pudiendo las FC egresar de la pared pasando entre las células endoteliales (EC) (17).

La más temprana de las lesiones progresivas, es el engrosamiento patológico de la íntima (tipo III), compuesta principalmente de capas de CML en una matriz de proteoglicanos agregada cerca del lumen con lípidos subyacentes, consistente en un área acelular, rica en ácido hialurónico y proteoglicanos (principalmente versican). Otra característica importante de esta lesión, aunque no es constante, es la variable acumulación de macrófagos en la parte luminal de la placa (fuera de la laguna de lípidos). Algunas lesiones presentan en el borde, diferentes grados de pequeñas hendiduras, compuestas de colesterol libre, que se supone deriva de CML necróticas o apoptóticas. Dentro de los acúmulos de lípidos, se observa la presencia de microcalcificaciones (17).

Los fibroateromas (tipo IV), consisten en un núcleo necrótico, que se compone de desechos celulares y se diferencia de la laguna de lípidos presente en el engrosamiento patológico de la íntima. El núcleo necrótico, está cubierto por una capa fibrosa gruesa, que consiste en CML en una matriz de colágeno-proteoglicanos. Algunos subclasifican fibroateromas, en los que tienen núcleos necróticos “tempranos” y “tardíos”. El núcleo necrótico temprano, se identifica por la presencia de FC que infiltran la superficie luminal de los depósitos de lípidos, coincidiendo con la presencia focal de macrófagos calcificantes (osteoclastos) y la presencia de grandes hendiduras de colesterol libre. Una característica es que presentan proteoglicanos, versican, biglican y ácido hialurónico, que típicamente están ausentes en núcleos necróticos tardíos. La mayoría de los macrófagos presentan

características de muerte celular apoptótica, aunque procesos autofágicos también están presentes. Los núcleos necróticos tardíos no muestran matriz colágena, y están rodeados por una capa superpuesta de “tapón fibroso”, compuesto principalmente de colágeno tipo I y III, proteoglicanos y CML intercaladas. El tapón fibroso es crítico para el mantenimiento de la integridad de la lesión y está sujeto a adelgazamiento y ruptura mediada por MMPs (del inglés, *Metalloproteinases*) secretadas por macrófagos y CML (17).

Virmani, y col. y Van Der Wal y col., redefinieron aún más esta clasificación basados en la premisa que la erosión de la placa desencadena trombosis coronaria (16).

1.4 Diagnóstico de aterosclerosis

La estimación del riesgo de eventos cardiovasculares, basada en la presencia de factores de riesgo clásicos, sólo puede identificar 50-70% de los sujetos con aterosclerosis. La adición de imágenes de aterosclerosis a herramientas convencionales de evaluación del riesgo puede mejorar los resultados clínicos. Los métodos diagnósticos basados en imágenes incluyen espesor de la íntima-media de la carótida (IMT, del inglés, *intima-media thickness*), dilatación mediada por flujo de la arteria braquial, velocidad de la onda de pulso y puntaje de calcio coronario. Aunque estas técnicas pueden detectar uno o más indicadores ateroscleróticos, tienen diferencias metodológicas sustanciales que son responsables de las diferencias en su disponibilidad, costo, facilidad de uso, repetibilidad y exposición a la radiación (18).

Desde mediados de la década de 1980, la técnica de ecografía bidimensional de alta resolución, habitualmente disponible en centros de mediana complejidad, se ha afianzado como un método relativamente poco costoso, preciso y reproducible para la evaluación incruenta del lumen y las paredes de grandes arterias, como la aorta, carótidas, ilíacas y femorales. La mayoría de los estudios se han realizado en el territorio carotídeo, fácilmente accesible (carótidas primitivas, bulbo y carótida interna). Mediante esta técnica se obtienen imágenes nítidas de la pared arterial, sobre todo en la pared posterior de la carótida común, donde puede medirse con precisión el espesor del complejo íntima-media (Tabla II). El estudio ecográfico también permite cuantificar el número, altura y tamaño de las placas de ateroma como indicadores de una enfermedad más avanzada. Los estudios demuestran que el riesgo de padecer un primer infarto de miocardio, aumenta a partir de $IMT > 0,82$ mm, mientras que una progresión anual $\geq 0,034$ mm, aumenta notablemente el riesgo de futuros episodios (19).

Tabla II: IMT en sujetos sin aterosclerosis (mm) [Adaptado de (20)]

SEXO	EDADES (años)				
	40-49	50-59	60-69	70-80	
MUJERES	MEDIA±DE	0,68±0,037	0,75±0,041	0,83±0,042	0,87±0,048
	IC 95%	0,61–0,77	0,67–0,84	0,74–0,91	0,77–1,0
	25	0,65	0,72	0,80	0,85
	PERCENTILES 50	0,67	0,74	0,82	0,87
	75	0,69	0,78	0,86	0,90
HOMBRES	MEDIA±DE	0,76±0,038	0,82±0,035	0,87±0,052	0,95±0,050
	IC 95%	0,69–0,84	0,73–0,89	0,77–0,98	0,88–1,005
	25	0,74	0,79	0,84	0,91
	PERCENTILES 50	0,77	0,82	0,87	0,96
	75	0,78	0,85	0,92	1,00

DE (desviación estándar); IC (intervalo de confianza)

Las técnicas de tomografía computada (TC), requieren un equipamiento costoso y, poco disponible, si bien se considera que sus hallazgos (depósitos de calcio coronario), tienen valor predictivo del riesgo de desarrollar episodios clínicos (Tabla III). Sin embargo, hay que tener en cuenta que puede haber placas vulnerables e incluso estenosis graves en ausencia de calcificación. Cuando se compara el puntaje de calcio coronario, IMT y velocidad de la onda de pulso, el primero posee mayor exactitud diagnóstica (19).

Tabla III: Clasificación del puntaje de calcio coronario según la severidad de la aterosclerosis [Adaptado de (21)]

CALCIO CORONARIO			
VALOR ABSOLUTO		VALOR AJUSTADO (SEXO y EDAD)	
VALOR	GRADO CALCIFICACIÓN	PERCENTILO	GRADO CALCIFICACIÓN
0	sin calcificación	0	sin calcificación
0-10	mínima	0-25	mínima
11-100	leve	26-50	leve
101-400	moderada	51-75	moderada
401-1000	severa	76-90	severa
>1000	muy severa	>90	muy severa

La resonancia nuclear magnética (NMR, del inglés, *Nuclear Magnetic Resonance*) puede utilizarse a modo de coronariografía incruenta para el diagnóstico de individuos asintomáticos seleccionados por su alto riesgo. Sin embargo, la visualización de arterias coronarias aparentemente normales por NMR cardíaca convencional, no descarta que existan placas que ocluyen menos del 50% del lumen vascular, con frecuencia vulnerables y

susceptibles de causar episodios isquémicos. La NMR de alta resolución espacial, puede medir el engrosamiento de las paredes de las arterias coronarias y determinar si una placa de ateroma es estable o vulnerable en función de su composición, sin embargo, es una técnica costosa y poco disponible (22).

1.5 Fisiopatogenia de la aterosclerosis

En 1829, el término aterosclerosis fue introducido por primera vez por Jean Lobstein. Años más tarde, las alteraciones inmunitarias celulares asociadas dentro de las arterias fueron descritas por dos diferentes escuelas de patología (23). La primera teoría, postulada por Rudolf Virchow, enfatiza que la patología celular es crítica en la aterosclerosis, reconociendo la naturaleza inflamatoria de las placas (24). La segunda teoría, sostenida por Carl von Rokitansky, sugiere que el daño inicial de la pared del vaso debido a lesiones mecánicas y toxinas conduce a una disfunción endotelial y a una mayor inflamación (23).

Mientras tanto, los experimentalistas sentaron bases para la inmunología moderna. Paul Ehrlich estudió los anticuerpos estableciendo la inmunidad adaptativa. Ilya Mechnikov, descubrió la fagocitosis a finales del siglo XIX, proporcionando la base de la inmunidad innata, pilar del proceso aterogénico actual. Sin embargo, la aplicación de estos conceptos a la aterosclerosis, se retrasó por casi un siglo (25). Más tarde, Mayerl y col., mostraron acumulación de células T ya en lesiones tempranas, sugiriendo que los linfocitos desempeñaban un papel esencial en la aterosclerosis. En la década de 1970, se describió el modelo de respuesta a la lesión (23, 26) que implicaba un metabolismo lipídico desequilibrado y una respuesta inmune adaptativa que provocaba inflamación crónica de la pared arterial (inflamación crónica inducida) cuyo desarrollo ocurre a lo largo de 40 ó 50 años, iniciando en etapas tan tempranas como la infancia y adolescencia. El equilibrio perturbado por la acumulación de lípidos, genera respuestas para su aclaramiento, regidas por el tráfico de leucocitos y la homeostasis orientada por quimiocinas y sus receptores (9). Los avances sobre fisiopatogenia y los actores involucrados en el proceso aterosclerótico, fueron logrados en gran medida, utilizando diferentes modelos animales de experimentación, como cerdos, conejos y particularmente ratones, los que fueron modificados genéticamente, como las cepas *knockout* para el LDL-R (*LDL-R^{-/-}*) (del inglés, *Low-density Lipoproteins Receptor*) o Apolipoproteína E (*ApoE^{-/-}*), que desarrollan hipercolesterolemia y aterosclerosis temprana (27).

1.5.1 Disfunción endotelial

El proceso inflamatorio crónico de la pared arterial, se produce con mayor frecuencia en sitios específicos con flujo laminar perturbado, tales como puntos de ramificación (arterias carótidas, coronarias y aorta). El deterioro funcional y morfológico del endotelio vascular, ocurre primeramente en una larga fase subclínica. La disfunción endotelial y ausencia de una capa luminal continua de elastina, expone proteoglicanos que permiten la acumulación subendotelial de LDL, donde son susceptibles a modificaciones oxidativas por ROS (del inglés, *Reactive Oxygen Species*) o enzimas liberadas (proteolíticas, lipolíticas e hidrolíticas) desde células inflamatorias, lo cual las transforma en lipoproteínas modificadas que no pueden ser reconocidas por su receptor natural, el LDL-R, siendo un proceso clave en el inicio y progresión de la aterosclerosis, porque dispara un proceso inflamatorio local que desencadena la expresión de moléculas de adhesión y la secreción de quimiocinas por las CE que, junto con las quimiocinas derivadas de plaquetas, promueven la infiltración de la capa íntima arterial por monocitos, linfocitos T, neutrófilos y CML (9, 25, 28).

Muchos otros factores desencadenan la activación de las CE además de la dislipemia y las citocinas proinflamatorias. Factores de riesgo como la hipertensión arterial, diabetes, hiperhomocisteinemia y tabaquismo, se asocian con sobreproducción de ROS o mayor estrés oxidativo y menor biodisponibilidad de NO (del inglés, *Nitric Oxide*) (29 – 33), además de sus efectos directos ligados al flujo sanguíneo alterado y estado proinflamatorio crónico. Las CE activadas expresan moléculas de adhesión tales como, VCAM-1 (del inglés, *Vascular Cell Adhesion Protein 1*), ICAM-1 (del inglés, *Intercellular Adhesion Molecule 1*) y E-selectina (o ELAM, del inglés, *Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule 1*), inducidas por citocinas proinflamatorias, tales como TNF- α (del inglés, *Tumor Necrosis Factor α*) e interleucina 6 (IL-6), y lipopolisacáridos bacterianos (LPS). La activación de las CE, induce la transcripción de citocinas proinflamatorias a través de NF- κ B (del inglés, *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of Activated B Cells*), facilitando el reclutamiento y adhesión de los leucocitos circulantes a la pared (33,34). Las citocinas proinflamatorias, puede conducir a disfunción endotelial mediante varios mecanismos además de la expresión de moléculas de adhesión. El TNF- α ejerce varias funciones sobre las CE, como suprimir la formación de trombosmodulina (cofactor anticoagulante), inducir la expresión del Factor Tisular o TF (del inglés, *Tissue Factor or Platelet Tissue Factor*) (cofactor procoagulante), inhibir la expresión de eNOS (del inglés, *Endothelial Nitric Oxide Synthase*), necesaria para la síntesis de NO, y por otra parte, disminuir su biodisponibilidad por inducción de ROS (31, 34). El NO, además de su actividad

vasodilatadora, inhibe la agregación plaquetaria e impide la transcripción del NF- κ B, el cual induce expresión de moléculas VCAM-1, ICAM-1 y MCP-1 (del inglés, *Monocyte Chemoattractant Protein 1*, también conocida como CCL2) que media la quimiotaxis (28).

Los monocitos circulantes reconocen las moléculas de adhesión expresadas en las CE a través de la expresión de PSGL-1 (del inglés, *P-Selectin Glycoprotein Ligand 1*), Mac-1 (del inglés, *Macrophage-1 Antigen or Integrin $\alpha_M\beta_2$*) y el receptor CD11c/VLA-4/LFA-1 (del Inglés, *Very Late Antigen-4 or Integrin $\alpha_4\beta_1$* y *Lymphocyte Function-associated Antigen 1*) (33) pudiendo de esta manera unirse a las CE activadas e iniciar la diapédesis. Los monocitos reclutados al espacio subendotelial se transforman en macrófagos, los cuales junto con CE y CML son capaces de internalizar lipoproteínas modificadas, mediante endocitosis por receptores, como LRP-1 (del inglés, *Low-density Receptor-related Protein 1*) (35) y receptores denominados *scavenger* (SR), como CD36 y el receptor LOX-1 (del inglés, *Lectin-like Oxidized Low-density Lipoprotein Receptor 1*) (36). La captación de lipoproteínas mediante éstos receptores, induce un ingreso celular no regulado de colesterol, acumulación tóxica de lípidos, y transformación en FC (Figura 2).

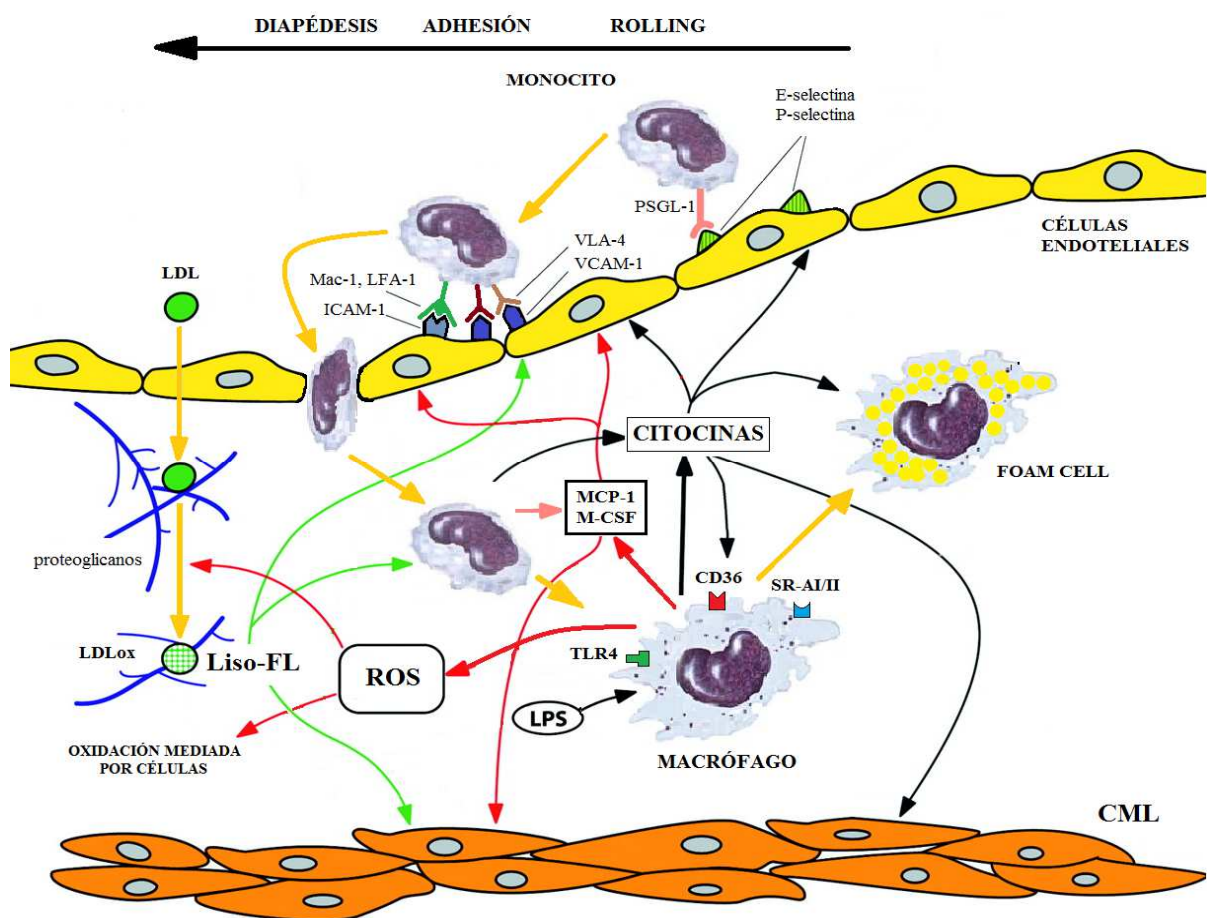


Figura 2: Migración y reclutamiento celular [Adaptado de (37)]

La toxicidad lipídica, genera estrés celular con necrosis y/o apoptosis y el subsiguiente estado inflamatorio que se retroalimenta (9, 25). La acumulación sucesiva de células apoptóticas, restos celulares y cristales de colesterol libre, forman el *core* o núcleo necrótico. El reclutamiento inflamatorio con migración hacia la íntima de CML, induce la secreción de colágeno III, generando un recubrimiento protector del núcleo necrótico, lo cual evita su exposición y estabiliza la placa. No obstante, las células T reclutadas a las placas ateroscleróticas, pueden estimular en macrófagos residentes, la secreción de MMP, provocando adelgazamiento de la placa fibroateromatosa y su probable ruptura (placa inestable), cuyo proceso se acompaña de adhesión y activación de plaquetas, y la producción del Factor Tisular, que induce reducción del calibre efectivo arterial y generación de mayor estenosis o liberación de trombos (8, 25, 26), con aparición de las manifestaciones clínicas propias de la aterosclerosis (Figura 3).

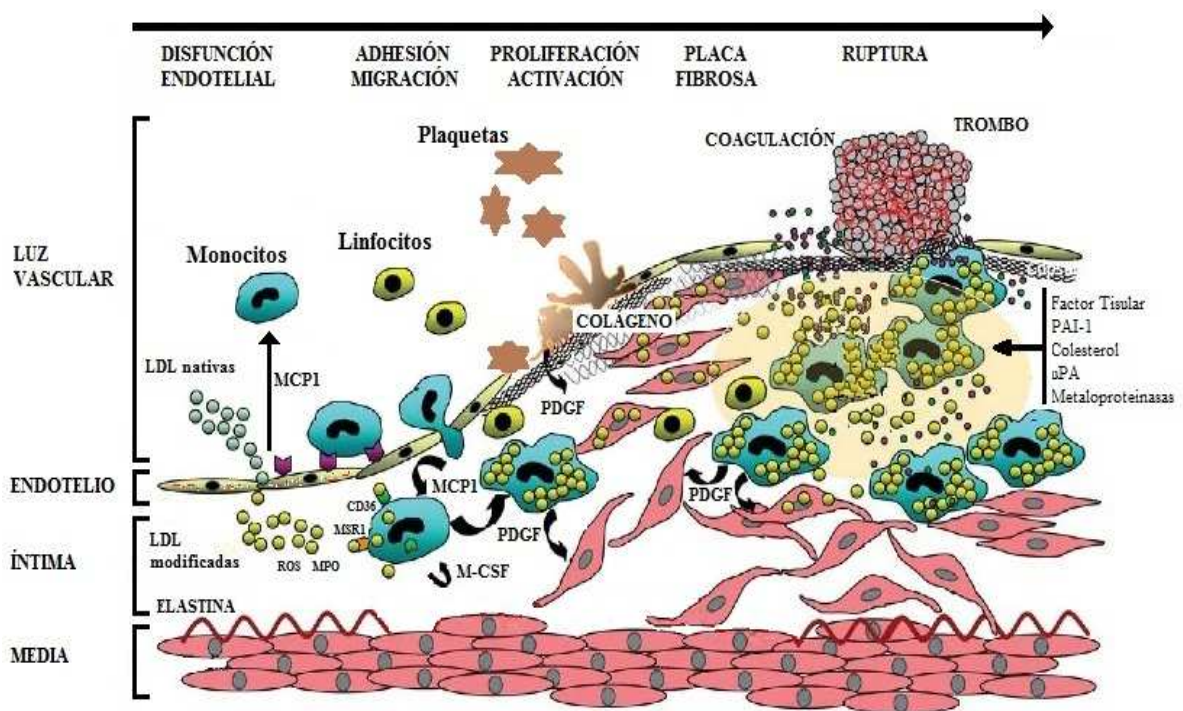


Figura 3: Evolución de la placa de aterosclerosis [Adaptado de (28)]

1.5.2 Citocinas y receptores de citocinas

Estudios en animales y humanos han establecido que la aterosclerosis es impulsada por un proceso inflamatorio crónico dentro de la pared arterial, en respuesta a estructuras modificadas endógenamente. La respuesta innata es estimulada por la activación de CE y monocitos/macrófagos. Posteriormente, se desarrolla una respuesta inmune adaptativa contra

antígenos presentados a los linfocitos T efectores, por células presentadoras de antígenos, CE y CML, que participan mediando el reclutamiento de leucocitos y la remodelación vascular, así como promoviendo la perpetuación de la inflamación, a través de la liberación de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (8, 23, 26, 38, 39). Entre ellas se destaca a CCL2, un potente agonista para monocitos, células T de memoria y basófilos, que está implicado en el reclutamiento de estas células desde la circulación hacia la placa de ateroma (25, 26, 28, 32, 33). Los lípidos oxidados son mediadores de la aterosclerosis y la formación de FC, pues inducen la producción de CCL2 en CE (28, 32). En la íntima arterial, los monocitos se transforman en macrófagos, que acumulan lípidos intracelulares mediante receptores *scavengers* o SR (8, 13, 23, 24). A su vez, las quimiocinas pueden activar factores de transcripción de genes involucrados en la inflamación (NF- κ B), apoptosis y proliferación celular (32). Además, TNF- α , IL-1 e IL-6 también desempeñan un papel clave en la aterosclerosis. Ratones deficientes en *ApoE*^{-/-} y TNF- α ^{-/-}, muestran un tamaño de lesión aterosclerótica significativamente menor asociado con una disminuida expresión de ICAM-1, VCAM-1 y CCL2 (39). IL-1 señala a través de MyD88 (del inglés, *Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88*), que aumenta la expresión de genes proinflamatorios, infiltración por macrófagos e inflamación aterosclerótica (23, 39). El tratamiento de ratones *ApoE*^{-/-} con IL-6, produjo un aumento de 2 veces la extensión de la estría grasa, sin embargo, ratones viejos (más de 1 año de edad), muestran placas estables, con reducido contenido de colágeno y lesiones calcificadas, disminución del reclutamiento de células inflamatorias por síntesis y liberación de IL-10. Así IL-6 muestra propiedades ambivalentes, puede ser proinflamatoria, pero también considerarse antiinflamatoria, ya que induce la síntesis de IL-1Ra y liberación de receptor soluble de TNF- α , reduciendo la actividad de las citocinas proinflamatorias y MSR-1 (39). El M-CSF (del inglés, *Macrophage Colony-stimulating Factor or Colony Stimulating Factor 1*) activa diversas funciones de macrófagos implicadas en la aterogénesis (30), el cual es expresado y secretado por CE y CML en placas ateroscleróticas y constituye uno de los principales factores generadores de FC (41). La IL-12 e IL-18 son producidas principalmente por macrófagos de placa y estimulan la proliferación y diferenciación de células NK (del inglés, *Natural Killers*), células T y expresión de interferón- γ (IFN- γ) que puede activar monocitos/macrófagos y células dendríticas (CD), conduciendo a la perpetuación de la respuesta Th1 (23, 39).

En contraposición a estas citocinas proinflamatorias, IL-10 y TGF- β (del inglés, *Transforming Growth Factor β*), desempeñan un papel importante en el control de la inmunidad adaptativa (39, 42). Estos factores son producidos en macrófagos tipo M2 y

linfocitos Th2 conjuntamente con IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, y aunque son raramente detectados dentro de las lesiones ateroscleróticas ejercerían un efecto preferentemente protector contra el desarrollo de aterosclerosis (39).

Los quimioattractantes y mitógenos de CML son liberados por CE, fibroblastos, leucocitos y las propias CML. Las CML poseen receptores y responden a una serie de quimiocinas, incluyendo PDGF (del inglés, *Platelet Derived Growth Factor*), CCR3, CCR5, CCR8, y CXCR4 (29, 31, 32, 39). El VEGF (del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor*) es un factor angiogénico y mitógeno para las CE, puede aumentar la permeabilidad vascular y modula la trombogenicidad induciendo liberación de prostaciclina y NO, siendo este último, un regulador negativo del VEGF en la pared vascular (17, 26). Además de estos factores, que son generados *in situ* por las CE que interaccionan en las lesiones ateroscleróticas, la trombina retenida por la matriz extracelular, permanece funcionalmente activa, desempeñando un papel clave en la regulación del proceso, porque posee actividad mitogénica para las CE y modula la actividad de MMP que degradan la matriz extracelular y facilitan la migración celular (17, 26, 31).

Las diferentes citocinas, ejercen propiedades proinflamatorias o antiinflamatorias, dependiendo del contexto y la prevalencia de uno u otro grupo dentro de la pared vascular será el curso que tendrá la patología aterosclerótica (32, 39) (Figura 4).

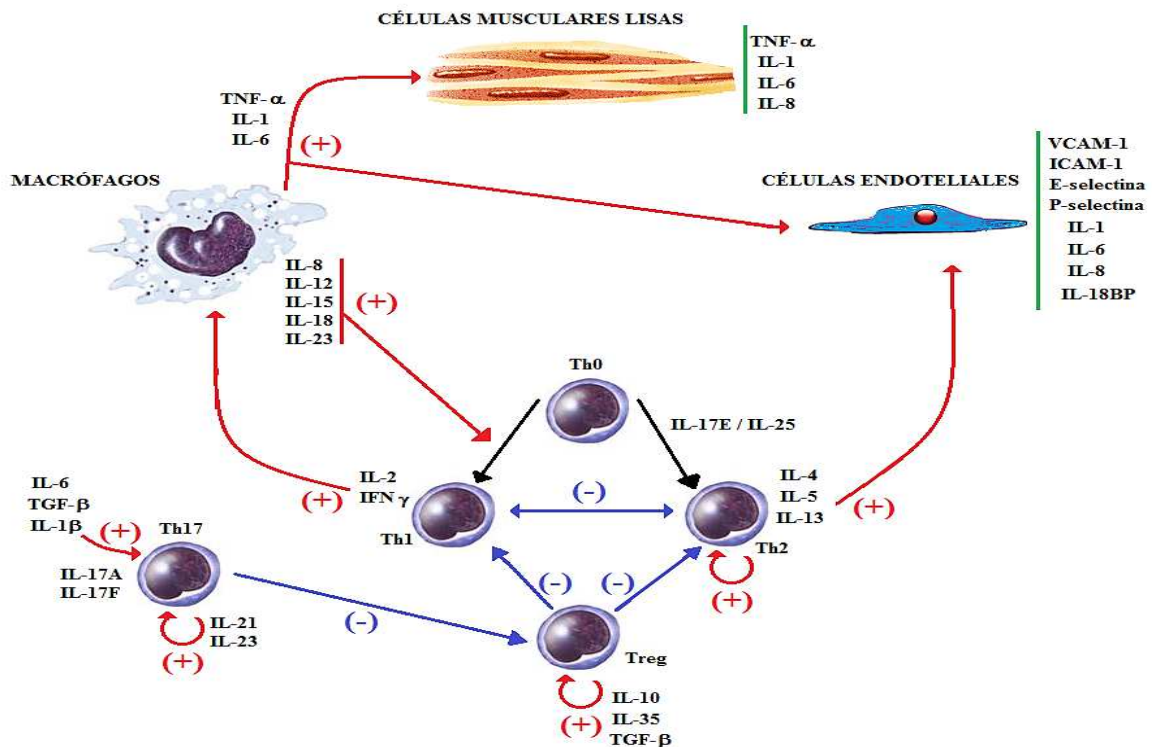


Figura 4: Citocinas [Adaptado de (39)]

1.5.3 Rol desempeñado por receptores *scavenger* y *Toll-like*

Los macrófagos presentes en las lesiones ateroscleróticas, expresan varios receptores estructuralmente diferentes para la absorción de LDL modificadas. Debido a que las FC, son el componente primario de la lesión aterosclerótica más temprana, la absorción de lípidos por estas vías se ha considerado un evento requerido e iniciador en la patogénesis (36). Aunque la eliminación de las LDL modificadas proinflamatorias a través de SR parecería beneficiosa, las vías distales de metabolización son superadas, llevando a la acumulación de colesterol, capaz de inducir inflamación crónica (23, 26, 36, 43). Estas observaciones han llevado al dogma que los SR, son proaterogénicos. Sin embargo, los efectos pueden ser más complejos, además de la captación de LDL modificadas, el receptor CD36, regula la depuración de células apoptóticas, inicia la transducción de señales y sirve como receptor de reconocimiento de agentes patógenos (36). Los SR y TLR (del inglés, *Toll-like Receptors*), son receptores del tipo PRR (del Inglés, *Pattern-recognition Receptor*), expresados por macrófagos y otros tipos celulares con un papel importante en la aterosclerosis. Los SR se caracterizaron originalmente por su capacidad para reconocer y procesar LDL modificadas (25, 26, 44 – 46). Numerosos miembros de la familia de receptores, incluyendo el CD36, MSR-1, LRP-1, LOX-1, CD68, SR-B1 (del Inglés, *Scavenger Receptor Class BI*), pueden promover la formación de FC (36). MSR-1 y CD36, median el 75-90% de la degradación de las LDL modificadas (41).

1.5.3.1 Receptores *scavengers* AI y AII

SR-AI y SR-AII (del inglés, *Scavenger Receptor Class A*) se expresan en macrófagos, incluyendo FC, CE aórticas y CML dentro de la placa aterosclerótica, donde realizan la mayor parte de la captación (~80%) de las LDL acetiladas (LDLac), con menor afinidad por LDLox. Además, unen células apoptóticas, péptido amiloide, fosfolípidos aniónicos y AGE (del inglés, *Advanced Glycation Endproducts*). Ratones deficientes de SR-AI y SR-AII (*MSR-1*^{-/-}) y *ApoE*^{-/-} mostraron una disminución del 58% en las lesiones ateroscleróticas del seno aórtico (36). SR-A, desencadena muerte celular apoptótica, contribuyendo a la formación del núcleo necrótico; sin embargo, esta función proaterogénica se equilibra con la capacidad para reconocer y eliminar células apoptóticas (36).

1.5.3.2 Receptor *scavenger* CD36

CD36 se demostró que era un receptor de macrófagos para la LDL moderadamente oxidada. CD36 une otros ligandos como amiloide, fosfolípidos aniónicos, células apoptóticas, AGE, lipoproteína nativas (LDL, HDL y VLDL, del inglés, *Very Low-density Lipoproteins*), así como trombospondina-1, colágeno, ácidos grasos y ligandos derivados de patógenos (36), contribuyendo a una lista variada de procesos normales y patológicos, tales como depuración de células apoptóticas, transporte de ácidos grasos, adhesión celular, angiogénesis, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer y defensa microbiana. CD36 en macrófagos, contribuye en 60-70% de la acumulación de ésteres de colesterol proveniente de la eliminación de LDLox. Los estudios realizados en ratones *CD36*^{-/-} *ApoE*^{-/-}, reportaron reducciones marcadas (~76%) en el área de la lesión aterosclerótica aórtica, apoyando el paradigma de que la captación de LDLox mediada por CD36 es necesaria para la formación de FC y aterosclerosis (26, 36, 47).

1.5.3.3 Otros receptores *Scavenger*

SR-BI y SR-BII (del inglés, *Scavenger Receptor Class B*) comparten ~30% de homología con CD36 y, al igual que este receptor, puede unirse a ambas formas modificadas de LDL, así como HDL, LDL y VLDL nativas. Además, el SR-BI reconoce células apoptóticas, AGE, fosfolípidos aniónicos, amiloide sérico A y β -amiloide y puede facilitar la captación selectiva y transferencia de colesterol, siendo importante en el transporte reverso de colesterol. SR-BI se considera en su mayor parte antiaterogénico, aunque los ratones *SR-BI*^{-/-}, no desarrollan espontáneamente aterosclerosis (36).

LOX-1, es un receptor para las LDLox, presente principalmente en las células endoteliales, posteriormente se demostró que une otros ligandos, incluyendo AGE, células apoptóticas, bacterias, y que también se expresa en macrófagos y CML. Su sobreexpresión es inducida por LDLox, angiotensina II, endotelina y citocinas, todos participantes de aterosclerosis (36).

1.5.3.4 Receptores tipo *Toll*

Existe suficiente evidencia que no sólo los mediadores metabólicos, sino además las infecciones bacterianas y virales, podrían amplificar la aterosclerosis mediante promoción de un estado proinflamatorio de la pared vascular. Los TLR son receptores del sistema inmune innato que reconocen motivos estructurales altamente conservados de patógenos. La

activación inicia una cascada de señales que activa NF- κ B y factores de transcripción IRF-3 (del inglés, *IFN-regulatory Factor 3*) que conducen a la expresión de genes proinflamatorios (TNF- α e IL-1) e inician la producción de señales que preparan la inmunidad adaptativa. La hiperlipemia activa TLR con producción de citocinas proinflamatorias, NO en macrófagos y maduración de CD. La mayoría de los TLR, señalizan mediante una molécula en común, la MyD88. Los ratones *MyD88*^{-/-} *ApoE*^{-/-} y ratones *ApoE*^{-/-} *TLR4*^{-/-} presentaron una aterosclerosis reducida, asociada con la disminución en los niveles circulantes de citocinas proinflamatorias, IL-12 y CCL2 (23).

1.5.4 Formación de *Foam Cells* en aterosclerosis

Lipoproteínas modificadas son uno de los primeros eventos patogénicos en la placa naciente y dan como resultado el desarrollo de *foam cells* (FC) a través de su captación por SR de macrófagos y CE (36, 41). Los ésteres de colesterol, se hidrolizan para liberar colesterol y ácidos grasos. El colesterol libre es entonces traficado al retículo endoplásmico (RE), donde sufre la reesterificación por ACAT-1 (del inglés, *Acetyl-CoA Acetyltransferase 1*) formando ésteres de ácidos grasos de colesterol. El metabolismo del colesterol puede llegar a ser sobrepasado, con el enriquecimiento de las membranas del RE con colesterol libre, resultando en una esterificación defectuosa por ACAT-1, que promueve la acumulación adicional de colesterol libre. Además, el colesterol libre en membranas, puede potenciar la señalización inflamatoria, en particular la activación de TLR (26, 41, 47, 48). De esta manera, el tráfico de colesterol libre desde los lisosomas también puede resultar defectuoso, lo que constituye una barrera para el flujo de colesterol y amplifica aún más la inflamación. Esta desregulación en el metabolismo lipídico contribuye al estrés del RE en macrófagos, que, si se prolonga y combina con otras injurias, puede resultar en muerte celular apoptótica (41). La depuración eficiente de las células apoptóticas por los macrófagos circundantes (eferocitosis), requiere vías del metabolismo lipídico intactas, para tratar los lípidos ingeridos de los cuerpos apoptóticos. El aumento de la apoptosis, combinado con una eferocitosis defectiva forman el núcleo necrótico (41).

Las células responden a la excesiva acumulación de lípidos sobreexpresando vías que promueven la eliminación del colesterol y otros lípidos. En las FC, existen varios transportadores, como ABCA-1 (del inglés, *ATP-Binding Cassette Transporter 1*), ABCG-1 (del inglés, *ATP-binding Cassette Sub-family G Member 1*) y SR-B1, aunque la difusión pasiva desde la membrana plasmática, también ocurre. ABCA-1 promueve el eflujo de

colesterol a la ApoA1 pobre en lípidos (pre- β HDL), que es el bloque de construcción de HDL, mientras que ABCG-1 promueve el flujo hacia HDL maduras. Los genes que codifican ABCA-1 y ABCG-1 son regulados transcripcionalmente, en respuesta a niveles elevados de colesterol celular por LXR_s (del inglés, *Liver X Receptor*), que son receptores nucleares activados por ligandos que funcionan como sensores de esteroides, tales como oxisteroides o desmosterol. El eflujo de colesterol de macrófagos tiene efectos antiinflamatorios, siendo los agonistas de LXR antiaterogénicos (Figura 5).

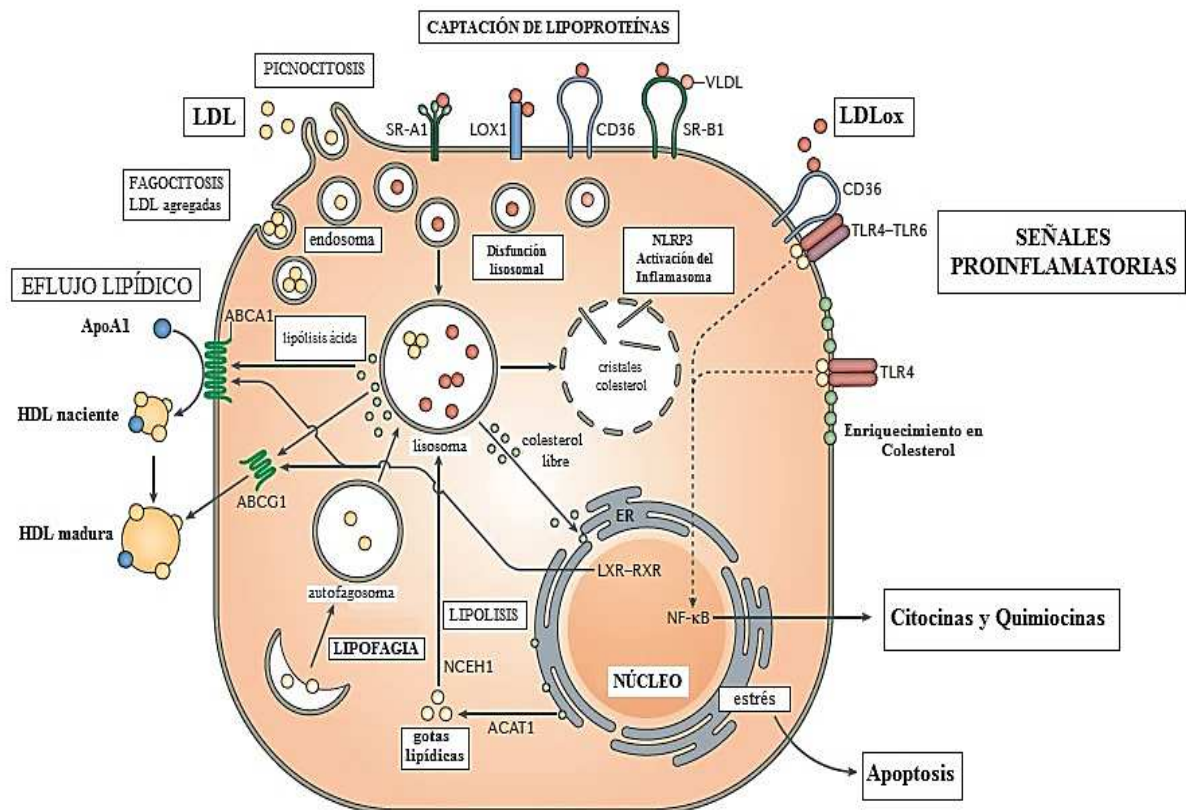


Figura 5: Metabolismo del colesterol en macrófagos [Adaptado de (41)]

1.5.5 Migración y reclutamiento celular a la pared arterial

La respuesta inmune que provoca inflamación de la pared arterial, está orquestada por el reclutamiento celular de leucocitos, plaquetas, CML y CD, dirigidas al sitio por quimiocinas y sus receptores, por lo cual, el componente celular en el proceso aterosclerótico, descrito 200 años atrás, es fundamental para el inicio y perpetuación del componente inflamatorio (9).

1.5.5.1 Monocitos/macrófagos

Durante la patogénesis de la aterosclerosis, los monocitos sanguíneos se infiltran desde la sangre a la íntima y subíntima, un proceso que es activado por la acumulación subendotelial de lipoproteínas que contienen ApoB100 (49). Reclutados por quimiocinas, los monocitos se adhieren a CE a través de interacciones entre moléculas expresadas en ambas superficies celulares. Después que los monocitos rueden (*rolling*) sobre el endotelio activado, utilizan otras interacciones para disminuir la progresión y formar adherencias más estrictas. Por último, sobreviene la entrada de los monocitos en el espacio subendotelial (diapédesis) (25, 26, 28, 33, 49). Tras la infiltración de tejidos, los monocitos se diferencian en macrófagos, CD, o en algunos casos, osteoclastos, activados por la secreción de citocinas específicas (IL-1, TNF- α , IL-8 y GM-CSF), la presencia de bacterias o sus productos (LPS), hipoxia o lipoproteínas modificadas. Los macrófagos activados liberan el contenido de sus gránulos lisosomales preformados y ROS que llevan a la muerte celular y degradación de la matriz extracelular, además de otras citocinas proinflamatorias que potencian la respuesta inflamatoria (23, 26, 34, 37, 39, 41, 50 – 52).

Los monocitos circulantes son heterogéneos en la expresión de receptores de quimiocinas, propiedades de migración y diferenciación (Figura 6). En humanos, tres subpoblaciones pueden ser reconocidas, basadas en la expresión de moléculas de diferenciación CD14 y CD16. Una subpoblación mayoritaria (~81% del total de monocitos) denominada “clásica” (CD14⁺⁺/CD16⁻), y dos minoritarias designada como “intermedia” (CD14⁺⁺/CD16⁺) (~8%), y la tercera o “no clásica” (CD14⁺/CD16⁺⁺) (~11%) (53).

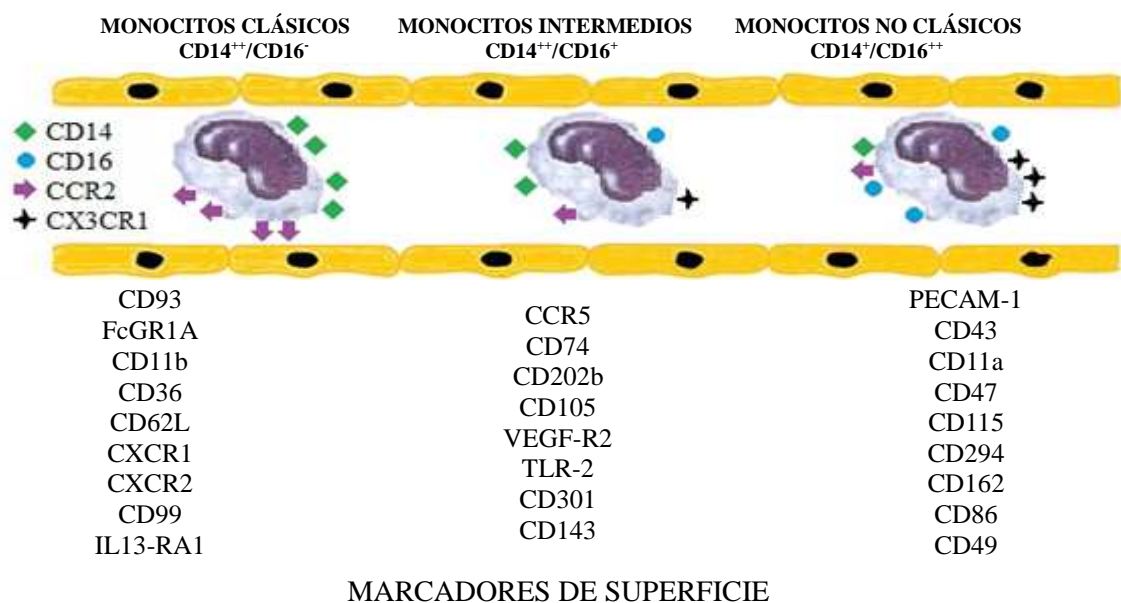


Figura 6: Moléculas expresadas en superficie de las subpoblaciones de monocitos humanos [Adaptado de (54)]

En las etapas iniciales de la aterosclerosis, los monocitos de sangre periférica son reclutados en la íntima vascular, por lo tanto, es de suponer que una determinada subpoblación de monocitos sería la responsable de los eventos tempranos ateroscleróticos en función de la expresión y secreción de moléculas que regulan dicho proceso (54). Los monocitos CD14⁺⁺/CD16⁻ demuestran alta eficiencia para estimular la proliferación de células T CD4⁺ y capacidad proangiogénica. Expresan altos niveles de CCR2, el cual es clave para la quimiotracción en condiciones de inflamación, poseen alta capacidad fagocítica y potencial inflamatorio, siendo los principales productores de ROS en condiciones no estimuladas, además secretan IL-1 β y TNF- α tras la estimulación con LPS. Otra característica importante es que expresan altos niveles de SR. En contraste, la secreción de IL-1 β y TNF- α por monocitos CD14⁺/CD16⁺⁺, se desencadena por virus y ácidos nucleicos (vía TLR-7/TLR-8/MyD88/MEK) y no por la estimulación de LPS. Estos monocitos no clásicos expresan mayor cantidad de CX3CR1 que media la acumulación de monocitos residentes, y menor cantidad de CCR2, además de una amplia gama de moléculas de adhesión, estando predispuestos a la vigilancia local innata de los tejidos, patrullando el endotelio en un comportamiento dependiente de LFA-1 (51, 54).

A partir de 1969, se definió el concepto de sistema fagocítico mononuclear, el cual consiste en una variedad de macrófagos, derivados de monoblastos encontrados en la médula ósea. La diferenciación y maduración de los monocitos es mediada por citocinas denominadas factores estimuladores de colonia (M-CSF y GM-CSF) secretadas por la médula ósea, células pluripotentes, linfocitos T y macrófagos activados. Los macrófagos producen citocinas proinflamatorias, ROS, RNS (del inglés, *Reactive Nitrogen Species*), participan en la retención de lípidos, remodelación de la matriz extracelular y expresan SR y TLR. Por lo tanto, no sólo dirigen y amplifican la respuesta inmune local, sino que pueden conducir a lesión localizada del tejido y, en última instancia, causar desestabilización de la placa, ruptura y trombosis (23, 41, 43, 52). Sin embargo, como los macrófagos son heterogéneos, podrían desarrollar funciones que faciliten la reparación del tejido aterosclerótico, la remodelación y restauración de la homeostasis de tejido normal (26, 43).

La subpoblación de monocitos proinflamatorios puede dar lugar preferentemente a macrófagos que exhiben una activación “clásica” (macrófagos M1) (23, 30). La placa es un microambiente con fuerte inclinación hacia respuestas de linfocitos Th1, lo que resulta en altos niveles de IFN- γ , que podría privilegiar la polarización de macrófagos de tipo M1 (Tabla IV). Dentro de la aterosclerosis murina y humana, están presentes tanto macrófagos M1 como M2 (30). En las lesiones humanas, diferentes fenotipos de macrófagos coexisten, y lo

hacen en diferentes lugares de la placa. Macrófagos M2 (CD68⁺/CD206⁺) residen en áreas más estables de la placa, en la cubierta fibrosa de colágeno, mientras que su contraparte M1 (CD68⁺/CCL2⁺) se localizan en el núcleo lipídico, donde se dan fenómenos de necrosis celular y fagocitosis (30, 55, 56).

Tabla IV: Fenotipos de macrófagos M1 y M2 [Adaptado de (56)]

	M1	M2a	M2b	M2c	M2d
ACTIVACIÓN	IFN- γ LPS GM-CSF	IL-4 IL-13 Infecciones (H y P)	CI IL-1R	IL-10 TGF- β GC	IL-6 LIF Adenosina
MARCADORES EXPRESADOS	CD86 CD80 CD68 CHM II CHM II IL-1R TLR2 TLR4 iNOS SOCS3	CD163 CHM II SR MMR/CD206 CD200R TGM2 IL-1R II	CD86 CHM II	CD163 TLR1 TLR8	VEGF
CITOCINAS SECRETADAS	TNF- α IL-1 β IL-6 IL-12 IL-23	IL-10 TGF- β IL-1Ra	IL-1 IL-6 IL-10 TNF- α	IL-10 TGF- β	IL-10 IL-12 TNF- α TGF- β
QUIMIOCINAS SECRETADAS	CCL10 CCL11 CCL5 CCL8 CCL9 CCL2 CCL3 CCL4	CCL17 CCL22 CCL24	CCL1	CCL2	CCL5 CXCL10 CXCL1

CI (Complejos Inmunes); GC (Glucocorticoides); LIF (Factor Inhibidor de Leucocitos); H y P (hongos y parásitos); CHM (Complejo Mayor de Histocompatibilidad)

1.5.5.2 Otros componentes celulares

Las CD forman una red dentro de la íntima de arterias (23, 49) en contacto con las células T en las placas ateroscleróticas. LDLox, durante la fase tardía de diferenciación de monocitos, da lugar a CD fenotípicamente maduras que segregan IL-12 (proinflamatoria) pero no IL-10 (antiinflamatoria) (23).

Las células T se pueden detectar en todas las etapas de la placa aterosclerótica. Las células T CD4⁺ son las más comunes, la mayoría polarizadas por Th1, expresando las

citocinas proinflamatorias (47). Por el contrario, las células Th2 secretan citocinas antiinflamatorias, y se encuentran con frecuencia en lesiones ateroscleróticas avanzadas. Las células T reguladoras (Treg), fueron capaces de suprimir la inflamación por expresión de IL-10 y TGF- β en modelos murinos (47). Los eventos que inician la activación de las células T, implican ruptura de auto tolerancia y el reconocimiento de antígenos específicos, tales como la LDL nativa y modificada, ApoB-100 y HSP60 (del inglés, *Heat Shock Proteins 60*), dando lugar a una respuesta inmune proaterogénica (47).

La infiltración de neutrófilos ocurre en las primeras etapas del proceso aterosclerótico y durante la ruptura de la placa (26, 47, 57). Los neutrófilos activados secretan proteínas granulares (CRAMP en ratón, LL37 en humanos) en el lado luminal del endotelio arterial, reconocido por receptores expresados en monocitos clásicos y neutrófilos (58). Por otra parte, los neutrófilos liberan MPO capaz de transformar más LDL nativa e incrementar el estado inflamatorio endotelial (57).

Los mastocitos detectados en placas ateroscleróticas humanas son actores clave en la inflamación, capaces de liberar una variedad de mediadores solubles, tales como interleucinas, proteasas y factores de crecimiento, implicados en la enfermedad, incluyendo la desestabilización de la placa, la acumulación de lípidos y el remodelado vascular, a través de mediadores proaterogénicos como IL-6 e IFN- γ (26, 47).

Las CE intactas, pero inflamadas, expresan P-selectina, ICAM-1, o Vitronectina (Integrin $\alpha_v\beta_3$), que permiten la unión directa de plaquetas, o mediante el fibrinógeno o fibronectina unidos al endotelio, de las plaquetas que expresan GPIb, PSGL-1, o $\alpha_{IIb}\beta_3$ (47). Además, diversas interacciones ligando-receptor, tales como Mac-1 y PSGL-1 a GP Ib y P-selectina expresados en plaquetas, pueden mediar la formación de complejos de leucocitos-plaquetas. La transferencia de plaquetas activadas en ratones *ApoE*^{-/-} exacerbó la aterosclerosis, pero no la transferencia de plaquetas deficientes en P-selectina, corroborando un papel directo de las plaquetas en la aterosclerosis (47).

Los linfocitos B fueron descubiertos inicialmente dentro de la adventicia y dentro de placas ateroscleróticas. La transferencia de médula ósea de ratones deficientes en células B a ratones *LDL-R*^{-/-} irradiados, resultó en un aumento de la aterosclerosis de hasta un 40%, en paralelo con una producción disminuida de anticuerpos anti-LDLox. Esto indica que las células B o las inmunoglobulinas pueden realizar funciones protectoras (59). Estos autoanticuerpos tipo IgM, reconocen los fosfolípidos oxidados (fosfatidilcolina), y bloquean la unión y degradación de LDLox por macrófagos in vitro (23).

1.5.6 LDL receptor-related protein-1 (LRP-1)

LRP-1 es un miembro de la familia de receptores para LDL, cuya característica estructural consiste en presentar cinco unidades o dominios comunes: (a) repeticiones ricas en cisteína de unión a ligando, (b) repeticiones de secuencias similares a la del receptor de EGF (del inglés, *Epidermal Growth Factor*); (c) dominios YWTD, (d) un segmento de transmembrana, y (e) un tallo intracitoplasmático que alberga de uno a tres motivos NPxY. LRP-1 se sintetiza como una proteína transmembrana de 600 kDa y en el sistema de Golgi *Trans* sufre un corte proteolítico mediado por furina dando dos subunidades de 515 kDa y 85 kDa, que permanecen unidas entre sí por asociaciones no covalentes (Figura 7). La proteína chaperona denominada RAP (del Inglés *Receptor-associated Protein*) es necesaria para el correcto plegamiento y transporte, además de prevenir la prematura unión a ligandos (35).

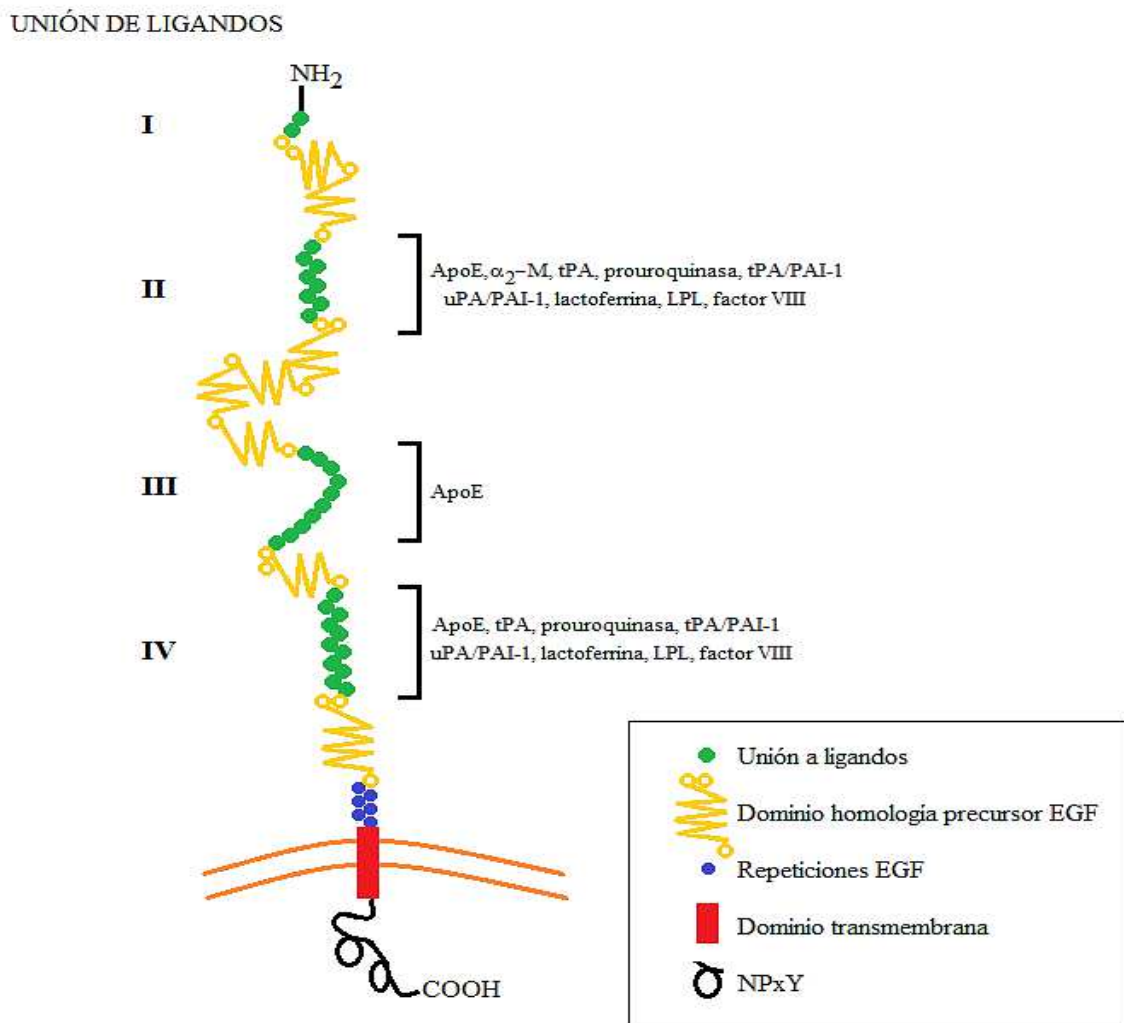


Figura 7: LDL receptor-related protein-1 (LRP-1) [Adaptado de (35)]

Aunque LRP-1 puede localizarse transitoriamente en vacuolas lipídicas, el receptor migra a la membrana plasmática o vesículas estructurales de membranas recubiertas de clatrina, donde experimenta endocitosis y reciclado con alta eficiencia (60).

LRP-1 reconoce al menos 30 ligandos diferentes que incluyen, lipoproteínas, proteasas, complejos inhibidores de proteasas, proteínas de la matriz extracelular, toxinas bacterianas, virus y diversas proteínas intracelulares. Ciertas serinas proteasas y MMP se unen directamente a LRP-1, mientras que otras lo hacen una vez acomplejadas con sus inhibidores específicos, incluyendo los inhibidores de serina proteasas y pan-proteasas, α_2 -Macroglobulina y PZP (del inglés, *Pregnancy Zone Protein*), quienes son reconocidos, después de un cambio conformacional mediado por proteólisis. Por el contrario, LRP-1 reconoce las formas nativas y complejas del inhibidor del TF, trombospondina-1 y trombospondina-2, proteínas intracelulares, incluyendo HSP-96, TAT de HIV-1 y RAP (35).

La variedad de ligandos que unen a LRP-1, potencian este receptor como sensor del microambiente celular. Por múltiples mecanismos, regula la señalización celular y, en última instancia, la fisiología celular y la expresión génica en respuesta a numerosas proteínas extracelulares. Un mecanismo simple por el cual LRP-1 regula la señalización celular implica la unión competitiva de proteínas que activan otros receptores de señalización, de manera que la concentración de la proteína en el microambiente celular disminuye. LRP-1 también regula la señalización celular mediante el tráfico de complejos preformados receptor-ligando en endosomas. La asociación de LRP-1 con el receptor de PDGF en los endosomas, regula los eventos de fosforilación observados cuando las células se tratan con PDGF (60).

En algunos tipos celulares, la endocitosis mediada por LRP-1 se acopla a vías de señalización celular. También regula la composición de la membrana plasmática y puede, por lo tanto, regular indirectamente la actividad de otros receptores de señalización celular (60). Con más frecuencia, las proteínas de la membrana plasmática se unen a LRP-1 mediante ligandos bifuncionales o proteínas adaptadoras intracelulares, como Fe65 y PSD-95. Fe65 une LRP-1 a la proteína precursora de β -amiloide (APP, del inglés, *Amyloid Precursor Protein*), promoviendo la endocitosis y regulando el procesamiento de APP. El puente entre LRP-1 y uPAR (del inglés, *Urokinase-type Plasminogen Activator*) por el complejo bivalente, uPA – PAI-1 (del inglés, *Plasminogen Activator Inhibitor 1*), promueve la internalización uPAR y regula la señalización celular iniciada por éste. Un mecanismo similar está involucrado en la vía por la cual LRP-1, elimina el TF de las superficies celulares (60). Este proceso puede ser inhibido con el antagonista RAP, cuyo agregado a células cultivadas durante 3 a 5 días, conduce a un aumento en la membrana plasmática, de las proteínas reguladas por LRP-1,

hasta que se alcanza un nuevo equilibrio. Los receptores que se incrementan en la superficie celular en células tratadas con RAP incluyen uPAR, APP, Semaphorin4D (60).

LRP-1 ha sido implicado en la presentación de antígenos y en la estimulación de células T CD8⁺. Diversas HSPs, que funcionan como chaperonas para péptidos antigénicos, se unen a LRP-1 cuando son liberadas desde las células. El complejo HSP-péptido antigénico internalizado por LRP-1 trafica al MHC-I (del Inglés, *Major Histocompatibility Complex*) para ser presentado por células presentadoras de antígenos (60).

La supresión génica de LRP-1 específica en CML de ratones ha permitido demostrar que este receptor presentaría una actividad antiaterogénica, limitando la activación de PDGF-R β . En los macrófagos, LRP-1 también inhibe la aterogénesis y se han descrito varios mecanismos relacionados, incluyendo sus efectos sobre la expresión de mediadores inflamatorios, la regulación de la actividad de MMP-9, efectos sobre el TGF- β , y la regulación del depósito de matriz extracelular. Cuando LRP-1 se somete a proteólisis intramembrana, el fragmento citoplasmático puede relocalizar al núcleo, donde se une al IRF-3, promoviendo su exportación y supresión de la expresión de genes blanco de LPS proinflamatorios. Debido a que LPS y otros mediadores inflamatorios promueven la proteólisis de LRP-1, puede constituir una importante vía de inhibición, limitando la amplificación en tejidos ya inflamados. Se han observado niveles aumentados de LRP-1 en el plasma de pacientes con artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico (60).

En algunas células, incluidos los macrófagos, LRP-1 disminuye la abundancia en la superficie celular del TNF-R1, atenuando la activación de la señalización de la quinasa I κ B, requerida para la fosforilación de I κ B que permite la relocalización nuclear de NF- κ B, dando lugar a una expresión aumentada de proteasas del complemento, activador del plasminógeno y mediadores inflamatorios, tales como iNOS (del inglés, *Inducible Nitric Oxide Synthase*) y la IL-6. Las lesiones ateroscleróticas de ratones con monocitos y macrófagos deficientes en LRP-1, muestran niveles aumentados de CCL2, el cual se asocia con un aumento de la densidad de macrófagos en las placas. Se demostró expresión incrementada de CCL2, por macrófagos de médula ósea deficientes de LRP-1, debido a la activación de la señalización de NF- κ B. Por lo tanto, es razonable suponer que la capacidad de LRP-1 para suprimir la señalización de NF- κ B puede limitar el reclutamiento de monocitos en placas ateroscleróticas y los efectos adversos de los mediadores generados por macrófagos en la pared arterial (47, 48, 60, 61).

La señalización intracelular activada a través de LRP-1 en macrófagos vía Akt, también puede ser antiaterogénica por prevenir la apoptosis. Los estudios en ratones,

muestran que los macrófagos LRP-1 limitan la aterosclerosis en una variedad de modelos, incluyendo *ApoE*^{-/-} y *LDL-R*^{-/-}. Los mediadores inflamatorios presentes en las placas ateroscleróticas pueden combinarse para disminuir sustancialmente la expresión de LRP-1 promoviendo su desprendimiento. Los efectos de estos eventos sobre la expresión de mediadores importantes, como CCL2, pueden ser aditivos. La pérdida de LRP-1 de la superficie celular en monocitos y macrófagos puede incrementar la expresión de CCL2 mediante la activación de la señalización de NF-κB, mientras que el procesamiento proteolítico de LRP-1 induce además la expresión de CCL2 (60, 62). Los agentes terapéuticos que antagonizan la inflamación, pueden mantener la expresión de LRP-1 en la superficie celular de los macrófagos e inhibir su desprendimiento, controlando la progresión de la aterosclerosis (60). LRP-1 ha surgido como un regulador de la respuesta a la lesión e inflamación, facilitando la eliminación de productos de lesión potencialmente autoantigénicos y para regular las vías de señalización que controlan la expresión de citocinas, quimiocinas y otros mediadores inflamatorios (60).

1.6 LRP-1, monocitos y aterosclerosis

Como se mencionó, los monocitos tienen una participación preponderante en la etapa inicial y de progresión de la aterosclerosis. Resultados previos han demostrado que LRP-1 se expresa en la superficie de monocitos-macrófagos y macrófagos tisulares activados (63). En CML y macrófagos deficientes en LRP-1, se pudo establecer que cumple funciones protectoras contra el desarrollo de aterosclerosis (61, 64, 65). Durante el proceso inflamatorio crónico que alimenta la aterosclerosis, los mediadores inflamatorios producen la disminución de LRP-1 en macrófagos (66), efecto también observado por la insulina, una hormona considerada proaterogénica (67), lo cual desde el punto de vista de la aterosclerosis, posicionaría a este receptor como un factor protector. Recientemente se ha demostrado que LRP-1 puede regular negativamente la vía inflamatoria NF-κB en macrófagos, lo cual puede limitar la expresión de citocinas proinflamatorias como CCL2, y el reclutamiento celular a la placa (61, 62, 68). En los macrófagos, LRP-1 también controla la actividad de MMP, lo cual lo transforma en un regulador de la integridad vascular y el destino de la placa (69, 70).

En etapas avanzadas de la aterosclerosis, se ha demostrado que LRP-1 está altamente expresado en CML y macrófagos, donde media la captación e internalización de LDL agregadas, llevando a la acumulación de ésteres de colesterol y formación de FC, un acontecimiento clave en la progresión de la placa (71, 72).

En este proyecto de investigación clínica, observacional prospectivo caso-control, realizado sobre una muestra poblacional de individuos con diferente estratificación de riesgo de enfermedad cardiovascular, se estudiaron potenciales biomarcadores de desarrollo de aterosclerosis abordado desde un enfoque inflamatorio, centrado en la etapa inicial de la aterosclerosis, donde se produce una marcada adhesión de monocitos al endotelio disfuncional de la pared vascular, a partir de lo cual se desencadena la formación y desarrollo de la placa de ateroma a nivel de la capa íntima arterial. Por lo tanto, como primera hipótesis se propone que el nivel de expresión de LRP-1 y de receptores scavengers (CD36 y MSR1) a nivel de la superficie celular del monocito, así como en subpoblaciones monocíticas, resultaría clave en el proceso de adhesión - migración del monocito a nivel de la pared endotelial así como en la expresión de factores proinflamatorios en monocitos inflamatorios durante la etapa temprana de la aterosclerosis. En este sentido, y como una segunda hipótesis, se plantea que una eventual disminución en la expresión de LRP-1, conjuntamente con un aumento de receptores scavengers y factores proinflamatorios en monocitos servirían desde un punto clínico y diagnóstico como biomarcadores tempranos de la aterosclerosis. La valoración de estos biomarcadores, aportarían una mejora en la certeza de riesgo, y por ende en la prevención, de enfermedad cardiovascular con horizontes más cercanos a los estimados por los puntajes de riesgo establecidos a 10 y 30 años.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Estudiar potenciales biomarcadores de desarrollo de aterosclerosis desde un enfoque inflamatorio. Así, se pretende determinar si los monocitos circulantes expresan un perfil diferencial de biomarcadores en la fase inicial subclínica del proceso aterosclerótico.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Cuantificar el nivel de expresión de LRP-1, receptores *scavengers* (CD36 y MSR-1) y factores proinflamatorios en la población total de monocitos de sangre periférica. El propósito es caracterizar los niveles de expresión transcripcional y proteica en monocitos circulantes mediante citometría de flujo y RT-qPCR de individuos que presentan diferente riesgo cardiovascular.
- 2) Medir la expresión diferencial de LRP-1 y receptores *scavengers* (CD36 y MSR-1) en subpoblaciones de monocitos con el propósito de establecer la distribución diferencial de estos marcadores en relación con el perfil proinflamatorio en las distintas subpoblaciones monocíticas. La finalidad de este objetivo es dilucidar si la expresión de estos marcadores se relacionan con la funcionalidad de las subpoblaciones de monocitos y puede ser aplicada en la estratificación de riesgo. Para este fin, también se aplicará citometría de flujo y RT-qPCR en las distintas subpoblaciones de monocitos.

3. PACIENTES, MATERIALES y MÉTODOS

3.1 Tipo de estudio y pacientes

Se realizó un estudio clínico observacional prospectivo caso-control sobre una muestra de individuos (reclutados en un periodo de tres años, 2014-2017) de ambos sexos (49 mujeres y 54 hombres) comprendidos entre los 20 y 59 años de edad enrolados en el Servicio de Clínica Médica del Hospital Privado Centro Médico de Córdoba.

El estudio fue regido por Normas de Buenas Prácticas Clínicas (GCP-ICH) de acuerdo con lo establecido en la Declaración de Helsinki y sus modificaciones posteriores. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Revisión Interna (CRI) del Hospital Privado (Ref. HP 4-178).

Los individuos reclutados accedieron a participar de manera voluntaria firmando el formulario de Consentimiento Informado.

3.2 Criterios de exclusión

Todos aquellos individuos que poseían al menos una de las condiciones enumeradas a continuación, no fueron incluidos en el estudio.

- a) Enfermedad cardiovascular previa: Infarto agudo de miocardio, angina (inestable o estable), cirugía de revascularización miocárdica, angioplastia coronaria, stroke, crisis isquémica transitoria, enfermedad vascular periférica y enfermedad de la aorta o arterias asociadas;
- b) Historia personal de diabetes mellitus;
- c) Niveles de glucosa en ayuno >110 mg/dL, uso de insulina o hipoglucemiantes orales;
- d) Tratamiento actual o previo con hipolipemiantes (estatinas, fibratos);
- e) Cuadro febril de cualquier etiología en los últimos 30 días;
- f) Embarazo y puerperio hasta los 3 meses;
- g) Tratamiento actual (últimos 6 meses) con anticonceptivos orales o terapia de reemplazo hormonal;
- h) Alcoholismo y uso de drogas de abuso;
- i) Infección urinaria y/o presencia de hematuria.

3.3 Historia clínica

A cada individuo se le establecieron diversos parámetros clínicos-antropométricos para elaborar su historia clínica y establecer factores de riesgo cardiovascular:

- a) Antecedentes patológicos personales
- b) Antecedentes patológicos familiares
- c) Práctica de actividad física
- d) Tabaquismo
- e) Consumo de medicación
- f) Ciclo menstrual
- g) Peso (en kg)
- h) Altura (en cm.)
- i) Cálculo del Índice de Masa Corporal (Índice de Quetelet) $IMC = P(kg) / H^2(cm)$
- j) Presión arterial (en mmHg)
- k) Frecuencia cardíaca
- l) Perímetro abdominal (cm)
- m) Pulsos periféricos
- n) Soplos carotídeos

3.4 Evidencia de placa de ateroma

El deterioro funcional y morfológico del endotelio vascular, se manifiesta en una larga fase subclínica. Los métodos diagnósticos basados en imágenes como ecografía carotídea o puntaje de calcio coronario, pueden detectar uno o más indicadores ateroscleróticos cuyo hallazgo constituye un predictor directo de eventos cardiovasculares.

3.4.1 Estudio por Eco-Doppler de placa Carotídea (PAC)

Se utilizó un Equipo 2D US Philips™ 5000, con transductor lineal variable 7-12 MHz. Se realizó la medición del IMT en tres lugares de cada lado del cuello:

- carótida común (1 cm antes de la bifurcación)
- bifurcación carotídea (1 cm luego de la bifurcación)
- carótida interna (1 cm luego de la bifurcación)

Se obtuvo el IMT máximo y el IMT medio, calculado como la media aritmética de las seis mediciones. La presencia de PAC fue definida como:

- a) espesor de la pared anormal (IMT > 1,0 mm);

- b) estructura anormal (protrusiones hacia el lumen, pérdida de alineación con la pared adyacente);
- c) ecogenicidad de la pared anormal.

3.4.2 Puntaje de calcio coronario (PCC)

La tomografía computada multidetectora cardíaca se realizó con un equipo Somatom Definition Flash™ (Siemens™ Healthcare) de doble fuente con colimación de 128x0,6 mm, tiempo de rotación de 75 ms y voltaje de tubo de 80 y 140 KV. Las imágenes se tomaron desde el nivel de bifurcación traqueal hasta la base del corazón utilizando ECG prospectivo con el centro de la adquisición al 70% del intervalo R-R. Una lesión coronaria calcificada se definió como un área con una densidad > 130 unidades de Hounsfield y cubriendo al menos 6 píxeles. El método de Agatston se utilizó para determinar el PCC mediante la multiplicación de cada área de la lesión por un puntaje.

3.5 Determinaciones bioquímicas

A cada individuo se le extrajeron aproximadamente 10 mL de sangre por punción venosa; la misma fue distribuida de la siguiente manera:

- 3 mL colocados en tubos (BD Vacutainer® - SST™ Ref. 367986), centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos para la obtención del suero
- 3 mL en tubos (BD Vacutainer® - K₂-EDTA Ref. 367861) para las determinaciones hematológicas, citometría de flujo y HbA1c
- 4 mL en tubos (BD Vacutainer® - K₂-EDTA Ref. 367861) para obtención de células mononucleares, en algunos individuos se utilizaron tubos comerciales (BD Vacutainers® CPT™ – Ref. 36276) para el mismo propósito.

Adicionalmente se solicitó una muestra de orina obtenida mediante técnica del “chorro medio” y conservada en frasco estéril para la realización de análisis rutinario.

3.5.1 Equipamiento

- Autoanalizador COBAS6000® (Roche)

Todas las determinaciones fueron realizadas según indicaciones del fabricante

- Analizador hematológico Sysmex XT-4000i™

Según especificaciones del fabricante

- 5810R Centrifuge; (Cat. 022627023; Eppendorf™)

3.5.2 Reactivos

- (Ref. 4404483190) Glucosa (GLUC2 - COBAS® Roche)
- (Ref. 12017547122) Insulina (INSULINE - COBAS® Roche)
- (Ref. 3039773190) Colesterol total (CHOL2 - COBAS® Roche)
- (Ref. 4399803190) HDL-colesterol (HDLC3 - COBAS® Roche)
- (Ref. 3038866322) LDL-colesterol (LDLC2 - COBAS® Roche)
- (Ref. 20767107322) Triglicéridos (TRIGL - COBAS® Roche)
- (Ref. 3032566122) Apolipoproteína A1 (APOAT - COBAS® Roche)
- (Ref. 3032574122) Apolipoproteína B100 (APOBT - COBAS® Roche)
- (Ref. 5852625190) Lipoproteína (a) (LPA2 - COBAS® Roche)
- (Ref. 5336163190) Hemoglobina glicosilada (A1C3 - COBAS® Roche)
- (Ref. 5401470190) Creatinina (CREP2 - COBAS® Roche)
- (Ref. 4628918190) Proteína C reactiva ultrasensible (CRPHS - COBAS® Roche)
- (Ref. 10759350190) C.F.A.S.® Roche (Calibrator for Automated Systems)
- (Ref. 12172623122) C.F.A.S. Lipids® Roche
- (Ref. 04528417190) C.F.A.S HbA1c® Roche
- (Ref. 05852641190) PreciSet Lp(a)® Roche
- (Ref. 12017504122) Insulin CalSet® Roche
- (Ref. 11731416190) PreciControl Universal® Roche
- (Ref. 05117003190) PreciControl ClinChem Multi 1® Roche
- (Ref. 05117216190) PreciControl ClinChem Multi 2® Roche
- (Ref. 05479207190) PreciControl HbA1c norm® Roche
- (Ref. 05912504190) PreciControl HbA1c path® Roche
- (Ref. 05852650190) PreciControl Lp(a)® Roche
- (Ref. 201-6001-0) e-check® (XE) Sysmex 3 niveles

3.5.3 Glucosa

Método Hexoquinasa. La hexoquinasa (HK), cataliza la fosforilación de la glucosa a

glucosa-6-fosfato a partir del ATP. En una segunda reacción, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD) en presencia de NADP^+ , oxida la glucosa-6-fosfato a gluconato-6-fosfato y NADPH^+ . La velocidad de formación de NADPH^+ durante la reacción es directamente proporcional a la concentración de glucosa y se mide fotométricamente a 340 nm.

3.5.4 Insulina

Método electroquimioluminiscente. En una primera etapa, la insulina reacciona con un anticuerpo monoclonal biotinilado anti-insulina y un anticuerpo monoclonal anti-insulina marcado con un quelato de Rutenio para formar un complejo sandwich. En una segunda etapa, después de incorporar micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por interacción entre la biotina y la estreptavidina. La mezcla de reacción es trasladada a la célula de medida donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide en el fotomultiplicador.

3.5.5 Colesterol total

Método enzimático colorimétrico. Los ésteres de colesterol se desdoblan por la acción de la enzima colesterol esterasa para dar colesterol libre y ácidos grasos. La colesterol oxidasa cataliza entonces la oxidación de colesterol a colest-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa, el peróxido de hidrógeno formado produce una unión oxidativa entre el fenol y 4-aminoantipirina para formar un colorante rojo de quinonimina. La intensidad cromática del colorante formado medida a 505 nm., es directamente proporcional a la concentración de colesterol.

3.5.6 LDL-colesterol

Método colorimétrico enzimático homogéneo. Los ésteres de colesterol y el colesterol libre transportados por las LDL, se miden por un método enzimático de colesterol que usa colesterol esterasa y colesterol oxidasa en presencia de tensioactivos que solubilizan selectivamente sólo las LDL. Las reacciones enzimáticas del colesterol unido a otras lipoproteínas distintas de las LDL, son inhibidas por tensioactivos y un compuesto de azúcar.

El producto final púrpura rojo, se determina fotométricamente a 512 nm., cuya intensidad de color es proporcional al LDL-colesterol.

3.5.7 HDL-colesterol

Método colorimétrico enzimático homogéneo. En presencia de iones magnesio y sulfato de dextrano se forman complejos hidrosolubles con LDL, VLDL y quilomicrones que son resistentes a las enzimas modificadas por polietilenglicol (PEG). La concentración del HDL-colesterol se determina enzimáticamente por colesterol esterasa y colesterol oxidasa acopladas con PEG a los grupos amínicos. El colesterol es oxidado por colesterol oxidasa a Δ 4-colestenona y peróxido de hidrógeno. La intensidad cromática del colorante azul de quinonimina formado es directamente proporcional a la concentración de HDL-colesterol medido a 583 nm.

3.5.8 Triglicéridos

Método enzimático colorimétrico. El método utiliza lipasa para hidrolizar triglicéridos a glicerol y ácidos grasos, con oxidación posterior a dihidroxicetonafosfato y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno formado reacciona bajo la acción catalítica de la peroxidasa con la 4-aminofenazona y el 4-clorofenol para formar un colorante rojo. La intensidad cromática del colorante rojo formado es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos medido fotométricamente a 505 nm.

3.5.9 Apolipoproteínas A1

Método inmunoturbidimétrico. La apolipoproteína A1 humana precipita formando un complejo con un anticuerpo específico que se determina turbidimétricamente a 340 nm.

3.5.10 Apolipoproteínas B100

Método inmunoturbidimétrico. La apolipoproteína B100 humana precipita formando un complejo con un anticuerpo específico que se determina turbidimétricamente a 340 nm.

3.5.11 Lipoproteína (a)

Método inmunoturbidimétrico potenciado por micropartículas. La lipoproteína (a) humana se aglutina con partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti-Lpa. El precipitado se determina turbidimétricamente a 659 nm.

3.5.12 Proteína C reactiva ultrasensible

Método inmunoturbidimétrico potenciado por micropartículas. La PCR humana se aglutina con partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti-PCR. El precipitado se determina turbidimétricamente a 552 nm.

3.5.13 Hemoglobina glicosilada

Método inhibición de inmunoensayo turbidimétrico. La glicohemoglobina (HbA1c) de la muestra reacciona con un anticuerpo anti-HbA1c para formar complejos antígeno-anticuerpo solubles. Dado que el anticuerpo se une en un solo sitio de la molécula de HbA1c no se forman complejos. En la segunda etapa, se agregan polihaptenos, que reaccionan con anticuerpos anti-HbA1c en exceso para formar complejos insolubles de anticuerpo-polihapteno que se determinan turbidimétricamente a 340 nm.

3.5.14 Creatinina

Método cinético enzimático. Se basa en la conversión de la creatinina a glicina, formaldehído y peróxido de hidrógeno por la acción de la creatininasas, creatinasa y sarcosina oxidasa. Catalizado por la peroxidasa, el peróxido de hidrógeno liberado reacciona con la 4-aminofenazona y el ácido 2,4,6-triyodo-3-hidroxibenzoico formando un cromógeno de quinonimina. La intensidad cromática medida a 546 nm., es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la mezcla de reacción.

3.5.15 Parámetros hematológicos

Se realizó recuento de leucocitos totales y fórmula leucocitaria.

3.6 Estimación del riesgo cardiovascular

Se aplicaron ecuaciones y determinación de PCC para establecer riesgo cardiovascular en cada individuo reclutado. Las estimaciones según Framingham y score ARIC, fueron obtenidas mediante calculadora interactiva (73, 74).

- a) *FS hard 10 years (FRS H 10)*
- b) *FS global cardiovascular 10 years (FRS CVD 10)*
- c) *FS hard lipid 30 years (FRS 30 LH)*
- d) *FS hard IMC 30 years (FRS 30 BMI H)*
- e) *FS global lipid cardiovascular 30 years (FRS 30 L CVD)*
- f) *FS global IMC cardiovascular 30 years (FRS 30 BMI CVD)*
- g) *Score ARIC*
- h) *PCC10*
- i) *Lifetime Risk*

3.7 Definición de grupos comparativos para el estudio

En el estudio se determinaron los niveles de expresión de diferentes biomarcadores expresados en monocitos de sangre periférica, a nivel proteico y de ARNm. La hipótesis es que la expresión de dichos marcadores debería ser diferente en individuos que han iniciado el proceso aterosclerótico de aquellos sujetos con bajo riesgo aterogénico. Para el contraste, se tomaron dos grupos comparativos:

- 1) *Grupo con bajo riesgo de aterosclerosis subclínica (BR):*
 - a) Colesterol total < 200 mg/dL
 - b) HDL-colesterol > 40 mg/dL (hombres) ó 50 mg/dL (mujeres)
 - c) Triglicéridos < 150 mg/dL
 - d) Presión arterial < 140/90, sin antecedentes de hipertensión arterial (HTA)
 - e) Sin consumo de tabaco (al menos en el último año)
 - f) Sin antecedentes de coronariopatía familiar precoz
 - g) Creatinina sérica < 1,21 mg/dL
 - h) Glucemia < 100 mg/dL
 - i) Proteína C reactiva ultrasensible < 3,0 mg/L
 - j) Sin evidencia de aterosclerosis carotídea (EcoDoppler)

- 2) *Grupo Aterosclerosis subclínica (AtS):*

a) Con evidencia de aterosclerosis carotídea (EcoDoppler)

3.8 Obtención de células mononucleares

Los monocitos constituyen uno de los tipos celulares presentes en la fracción mononuclear obtenida del fraccionamiento de los leucocitos de sangre periférica mediante el método de separación por gradiente de densidad. El gradiente es obtenido mediante la utilización de diferentes soluciones (Ficoll, Percoll, etc) fijadas a una densidad 1,077g/mL, que permite que sedimenten los eritrocitos y granulocitos y que floten las células mononucleares (linfocitos y monocitos). Éste método es económico y práctico, y no requiere equipamiento complejo, además, se disponen de tubos comerciales destinados a tal fin (BD Vacutainers® CPT™ – Ref. 36276). Los componentes celulares que integran la fracción mononuclear, presentan una pureza superior al 98%, constituida por linfocitos principalmente y monocitos.

3.8.1 Equipamiento

- 5810R Centrifuge (Cat. 022627023; Eppendorf™)

3.8.2 Reactivos

- Ficoll-Paque™ PLUS Media (Cat. 11768538; GE Healthcare™; Thermo Fisher Scientific)
- NaCl (Cat. 0219484801; MP Biomedicals™; Thermo Fisher Scientific)
- KCl (Cat. 0215194401; MP Biomedicals™; Thermo Fisher Scientific)
- Na₂HPO₄.12H₂O (Cat. 12695147; Acros Organics™; Thermo Fisher Scientific)
- KH₂PO₄ (Cat. 10025810; Acros Organics™; Thermo Fisher Scientific)
- Buffer fosfato salino (PBS)

NaCl = 8,0 g; KCl = 0,2 g; Na₂HPO₄.12H₂O = 2,9 g; KH₂PO₄ = 0,2 g; H₂O destilada c.s.p. 1000 mL; pH = 7,4

3.8.3 Procedimiento

La muestra obtenida por venopunción colocada en tubos con anticoagulante (BD Vacutainer® - K₂-EDTA Ref. 367861) se diluyó con buffer fosfato salino (PBS) en la

proporción 1:1; 8 mL de la muestra diluida fueron añadidos sobre 2 mL de solución de Ficoll. Posteriormente, se centrifugó a 725g a 19°C durante 30 minutos sin freno de desaceleración, para conseguir la separación de las fases. Tras la centrifugación se obtuvieron cuatro fases, la parte superior acuosa, conformada por plasma y PBS, debajo un anillo de células mononucleares que separa la fase anterior del Ficoll y en el fondo del tubo se situaron los eritrocitos y las células polimorfonucleares, mayoritariamente polimorfonucleares neutrófilos.

3.9 Citometría de flujo y aislamientos celulares por citometría (*sorting*)

La citometría de flujo (Figura 8) es una técnica de análisis celular que implica medir las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme se las hace pasar a través de un rayo de luz. Las células deben encontrarse individualmente en suspensión en un fluido, al atravesar el rayo de luz, interaccionan con este causando dispersión de la luz, basándose en la difracción de la luz en sentido frontal, se puede evaluar el tamaño celular (FSC o *Forward Scatter*), y al medir la reflexión de la luz de manera lateral, se evalúa la granularidad o complejidad (SSC o *Side Scatter*). Además de la dispersión de la luz, si previamente a su análisis las células son marcadas con anticuerpos monoclonales unidos a moléculas fluorescentes, se pueden evaluar que células poseen los antígenos complementarios a los anticuerpos monoclonales usados. El uso de moléculas fluorescentes distintas (distintos colores de fluorescencia) permite analizar la presencia de varios marcadores de manera simultánea. Si el análisis incluye la detección de fluorescencia hablamos de FACS (del inglés, *Fluorescence-activated Cell Sorter*). Los citómetros de flujo pueden analizar partículas en función de su fluorescencia y tamaño. Los conocidos como separadores (*sorters*) pueden también purificar poblaciones de características determinadas en distintas fracciones finales a la vez que realizan el conteo del número de células presentes en la muestra.

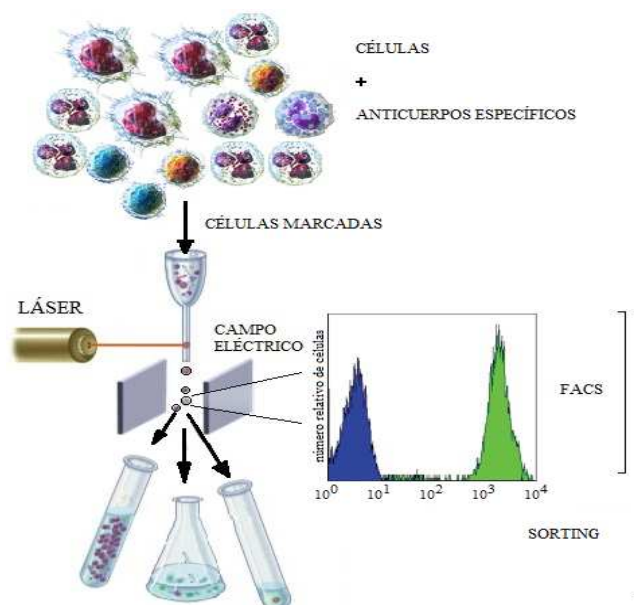


Figura 8: Representación esquemática de la citometría de flujo y FACS *sorting*

3.9.1 Equipamiento y análisis de datos

- Citómetro de flujo Modelo BD FACSCanto™II (BD Biosciences). Dos láser estado sólido de 488 nm Coherent® Sapphire™; 20 mW (azul); y 633 nm JDS Uniphase™ HeNe refrigerado por aire; 17 mW (rojo).
- Citómetro de flujo Modelo BD FACS Aria™II (BD Biosciences). Dos láser estado sólido de 488 nm Coherent® Sapphire™; 20 mW (azul); y 633 nm JDS Uniphase™ HeNe refrigerado por aire; 17 mW (rojo).
- 5810R Centrifuge (Cat. 022627023; Eppendorf™).
- Software FACSDiva™ v6.1.2 (BD Biosciences) para transformación de datos.

3.9.2 Reactivos

- NaCl (Cat. 0219484801; MP Biomedicals™; Thermo Fisher Scientific)
- KCl (Cat. 0215194401; MP Biomedicals™; Thermo Fisher Scientific)
- Na₂HPO₄·12H₂O (Cat. 12695147; Acros Organics™; Thermo Fisher Scientific)
- KH₂PO₄ (Cat. 10025810; Acros Organics™; Thermo Fisher Scientific)
- NH₄Cl (Cat. 10255360; Acros Organics™; Thermo Fisher Scientific)
- KHCO₃ (Cat. 10032990; Acros Organics™; Thermo Fisher Scientific)
- Na₂-EDTA (Cat. 15549660; JT Baker™; Thermo Fisher Scientific)

- Sodio azida (Cat. 10338380; Acros Organics™; Thermo Fisher Scientific)
- Suero fetal bovino (Cat. 11573397; Gibco™; Thermo Fisher Scientific)
- Solución de lisis NH₄Cl (1x)

NH₄Cl = 8,29 g; KHCO₃ = 1,0 g; Na₂-EDTA = 0,037 g; H₂O destilada c.s.p 1000 mL

La solución de lisis tiene una durabilidad de 1 mes a partir del momento de su preparación. Se puede preparar una solución (10x) y conservar a -20°C en alícuotas

- Buffer fosfato salino (PBS)

NaCl = 8,0 g; KCl = 0,2 g; Na₂HPO₄.12H₂O = 2,9 g; KH₂PO₄ = 0,2 g; H₂O destilada c.s.p. 1000 mL; pH = 7,4

- FACS buffer

Suero fetal bovino (2%) = 10,0 mL; Sodio azida = 0,5 g; Na₂-EDTA = 0,9305 g; PBS c.s.p. 500 mL

3.9.3 Anticuerpos

Los ensayos de citometría de flujo para determinar la expresión en superficie celular de monocitos y subpoblaciones de monocitos de LRP-1 y CD36, y los métodos de separación celular por citometría de flujo FACS *sorting* para ensayos de *Western Blot* y RT-qPCR, se utilizaron anticuerpos marcados con diferentes fluoróforos y diluciones recomendadas por el fabricante (Tabla V y Tabla VI).

Tabla V: Anticuerpos para citometría de flujo (FACS y FACS *sorting*)

AC.	MARCA	DIL.	FABRICANTE	CLON	ISOTIPO	CATÁLOGO
CD14	FITC	1/50	BD Biosciences	MφP9	ratón IgG2b	561708
LRP-1	PE	1/100	AbD Serotec (BR)	MCA1965	ratón IgG1	MCA1965PE
CD45	PC5.5	1/50	Beckam Coulter	J.33	ratón IgG1	IM2653
CD16	APC-Cy7	1/50	BD Biosciences	3G8	ratón IgG1	557758
CD36	PerCP-Cy5.5	1/100	BD Biosciences	CB38	Ratón IgM	561536

AC (anticuerpo); DIL (dilución usada); FITC (isotiocianato de fluoresceína); PE (R-ficoeritrina); PC5.5 (ficoeritrina acoplada con cianina 5.5); APC-Cy7 (Alofocianina acoplada con cianina 7); PerCP-Cy5.5 (peridina clorofila acoplada con cianina 5.5)

3.9.4 Procedimiento

Se colocó 1 mL de sangre anticoagulada (BD Vacutainers® - K₂-EDTA Ref.367861)

en tubos plásticos con 13 mL de solución de lisis, realizando una homogeneización suave y reposo de 20 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugó 5 minutos a 1200 rpm y el sobrenadante fue descartado. En caso de persistir glóbulos rojos, se efectuó shock de lisis con H₂O destilada (3 mL de H₂O destilada, y homogeneizado por 20 segundos, luego se agregó 12 mL de PBS, y nuevamente homogeneizado). Se centrifugó 5 minutos a 1200 rpm. Al sedimento celular se le adicionaron 500 µL de FACS buffer frío en hielo, después de homogeneizar, se tomaron 200 µL de la suspensión celular, y nuevamente centrifugado 5 minutos a 1200 rpm.

Se conservó una alícuota de las células sin marcar (control sin marca). A 50 µL del sedimento celular obtenido en el paso anterior, se agregaron los anticuerpos monoclonales marcados, en combinación dependiente del tipo de marcación deseada y volumen según título respectivo, seguido de incubación por 20 minutos (en oscuridad). Luego de lavar con 500 µL de FACS buffer mantenido a 4°C y centrifugar 5 minutos a 1200 rpm a la misma temperatura, las células fueron resuspendidas en 200 µL de FACS buffer a 4°C. Se procedió a la medición de fluorescencia MIF (Intensidad de Fluorescencia Media) en el citómetro de flujo antes de los 30 minutos. Para los ensayos de aislamiento celular FACS *sorting* se empleó el mismo procedimiento utilizando 10 veces los volúmenes descriptos para obtener mayor número de células.

3.9.4.1 Separación de subpoblaciones de leucocitos por FACS *sorting*

En primer lugar, los leucocitos positivos para CD45 (CD45–PC5.5) se visualizaron en una muestra de SSC frente a CD45–PC5.5 que mostraba todos los eventos de fluorescencia (PC5.5 positivos). Un umbral de adquisición se estableció de tal manera que no se registraron eventos no deseados tales como plaquetas, células muertas y detritos celulares. Los leucocitos (granulocitos, linfocitos y monocitos) se definieron a continuación por *gating* usando el diagrama SSC versus CD45⁺. Mediante citometría de flujo FACS *sorting*, las poblaciones fueron aisladas para estudios posteriores (RT-qPCR y *Western Blot*).

3.9.4.2 Separación de subpoblaciones de monocitos por FACS *sorting*

Si bien la diferenciación de subpoblaciones de monocitos por citometría de flujo se basa en la expresión de CD14 y CD16 a nivel de la superficie celular, la correcta identificación de los monocitos se lleva a cabo a través de un tercer marcador pan-monocítico,

entre los que se destacan CD86 y HLA-DR para evitar el riesgo de incluir otros subconjuntos de leucocitos que también expresan CD16 (granulocitos neutrófilos y células NK). En nuestra estrategia, el tercer marcador utilizado para la selección específica de la población monocítica, basándonos en trabajos previos, fue LRP-1 (63). Utilizando controles de isotipo, voltaje y compensación, el instrumento se configuró de forma tal que las células se ubicaron adecuadamente en los trazados de puntos. Primeramente se realizó la estrategia de separación de leucocitos en función del marcador pan-leucocitario CD45 (CD45-PC5.5) versus SSC. La región monocítica es LRP-1 positiva y está claramente separada de regiones de granulocitos y linfocitos. Por *gating* de los monocitos LRP-1-PE⁺ fueron representados en un gráfico CD16-APC-Cy7 versus CD14-FITC (subpoblaciones de monocitos, clásicos CD14⁺⁺/CD16⁻, intermedios CD14⁺⁺/CD16⁺ y no clásicos CD14⁺/CD16⁺⁺).

3.9.4.3 Expresión proteica de LRP-1 y CD36 en superficie celular por FACS

Usando controles de isotipo, voltaje y compensación, el instrumento fue ajustado para que las células estuvieran adecuadamente posicionadas en los diagramas de puntos, determinándose la MIF para LRP-1 (LRP-1-PE) y CD36 (CD36-PerCP-Cy5.5) en monocitos totales y subpoblaciones de monocitos clásicos, intermedios y no clásicos, a partir del patrón de distribución celular obtenido utilizando la estrategia mencionada anteriormente (63).

3.10 Expresión proteica de LRP-1 y CD36 en lisados de leucocitos (*Western Blot*)

Se realizó el aislamiento mediante citometría de flujo (FACS *sorting*, SSC versus CD45-PC5.5) de tres fracciones leucocitarias de sangre periférica, granulocitos, linfocitos y monocitos, el propósito fue determinar la expresión proteica de LRP-1 y CD36 por *Western Blot* en cada fracción y así determinar si hay expresión diferencial de los marcadores en un tipo particular de leucocito. El método de *Western Blot* utilizado fue realizado sin modificaciones (75).

3.10.1 Equipamiento

- Equipo de electroforesis y accesorios Mini-Protean® Tetra Cells Electrophoresis System (Cat. 1658036; Bio-Rad Laboratories Inc.)
- BioDoc-It™ Imaging Systems M-26 Transilluminator (UVP Inc.) para análisis y

documentación de las corridas

- Sorvall™ Legend™ Micro 21 Microcentrifuge (Cat. 75772446; Thermo Fisher Scientific)

3.10.2 Reactivos

- PMSF (Cat. 10267023; Acros Oganics™; Thermo Fisher Scientific)
- Membranas de PVDF (Cat. 10113432; EMD Millipore Immobilon™; Thermo Fisher Scientific)
- NaCl (Cat. 0219484801; MP Biomedicals™; Thermo Fisher Scientific)
- KCl (Cat. 0215194401; MP Biomedicals™; Thermo Fisher Scientific)
- Na₂HPO₄·12H₂O (Cat. 12695147; Acros Oganics™; Thermo Fisher Scientific)
- KH₂PO₄ (Cat. 10025810; Acros Oganics™; Thermo Fisher Scientific)
- Tris (Cat. 15548844; JT Baker™; Thermo Fisher Scientific)
- HCl (Cat. 10782232; JT Baker™; Thermo Fisher Scientific)
- Ácido Acético Glacial (Cat. 14650388; JT Baker™; Thermo Fisher Scientific)
- Glicina (Cat. 11545005; PlusOne™ GE Healthcare™; Thermo Fisher Scientific)
- Glicerol (Cat. 10337700; Acros Oganics™; Thermo Fisher Scientific)
- Triton™ X100 (Cat. 10671652; Acros Oganics™; Thermo Fisher Scientific)
- Tween™ 20 (Cat. 10113103; Fisher Bioreagents™; Thermo Fisher Scientific)
- Sodio Dodecilsulfato (Cat. 11881445; Pierce™; Thermo Fisher Scientific)
- 2-mercaptoetanol (Cat. 11452608; Alfa Aesar™; Thermo Fisher Scientific)
- Azul de bromofenol (Cat. 10380904; Acros Oganics™; Thermo Fisher Scientific)
- Azul brillante de Coomassie R-250 (Cat. 20278; Pierce™; Thermo Fisher Scientific)
- Acrilamida (Cat. 11584985; PlusOne™, GE Healthcare™; Thermo Fisher Scientific)
- Bis-acrilamida (Cat. 10689923; Fisher Bioreagents™; Thermo Fisher Scientific)
- TEMED (Cat. 15558244; JT Baker™; Thermo Fisher Scientific)
- Amonio persulfato (Cat. 10005184; PlusOne™, GE Healthcare™; Thermo Fisher Scientific)
- Metanol (Cat. 10532503; Fisher Bioreagents™, Thermo Fisher Scientific)
- SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Cocktail (S8830; Sigma-Aldrich)
- SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Cat. 34080; Thermo Fisher Scientific)

- Quick Start™ Bradford Protein Assay (Cat. 5000201, Bio-Rad Laboratories Inc.)
- Suero fetal bovino (Cat. 11573397; Gibco™; Thermo Fisher Scientific)
- Buffer de lisis no desnaturizante

Tris-HCl = 20 mM; NaCl = 137 mM; Glicerol = 10 % (v/v); Tritón™ X100 = 1 % (v/v); Na₂-EDTA = 2 mM

- Buffer de muestras (2x)

Tris-HCl = 0,125 M; SDS = 4% (p/v); 2-mercaptoetanol = 10% (v/v); Glicerol = 2% (v/v); Azul de bromofenol = 0,004% (p/v); pH = 6,8

- Solución de lavado (PBS – Tween™ 20)

NaCl = 8,0 g; KCl = 0,2 g; Na₂HPO₄.12H₂O = 2,9 g; KH₂PO₄ = 0,2 g; Tween™ 20 = 0,5 % (v/v); H₂O destilada c.s.p 1000 mL

- Buffer de bloqueo

Leche en polvo descremada al 5% (p/v) en solución de lavado PBS–Tween™ 20

- Buffer corrida

Tris = 25 mM; Glicina = 190 mM; SDS = 0,1% (p/v); pH = 8,3

- Buffer de transferencia

Tris = 25 mM; Glicina = 190 mM; Metanol = 20%; SDS = 0,1% (p/v); pH = 8,3

- Gel Poliacrilamida 4% (concentrador)

Tris 0,5M (pH = 6,8) = 2,5 mL; SDS (10%) = 100 µL; Acrilamida (40%)/Bis (1%) = 1,0 mL; Persulfato Amonio (10%) = 50 µL; TEMED = 10 µL

- Gel Poliacrilamida 8% (separador)

Tris 1,5M (pH = 8,8) = 2,5 mL; SDS (10%) = 200 µL; Acrilamida (40%)/Bis (1%) = 2,0 mL; Persulfato Amonio (10%) = 50 µL; TEMED = 5 µL

- Solución colorante

Azul Brillante de Coomassie R-250 = 0,25 g; Metanol = 45 mL; Ácido Acético Glacial = 10 mL; H₂O destilada c.s.p 100 mL

- Solución de fijación de geles

Metanol = 30 mL; Ácido Acético Glacial = 10 mL; H₂O destilada c.s.p 100 mL

- Solución decolorante

Metanol = 30 mL; Ácido Acético Glacial = 10 mL; H₂O destilada c.s.p 100 mL

- Solución para dilución anticuerpos

NaCl = 8 g; Tris = 2,4 g; Suero fetal bovino = 10 mL; H₂O destilada c.s.p 1000 mL (pH = 7,6)

3.10.3 Anticuerpos

Tabla VI: Anticuerpos para *Western Blot* de LRP-1 y CD36 en lisados de leucocitos

AC.	TIPO	REACT.	CLON	DIL.	FABRICANTE	CATÁLOGO
LRP-1α	monoclonal IgG1 ratón	HU	-	1/10000	LifeSpan BioSciences	LS-C123127- 500
CD36	monoclonal IgG1 ratón	HU	877346	1/10000	R&D Systems	MAB19552
β-ACTINA	monoclonal IgG1 ratón	HU, MO, RA	937215	1/10000	R&D Systems	MAB8929
IgG1 RATÓN	monoclonal IgG rata	MO	M1-14D12	1/5000	Invitrogen™; Thermo Fisher Scientific	18-4015-80

AC (anticuerpo); REACT (reactividad); DIL (dilución usada); HU (humano); MO (ratón); RA (rata)

3.10.4 Procedimiento

Cada subconjunto leucocitario ($\sim 1.10^6$ células, correspondientes a granulocitos, linfocitos y monocitos) obtenidos por FACS *sorting*, fueron centrifugados a 2500 rpm durante 5 minutos a 4°C, posteriormente el sobrenadante fue descartado. El sedimento celular se trató con un tampón de lisis no desnaturizante que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 1 mM) y cócteles inhibidores de proteasas. Después de determinar la concentración proteica mediante el método de Bradford (76); la misma se ajustó, finalmente, cincuenta microgramos del extracto de proteína se separaron en geles de SDS-poliacrilamida al 8% a 100 V durante 2 horas, finalizada la electroforesis los geles fueron fijados y coloreados para comprobación de la existencia de bandas proteicas.

Se realizó el ensayo de transferencia a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) durante 60 minutos a 100 V. Las membranas fueron tratadas con solución de lavado, 3 ciclos de 10 minutos cada uno, luego incubadas con buffer de bloqueo durante 60 minutos. La unión del anticuerpo primario se realizó por incubación durante la noche a 4°C y constante agitación con anticuerpos anti LRP-1, CD36 y β -actina diluidos según indicación del fabricante. Después de 3 lavados de 15 minutos cada uno, con solución de lavado bajo agitación constante, se incubó nuevamente con el anticuerpo secundario diluido marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Nuevamente se repitieron los pasos de lavado y posterior revelado por reacción quimioluminiscente y documentación de las membranas.

3.11 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés, *Polymerase chain reaction*) cuantitativa (qPCR) o PCR en tiempo real, es una variante de la PCR utilizada para amplificar

y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN). Para ello emplea, un molde de ADN, un par de cebadores específicos, desoxirribonucleótidos (dNTPs), un buffer de reacción, y una ADN polimerasa termoestable; a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo. El termociclador contiene sensores para medir fluorescencia que se realiza luego de cada ciclo de amplificación. En muchos casos el molde que se emplea para la PCR cuantitativa no es desde el principio ADN, sino que puede ser ADN complementario (ADNc), de hebra simple, obtenido por retrotranscripción de ácido ribonucleico (ARN); en este caso, la técnica es una RT-qPCR.

El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de cambios de temperatura que se repiten en 25 - 40 veces, llamados ciclos, donde cada uno posee un mínimo de tres etapas: la primera, en torno a los 95°C, permite la separación de los ácidos nucleicos de doble cadena; la segunda, a una temperatura en torno a los 50 - 60°C, permite el alineamiento de los cebadores al ADN molde; la tercera, a 68 - 72°C, facilita la polimerización por parte de la ADN polimerasa (Figura 9). Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros, como: la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes y dNTPs en la reacción y la temperatura de unión de los cebadores.

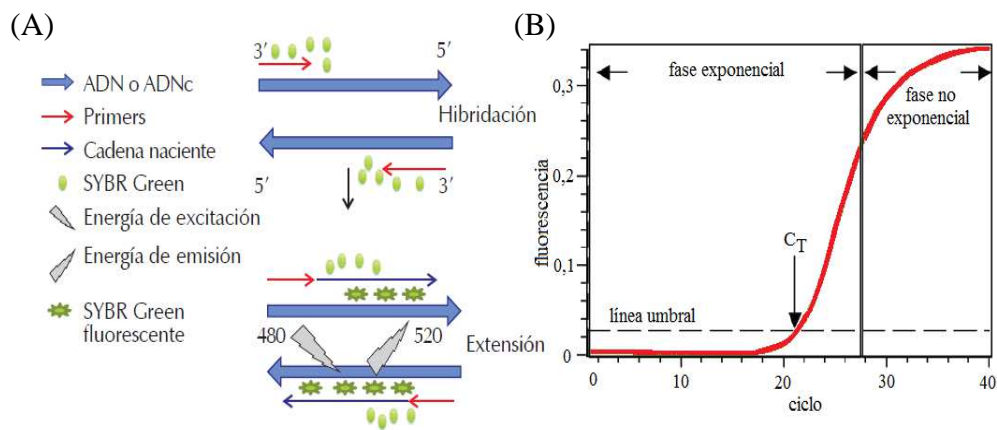


Figura 9: Representación esquemática de RT-qPCR.

(A) Esquema de la unión del colorante Sybr Green® a la doble hebra de ADN con la consiguiente emisión de fluorescencia después de cada ciclo de amplificación. (B) Gráfico de emisión de fluorescencia (*Eje y*) versus números de ciclos de amplificación (*Eje x*) en RT-qPCR, donde C_T representa el ciclo donde la señal supera un valor umbral de fluorescencia.

3.11.1 Equipamiento

- NanoDrop 2000™ UV-Vis Spectrophotometer (Cat. ND-2000; Thermo Fisher Scientific)
- Sorvall™ Legend™ Micro 21 Microcentrifuge (Cat. 75772446; Thermo Fisher Scientific)
- Retrotranscripción mediante Veriti™ Thermal Cycler (Cat. 4413751; Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific)
- Equipo de electroforesis y accesorios Mini-Protean® Tetra Cells Electrophoresis System (Cat. 1658036; Bio-Rad Laboratories Inc.)
- BioDoc-It™ Imaging Systems M-26 Transilluminator (UVP Inc.) para análisis y documentación de las corridas
- RT-qPCR en un Termociclador StepOne™ System (Cat. 4376357; Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific)

3.11.2 Reactivos

- TRIzol® ARN Isolation Reagents (Cat. A33251; Ambion™; Thermo Fisher Scientific)
- FG Power Sybr® Green Master Mix (Cat. 4367659; Applied Biosystems™; Thermo Fisher Scientific)
- Sybr® Safe DNA Gel Stain (Cat. S33102; Life Technologies™; Thermo Fisher Scientific)
- UltraPure™ Ethidium Bromide (Cat. 15585011; Invitrogen™; Thermo Fisher Scientific)
- dNTPs (10 mM) (Cat. AM8200; Ambion™; Thermo Fisher Scientific)
- Random Primer Hexamers (40 μM) (Cat. B070-40; Biodynamics S.R.L.)
- SuperScript™ III Reverse Transcriptase 10000 U/μL (Cat. 18080093; Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific)
- RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor 40 U/μL (Cat. 10777019; Invitrogen™; Thermo Fisher Scientific).
- Cloroformo (Cat. 15598554; J.T. Baker™, Thermo Fisher Scientific)
- Isopropanol (Cat. 11308471; Fisher Bioreagents™, Thermo Fisher Scientific)
- Buffer TEB (tris-EDTA-borato; pH 8,6) (Cat. 10727224; Fisher Bioreagents™,

Thermo Fisher Scientific)

- Agarosa (Cat. 10366603; Fisher Bioreagents™, Thermo Fisher Scientific)
- Formaldehído (Cat. 10426730; Acros Organics™; Thermo Fisher Scientific)

3.11.3 Diseño de cebadores

El diseño y comprobación de los cebadores utilizados en la qPCR se realizó *in silico*, mediante el software disponible en National Center for Biotechnology Information (NCBI) (77).

Todos los cebadores fueron obtenidos de Promega Corporation (Tabla VII).

Tabla VII: Cebadores utilizados para RT-qPCR

GEN	ID.		SECUENCIA	AMPLICON (pb)
LRP-1	NM_002332.2	F	5'-CTATCGACGCCCTAAGACTT-3'	156
	ID: 4035	R	5'-CATCGCTGGGCCTTACTCT-3'	
CD36	NM_000072.3	F	5'-GTGATGATGAACAGCAGCAACA-3'	100
	ID: 948	R	5'-TCCTCAGCGTCCTGGGTTAC-3'	
MSR-1	NM_002445.3	F	5'-AAGCTGCACTGATTGCCCTTT-3'	100
	ID: 4481	R	5'-GCAATTCTTCGTTTCCCACTTC-3'	
GAPDH	NM_001256799.2	F	5'-CTCCGGGTGATGCTTTTCCT-3'	115
	ID: 2597	R	5'-TGAAGGGGTCATTGATGGCA-3'	
CCL2	NM_002982.3	F	5'-CTTCATTCCCAAGGGCTC-3'	234
	ID: 6247	R	5'-GGTTTGCTTGTCAGGTGGT-3'	
TNF-α	NM_000594.3	F	5'-TGCACTTTGGAGTGATCGGC-3'	141
	ID: 7124	R	5'-GCTTGAGGGTTGCTACAACA-3'	
IL-1β	NM_000576.2	F	5'-ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA-3'	131
	ID: 3553	R	5'-GTCGGAGATTTCGTAGCTGGA-3'	
CCR2	NM_001123041.2	F	5'-GGGATGACTCACTGCTGCAT-3'	102
	ID: 729230	R	5'-GGAGTGGGGCAATCCTACAG-3'	

F (sentido); R (antisentido): pb (pares de bases)

3.11.4 Procedimiento

3.11.4.1 Obtención del ARNm de biomarcadores y su cuantificación

Las células obtenidas mediante separación con Ficoll o por FACS *sorting*, fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y al sedimento celular se le agregaron 200 µL de TRIzol®, seguido de agitación vigorosa según el protocolo descrito (78). Para obtener el ARNm celular, se colocaron 200 µL de la suspensión celular tratada con TRIzol®, se agregaron 50 µL de cloroformo seguido de agitación vigorosa, después de reposar 3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 g durante 15 min a 4°C. Se transfirieron 100 µL de la capa acuosa superior a otro tubo, se adicionaron 150 µL de isopropanol y repetición del mezclado y reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de centrifugar a 12000 g durante 10 minutos a 4°C se descartó el sobrenadante. Al sedimento se le agregó 300 µL de etanol frío, y repetición de los pasos de mezclado, reposo y centrifugación a 7500 g durante 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante. El ARNm obtenido se resuspendió en 20 µL de agua ultrapura libre de ribonucleasas y la muestra se conservó a -20°C hasta su análisis. La cuantificación del ARN se realizó por espectrofotometría, y la relación de las absorbancias A260/280 aportó información acerca del grado de pureza, considerándose valores aceptables entre 1,9 - 2,0 indicando libre de contaminantes (proteínas, fenol, etanol), cuya presencia disminuye esta relación.

Las reacciones de amplificación pueden variar considerablemente en función de la integridad y la pureza del ARN de partida, el cual no debe estar degradado ni contaminado con proteínas o ADN. Mediante evaluación electroforética, un ARN intacto debe tener una banda fuerte de ARNr 28s y 18s. La banda ARNr 28s debe ser aproximadamente el doble de intensa que la de ARNr 18s. Si se encuentra parcialmente degradado, tendrá un aspecto manchado sin bandas fuertes, o sin guardar la proporción 2:1, mientras que en estado totalmente degradado, aparecerá como una mancha de muy bajo peso molecular.

En todas las muestras extraídas se comprobó la pureza e integridad del ARN mediante medición espectrofotométrica de la relación A260/280. Adicionalmente, fueron seleccionadas muestras al azar para evaluar la integridad por electroforesis en agarosa-formaldehído, 75 V durante 90 minutos y revelado de los geles por tinción con bromuro de etidio para su evaluación y documentación siguiendo el protocolo descrito (78, 79) (Figura 15). Se demostró por electroforesis de las muestras tomadas al azar, y por relación de lecturas A280/260 (datos no mostrados), que todas las muestras de ARNm extraídas a partir de las células mononucleares de sangre periférica de los individuos reclutados, fueron de buena calidad para los ensayos de PCR (Figura 10).

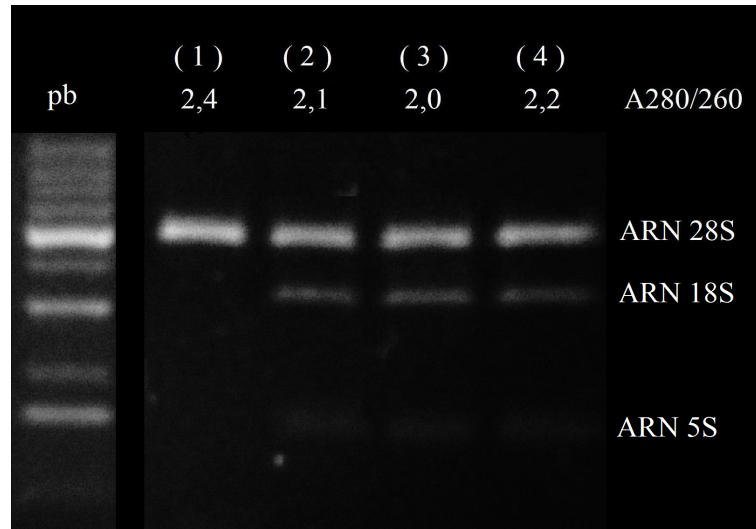


Figura 10: Electroforesis de ARN.

Se muestra corrida electroforética de ARN en Agarosa 2% (p/v)-Formaldehído, buffer TEB, 75 V durante 90 minutos, correspondientes a cuatro muestras tomadas al azar, líneas 1 al 4 con el correspondiente valor de relación de absorbancias A280/260 para cada una. Se observa una marcada banda de ARN28S y una de menor intensidad de ARN18S, con apenas detectable banda de ARN5S. Primera línea corresponde a marcador de pares de bases (100 pb).

3.11.4.2 Retrotranscripción del ARNm de los biomarcadores propuestos

Para obtener un templado capaz de ser sometido a análisis por PCR, el ARNm aislado y purificado, se trató con transcriptasa reversa para obtener un ADN complementario según el método descrito (80). Brevemente, 10 μL del ARN (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se incubaron a 65°C durante 15 minutos en una mezcla de reacción conteniendo 0,5 μL de Random Primers, 1,8 μL de agua ultrapura, 4,0 μL de buffer de reacción y 0,2 μL de inhibidor de ARNsas. Transcurrido el tiempo, las muestras fueron transferidas a baño de hielo. Seguidamente se agregó 0,5 μL de dNTPs y 1,0 μL de transcriptasa reversa. Luego de un periodo de incubación de 60 minutos a 37°C, la transcriptasa reversa fue inactivada a 70°C durante 15 minutos. Conservación final a -20°C hasta su procesamiento.

3.11.4.3 RT-qPCR

Las muestras de ADNc constituyeron el ADN molde para los ensayos de qPCR. Brevemente, 1,5 μL de ADNc se mezclaron con 7,5 μL de Master Mix, 1,0 μL de ambos cebadores (sentido y antisentido) específicos para cada gen y 5,0 μL de agua ultrapura.

El esquema de PCR fue realizado 10 minutos a 95°C (desnaturalización, 1 ciclo); 10

segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C (amplificación y cuantificación, 40 ciclos); 10 segundos a 95°C, 60 segundos a 60°C y 15 segundos a 95°C (*melting curve*, 1 ciclo).

3.11.4.4 Expresión de los resultados

Cada ensayo fue realizado por duplicado usando el gen GAPDH como control interno (81). Los resultados de expresión de cada gen de interés fueron normalizados respecto al control interno y la expresión relativa fue calculada mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (82).

3.11.4.5 Validación de los fragmentos amplificados

Uno de los inconvenientes que presenta la qPCR basada en la medición por unión del fluoróforo Sybr® Green es su inespecificidad, porque el colorante tiene capacidad de unir cualquier fragmento de ADN amplificado (tanto el de interés como inespecífico) dando señal de fluorescencia. Para ello, se realizó la comprobación de los fragmentos amplificados por PCR, mediante electroforesis en gel de agarosa, para constatar que presentan un número de pares de bases (pb) coincidente con el número teórico esperado (*in silico*), paralelamente, se incluyeron muestras de ADN genómico, que previamente fueron amplificadas por PCR con el mismo set de cebadores, para corroborar que no hay amplificación. Los productos de qPCR fueron separados por electroforesis en agarosa y revelado de los geles por tinción con Sybr® Safe para su evaluación y documentación siguiendo el protocolo descrito (83) (Figura 11 y Figura 12).

El análisis de las curvas de *melting* (T_m) después de la amplificación, es un análisis simple y sencillo para verificar las reacciones de PCR y para asegurar la especificidad de la reacción. Debido a que la T_m es afectada por la longitud, el contenido de GC, la complementariedad de las bases, y formación de dímeros de cebadores entre otros factores, diferentes productos de PCR pueden distinguirse a menudo por sus T_m . La caracterización de productos de reacción, a través del análisis de T_m reduce la necesidad de electroforesis en agarosa. En cada análisis de PCR para los biomarcadores estudiados, se comprobó la T_m del fragmento amplificado, siendo una constante que no debe diferir en $\pm 1,5^\circ\text{C}$ (Figura 13).

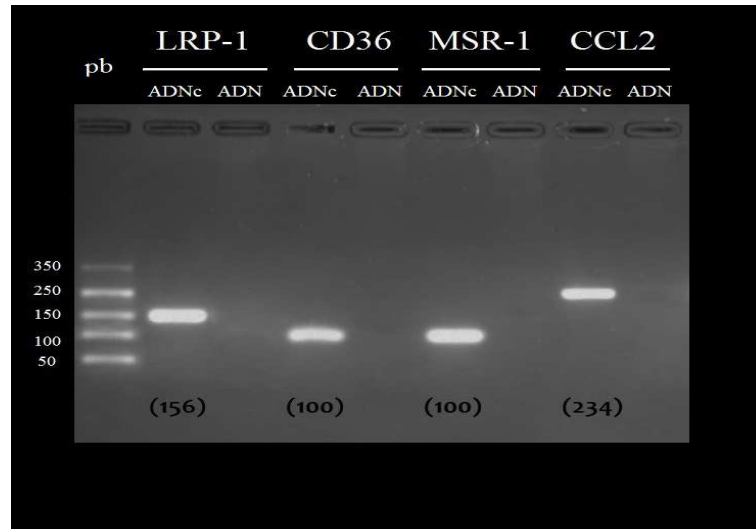


Figura 11: Electroforesis de fragmentos amplificados (LRP-1; CD36; MSR-1; CCL2).

Se muestra corrida electroforética de los productos de amplificación separados en Agarosa al 2% (p/v) buffer TEB, 75 V durante 90 minutos, correspondientes a cuatro biomarcadores LRP-1; CD36; MSR-1; CCL2. En cada caso se muestra la línea (*izquierda*) correspondiente a la RT-qPCR realizada sobre el producto de retrotranscripción del ARNm (*ADNc*), la línea (*derecha*), corresponde a la RT-qPCR realizada sobre ADN genómico (*ADN*) para comprobar que no existe amplificación inespecífica. Se observa en cada caso un único fragmento de pares de bases compatibles con el predicho *in silico* (*valor entre paréntesis*). Primera línea corresponde al marcador de pares de bases (50 pb).

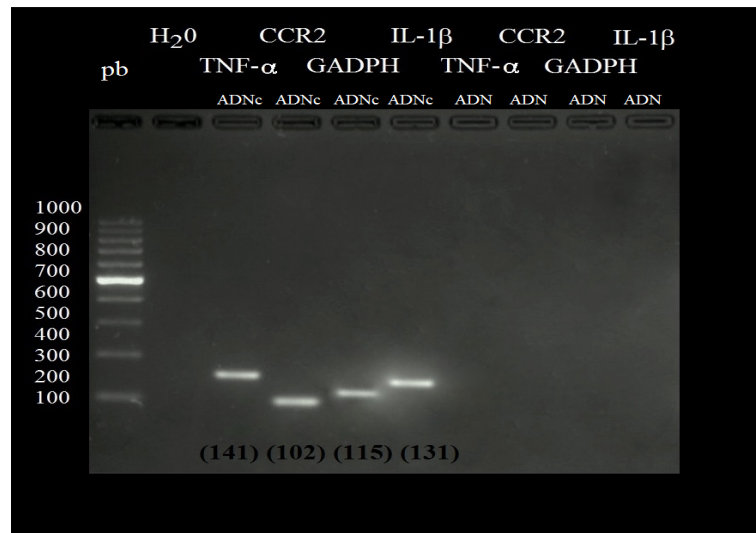


Figura 12: Electroforesis fragmentos amplificados (TNF- α ; CCR2; GADPH; IL-1 β).

Se muestra corrida electroforética de los productos de amplificación separados en Agarosa al 2% (p/v) buffer TEB, 75 V durante 90 minutos, correspondientes a cuatro biomarcadores TNF- α ; CCR2; GADPH; IL-1 β . En cada caso se muestra la línea (*izquierda*) correspondiente a la RT-qPCR realizada sobre el producto de retrotranscripción del ARNm (*ADNc*), la línea (*derecha*), corresponde a la RT-qPCR realizada sobre ADN genómico (*ADN*) para comprobar que no existe amplificación inespecífica. Se observa en cada caso un único fragmento de pares de bases compatibles con el predicho *in silico* (*valor entre paréntesis*). Primera línea corresponde a marcador de pares de bases (100 pb), segunda línea blanco (H_2O).

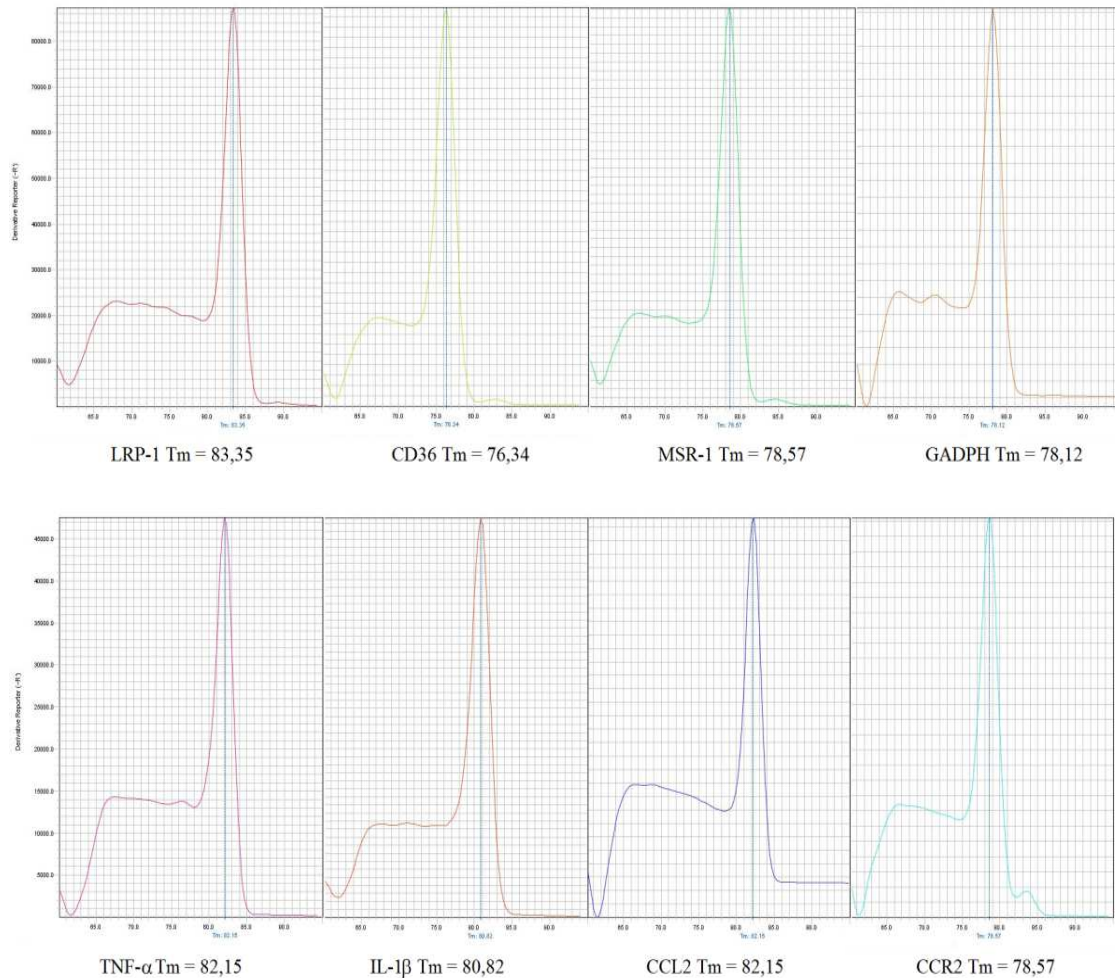


Figura 13: Curvas Tm (LRP-1; CD36; MSR-1; GADPH; TNF- α ; IL-1 β ; CCL2; CCR2).

Cada gráfico representa señal de fluorescencia (*Eje y*) versus temperatura (*Eje x*). Se indica en la parte inferior de cada gráfico el valor de Tm correspondiente al pico.

3.11.4.6 Estandarización de los cebadores

Los resultados de expresión de los ARNm de los biomarcadores estudiados fueron normalizados respecto al gen GADPH (control interno), para que este método sea válido, la eficiencia en la amplificación de todos los genes deben ser similares y cercanas al 100% (entre 90 - 110% es aceptable) para que los resultados sean comparables. Se establecieron las eficiencias de amplificación de los biomarcadores LRP-1, CD36, MSR-1, TNF- α , IL-1 β , CCL2, CCR2 y GADPH, utilizando diluciones seriadas de muestras y posterior realización de la qPCR (Tabla VIII y Figura 14). Los resultados fueron representados gráficamente como CT versus log(dil ADNc). Para el cálculo de eficiencia de cada gen, se aplicó la fórmula:

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

$$\text{Eficiencia (\%)} = [10^{(-1/\text{pendiente})} - 1] \times 100$$

Tabla VIII: Eficiencia de RT-qPCR de los genes estudiados

GEN	DIL.	LOG ₁₀ DIL.	CT GEN	CT GADPH	ΔCT	REGRESIÓN	EFICIENCIA (%)
LRP-1	1	0	18,18	19,34	-1,16	-3,36x + 18,09	99,40
	1/10	-1	21,27	22,24	-0,97		
	1/100	-2	24,90	25,95	-1,05		
CD36	1	0	24,63	19,34	5,29	-3,29x + 24,51	101,35
	1/10	-1	27,54	22,24	5,30		
	1/100	-2	31,20	25,95	5,25		
MSR-1	1	0	28,54	19,34	9,20	-3,12x + 28,39	109,18
	1/10	-1	31,22	22,24	8,98		
	1/100	-2	34,78	25,95	8,83		
IL-1β	1	0	16,70	19,34	-2,64	-3,27x + 16,72	102,20
	1/10	-1	20,03	22,24	-2,21		
	1/100	-2	23,24	25,95	-2,71		
TNF-α	1	0	18,52	19,34	-0,82	-3,23x + 18,40	103,98
	1/10	-1	21,39	22,24	-0,85		
	1/100	-2	24,98	25,95	-0,97		
CCR2	1	0	29,55	31,25	-1,70	-3,29x + 29,59	101,35
	1/10	-1	32,96	34,58	-1,62		
	1/100	-2	36,13	37,83	-1,70		
CCL2	1	0	26,49	19,34	7,15	-3,15x + 26,38	107,70
	1/10	-1	29,29	22,24	7,05		
	1/100	-2	32,78	25,95	6,83		

DIL (dilución); LOG (logaritmo); CT (*cycle threshold*)

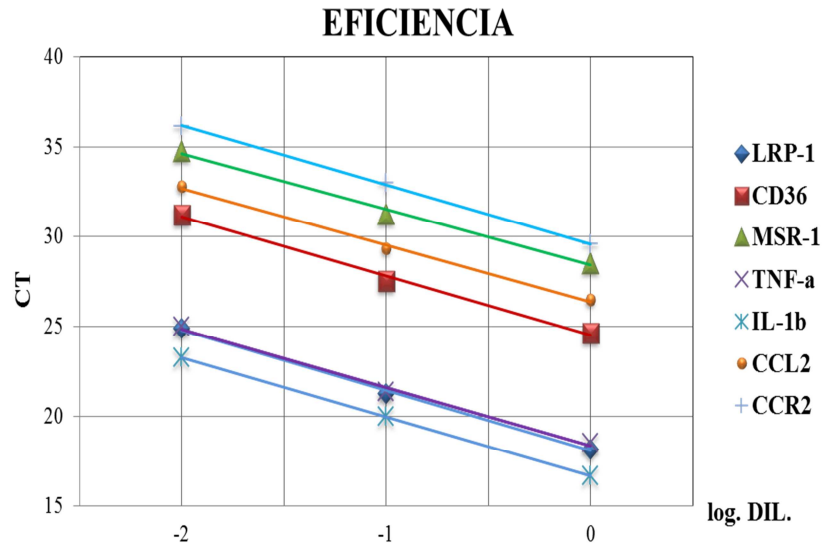


Figura 14: Curvas de eficiencia de amplificación.

Se muestran las curvas que relacionan C_T (Eje y) versus logaritmo de la dilución del ARNm (Eje x) para cada biomarcador estudiado (LRP-1; CD36; MSR-1; TNF- α ; IL-1 β ; CCL2; CCR2) donde se puede apreciar que todos los biomarcadores poseen pendiente similar (igual eficiencia de amplificación).

Todos los genes poseen pendientes de eficiencia similares, lo cual indica que los resultados pueden ser comparables. Los resultados se relacionan con la concentración real del ARNm y no debido a un efecto en la etapa de medición.

3.12 Análisis estadístico

Se exploró la normalidad de las variables analizando media, desviación estándar, mediana, curtosis, histograma y prueba de Shapiro-Wilk.

Los resultados de variables continuas se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM). Se realizaron análisis estadísticos de t-test y ANOVA para datos con distribución normal o test no paramétrico de Wilcoxon-Mann Whitney. Las variables categóricas fueron analizadas con el test χ^2 (chi²). Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

El nivel de concordancia entre los marcadores monocíticos en función de la estratificación por riesgo FS30 se analizó empleando el Cohen's kappa index. Se aplicaron test estadísticos de variables múltiples, incluido el análisis discriminante lineal, análisis de correlación de variables múltiples y análisis de correlación canónico.

En cada caso se utilizó el *software* de análisis estadístico *Statistica 7.1* de *StatSoft Inc.* (2005) e *Infostat* (2008).

Los gráficos fueron realizados mediante Microsoft Excel y GraphPad Prism vs5.0

4. RESULTADOS

4.1 Expresión de biomarcadores en leucocitos

Los monocitos circulantes son reclutados hacia los sitios de lesión por citocinas inflamatorias liberadas desde CE activadas, constituyendo el inicio de la patología aterosclerótica. En este trabajo se cuantificó la expresión de diferentes potenciales biomarcadores en monocitos para el diagnóstico temprano de la aterosclerosis. Respecto a los biomarcadores estudiados, interesa conocer su abundancia en leucocitos circulantes y así establecer su potencial distribución y contribución en dicha enfermedad. Por lo tanto, mediante tecnología de citometría de flujo (FACS), se procedió a caracterizar las células circulantes obtenidas de sangre periférica, en función de su complejidad nuclear y citoplasmática (SSC) y el marcador de superficie común a todos los leucocitos, CD45 (CD45-PC5.5; marcación pan-leucocitaria). En la Figura 15 se observa la caracterización de tres subpoblaciones que representan principalmente a Granulocitos (I), Monocitos (II) y Linfocitos (III).

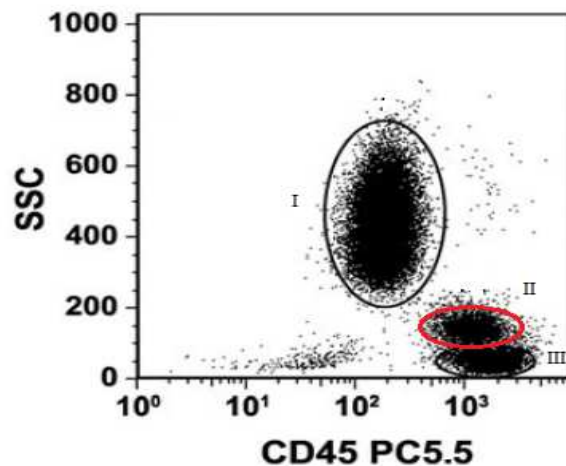


Figura 15: Citometría de flujo (FACS) de células de sangre periférica.

Se muestra en el gráfico la relación entre SSC (*Eje y*) versus la expresión del marcador en superficie celular CD45 (CD45-PC5.5) (*Eje x*). Mediante la relación, pueden ser caracterizadas tres subpoblaciones de leucocitos que mayoritariamente representan a: (I) granulocitos, (II) monocitos (círculo rojo) (III) linfocitos.

Cada una de las subpoblaciones leucocitarias fueron colectadas por tecnología FACS *cell sorting*, centrifugadas para concentrar el *pellet* celular, posteriormente tratadas con TRIzol®, extraído y purificado el ARNm y por último cuantificado mediante ensayos de RT-qPCR para determinar la expresión de los biomarcadores propuestos: LRP-1, CD36, MSR-1, CCL2, TNF- α , IL-1 β y CCR2 utilizando GAPDH como normalizador. La Figura 16 muestra los resultados normalizados de estos ensayos donde se observa que todos los biomarcadores medidos, son expresados principalmente en la población de monocitos y en menor medida en

linfocitos o granulocitos.

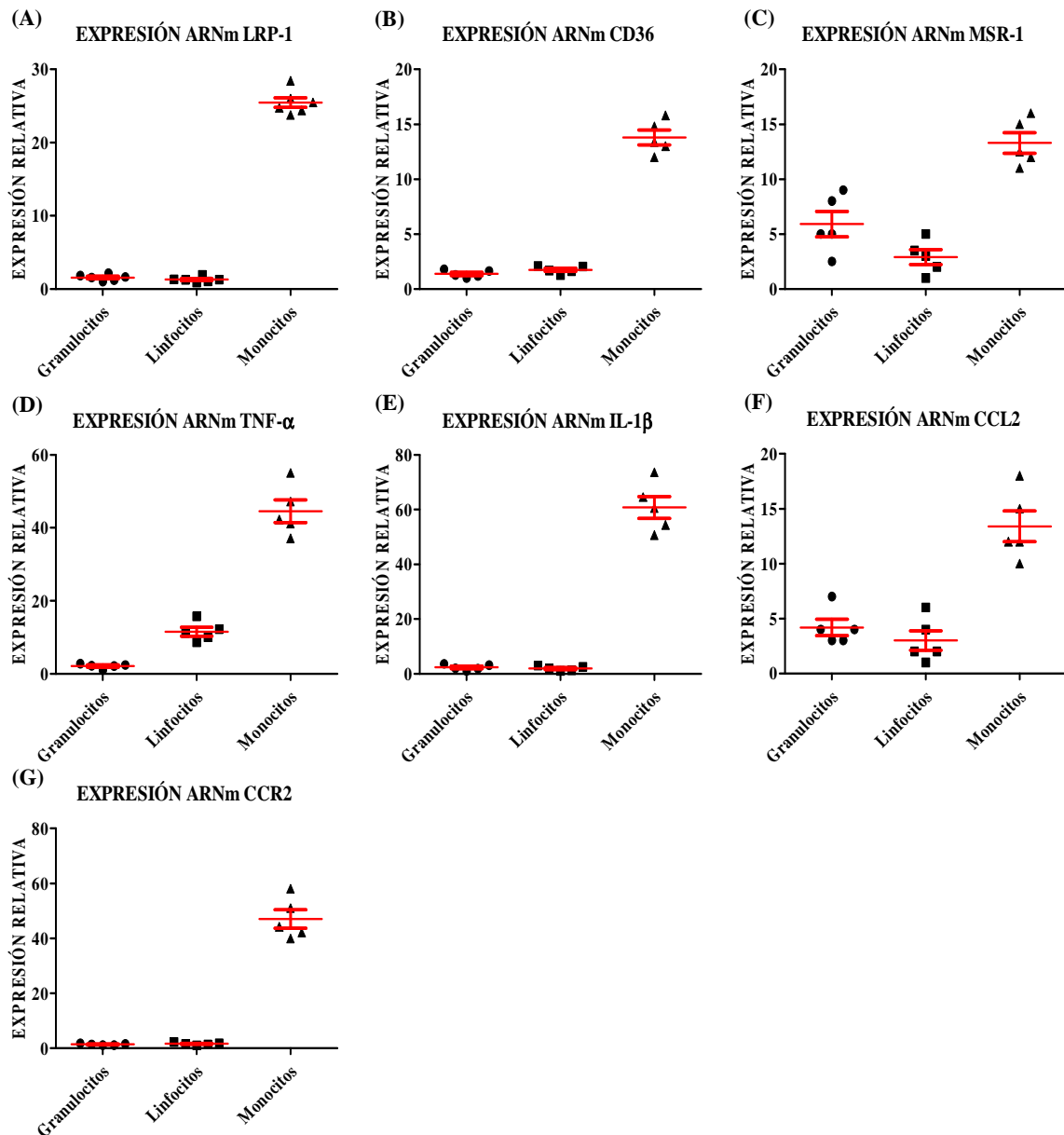


Figura 16: Expresión relativa de ARNm de biomarcadores en leucocitos de sangre periférica.

Se muestra la expresión relativa de ARNm de cada biomarcador normalizada respecto al biomarcador de menor expresión (*Eje y*). La expresión fue determinada por RT-qPCR y calculada como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de cada biomarcador de interés respecto al ARNm GADPH (normalizador interno) en cada subpoblación leucocitaria aislada por FACS, granulocitos, linfocitos y monocitos, datos mostrados corresponden a media \pm SEM de cinco ensayos independientes. (A) LRP-1; (B) CD36; (C) MSR-1; (D) TNF- α ; (E) IL-1 β ; (F) CCL2; (G) CCR2.

4.2 Niveles de expresión proteica (LRP-1 y CD36) en leucocitos

Además de la expresión de ARNm de los biomarcadores medida en las subpoblaciones leucocitarias separadas por citometría de flujo (FACS, SSC versus CD45-PC5.5), se realizaron análisis de expresión proteica (*Western Blot*) para dos marcadores de especial

interés, LRP-1 y CD36 y así determinar si existe correlación entre expresión de ARNm y sus correspondientes niveles de proteína. En la Figura 17 se observa que tanto LRP-1 como CD36, se encuentran preferentemente expresados en la subpoblación de monocitos, con niveles indetectables o débilmente detectados en linfocitos y granulocitos, lo cual está en concordancia con la expresión de ARNm anteriormente mostrada para cada una de las subpoblaciones leucocitarias.

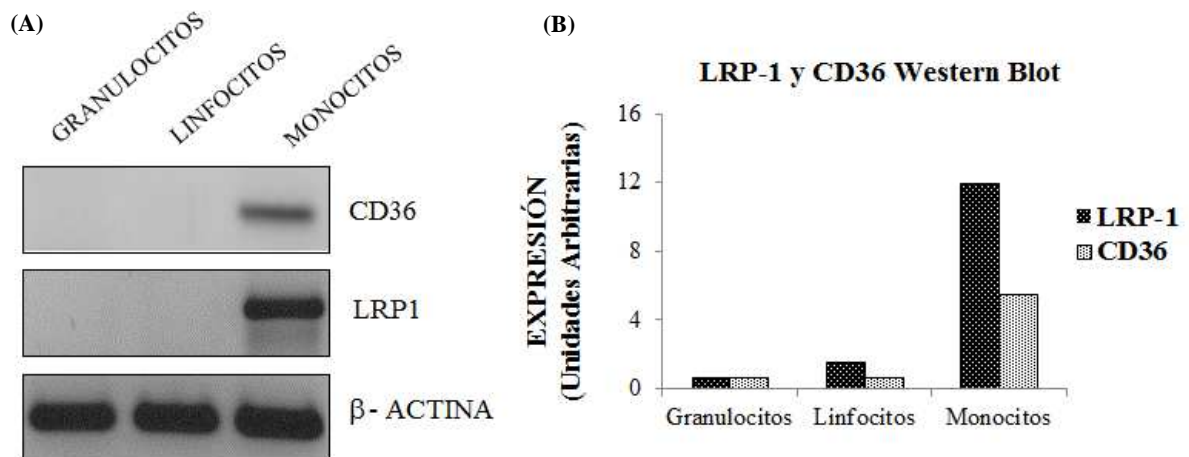


Figura 17: Ensayos de *Western Blot* para LRP-1 y CD36 en subpoblaciones de leucocitos separadas por FACS. (A) Resultados de *Western Blot* para CD36 y LRP-1 en extractos proteicos celulares de las tres subpoblaciones de leucocitos: granulocitos, linfocitos y monocitos utilizando como control de carga proteica a β -actina. (B) Análisis densitométrico (expresado como Unidades Arbitrarias) de las bandas de los ensayos de *Western Blot* para LRP-1 y CD36 relativo a β -actina para las tres subpoblaciones de leucocitos.

4.3 Expresión de biomarcadores en leucocitos (Gradiente de Ficoll versus FACS)

La aislación de células a partir de la citometría de flujo (FACS), presenta alta especificidad para el aislamiento de poblaciones celulares, sin embargo, requiere de grandes volúmenes de sangre periférica, equipo costoso, personal altamente calificado y procesamiento de las muestras en corto plazo, con lo cual se generan limitaciones técnicas para ser utilizada como el método de análisis de los marcadores propuestos dentro de la práctica clínica. Una alternativa disponible, por su bajo costo y poca complejidad, es el aislamiento celular mediante gradientes de densidad, el más común de todos, utiliza una solución de Ficoll, procedimiento mediante el cual, pueden separarse dos poblaciones de leucocitos de sangre periférica, granulocitos y mononucleares, con un grado de pureza superior al 97%. Para determinar si el método que se emplearía en el estudio reporta la expresión real de los biomarcadores en sangre periférica, se realizó la comparación de la

expresión de ARNm de los biomarcadores, entre el método de Ficoll, en el cual se obtienen células mononucleares (linfocitos y monocitos) y la separación de monocitos por citometría de flujo (FACS, SSC versus CD45-PC5.5). Para ello se realizaron aislamientos celulares por ambos métodos en las mismas muestras de sangre periférica obtenidas de donantes voluntarios de nuestro laboratorio. Cada una de las fracciones celulares colectadas fueron centrifugadas para concentrar el *pellet* celular, posteriormente tratadas con TRIzol®, extraído y purificado el ARNm y por último cuantificado mediante ensayos de RT-qPCR para determinar la expresión de los biomarcadores propuestos: LRP-1, CD36, MSR-1, CCL2 y CCR2 utilizando GADPH como normalizador.

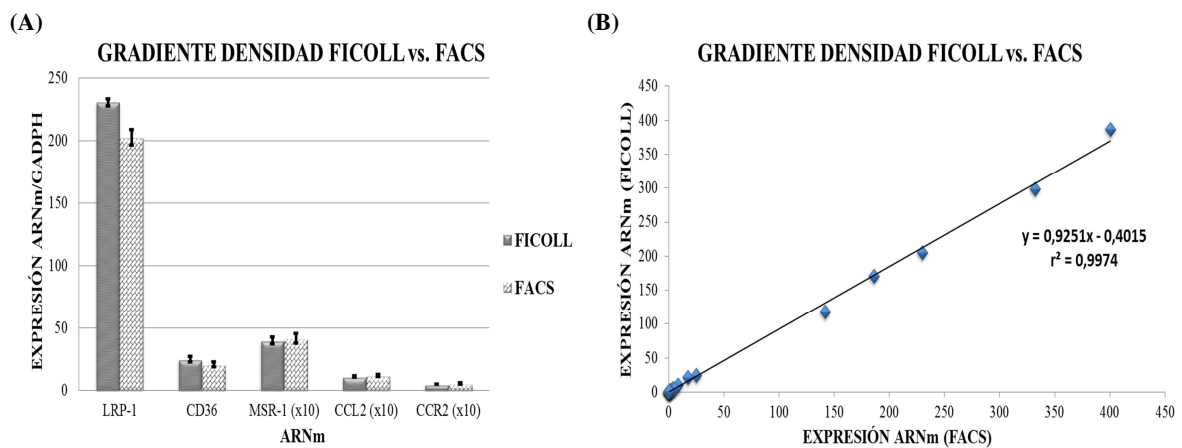


Figura 18: Análisis comparativos de biomarcadores en monocitos aislados por FACS versus células mononucleares obtenidas por Gradiente de Ficoll.

(A) Expresión relativa de ARNm respecto al ARNm normalizador (GADPH) (*Eje y*), determinada por RT-qPCR y representada como $2^{-\Delta\Delta C_t}$, monocitos aislados por FACS y el componente mononuclear obtenido por gradiente de Ficoll, las expresiones de MSR-1, CCL2 y CCR2 se representan incrementadas 10 veces para magnificar, datos mostrados corresponden a media \pm SEM determinada en cinco ensayos independientes. El análisis estadístico de la comparación de los resultados de expresión para cada biomarcador por ambos métodos (Ficoll vs. FACS) no mostró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$). (B) Recta de regresión entre ambos métodos de aislamiento ($n=10$), monocitos (FACS) y el componente mononuclear (gradiente de Ficoll).

En la Figura 18 se muestran los resultados de los biomarcadores ensayados, donde se observa una excelente asociación lineal ($r^2=0,9974$) para la expresión de los biomarcadores determinados en células mononucleares separadas por método de Ficoll y monocitos aislados por citometría de flujo (FACS), no hallándose diferencia estadísticamente significativa para los resultados de expresión de ARNm de los biomarcadores estudiados entre ambos métodos ($p > 0,05$). Si bien el componente linfocitario es predominante (mayor porcentual) en la población de células mononucleares separadas por el método con Ficoll, la contribución a la expresión de cada biomarcador realizada por los linfocitos, es significativamente menor

respecto a la expresión en monocitos. Por lo tanto, la expresión de cada biomarcador en la población de células mononucleares separadas por Ficoll, representa la expresión de dicho marcador en la población de monocitos.

4.4 Expresión de biomarcadores en subpoblaciones de monocitos

Existen al menos tres subpoblaciones diferentes dentro de los monocitos, las cuales exhiben diferentes moléculas de superficie y propiedades funcionales, respecto a su comportamiento inflamatorio, reclutamiento a la pared del vaso y contribución a la aterosclerosis. Otro de los objetivos planteados fue determinar la abundancia de los biomarcadores estudiados en las diferentes subpoblaciones de monocitos. Mediante FACS, según la estrategia de aislamiento descrita (ver Pacientes, Materiales y Métodos), se aislaron tres subpoblaciones de monocitos: clásicos (MC, $CD14^{++}/CD16^{-}$), monocitos intermedios (MI, $CD14^{++}/CD16^{+}$) y monocitos no clásicos (MnC, $CD14^{+}/CD16^{++}$) (Figura 19).

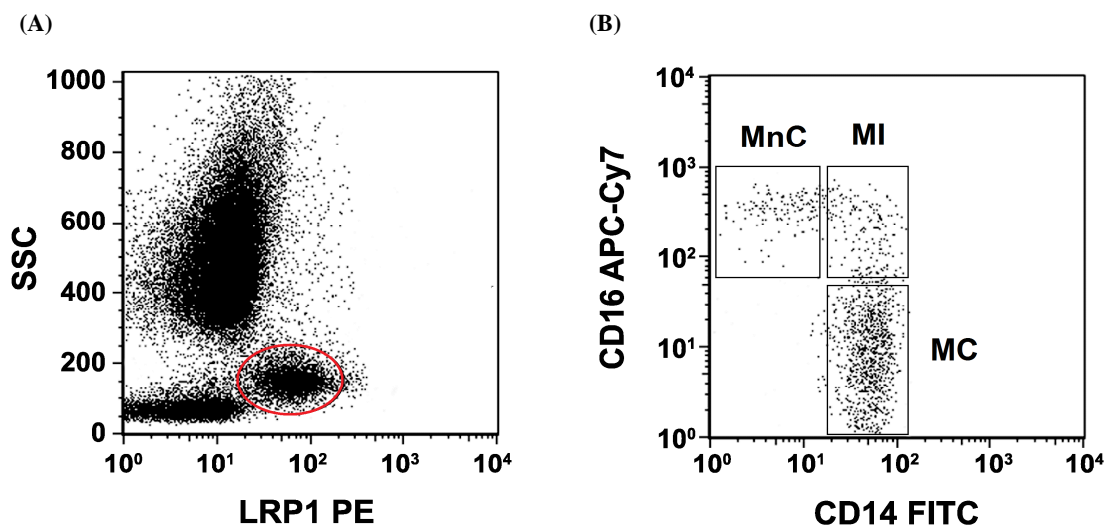


Figura 19: Estrategia de separación de subpoblaciones de monocitos.

(A) Gráfico FACS de la separación de leucocitos de sangre periférica por la relación entre SSC (*Eje y*) versus LRP-1 (*Eje x*). Mediante esta técnica, pueden ser aisladas tres subpoblaciones de leucocitos, a saber, granulocitos, monocitos (círculo rojo) y linfocitos. Selección (*gating*) de la zona de monocitos a partir de la cual se aíslan células que expresan mayor LRP-1. (B) Separación en función de la expresión superficial de CD16 (*Eje y*) y CD14 (*Eje x*), en la cual pueden separarse tres subpoblaciones: monocitos clásicos (MC), $CD14^{++}/CD16^{-}$, monocitos intermedios (MI), $CD14^{++}/CD16^{+}$ y monocitos no clásicos (MnC), $CD14^{+}/CD16^{++}$.

La Figura 20 muestra los resultados de expresión de ARNm de los biomarcadores ensayados (LRP-1, CD36, TNF- α , y CCR2) por RT-qPCR. Todos los biomarcadores estudiados presentan mayores niveles de expresión en la subpoblación de monocitos clásicos

(CD14⁺⁺/CD16⁻) y monocitos intermedios (CD14⁺⁺/CD16⁺).

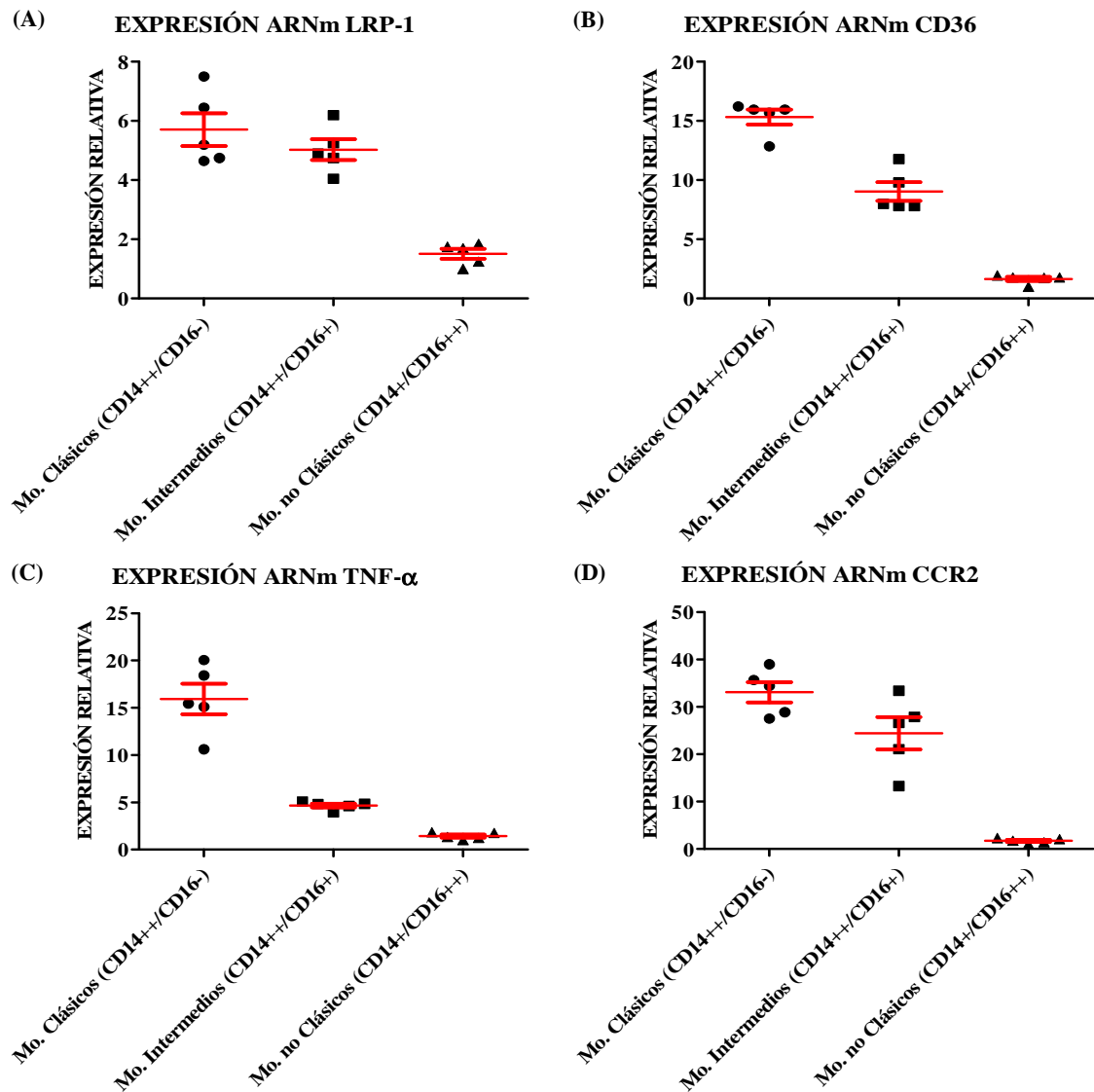


Figura 20: Expresión relativa de ARNm de biomarcadores en subpoblaciones de monocitos de sangre periférica. Se muestra la expresión relativa de ARNm de cada biomarcador normalizada respecto al biomarcador de menor expresión (*Eje y*). La expresión fue determinada por RT-qPCR y calculada como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de cada biomarcador de interés respecto al ARNm GADPH (normalizador interno) en cada subpoblación de monocitos aislada por FACS, Mo. clásicos, Mo. intermedios y Mo. no clásicos, datos mostrados corresponden a media \pm SEM de cinco ensayos independientes. **(A)** LRP-1; **(B)** CD36; **(C)** TNF- α ; **(D)** CCR2.

La subpoblación de monocitos clásicos representa la de mayor importancia cuantitativa respecto a las otras subpoblaciones intermedias y no clásicas ($\approx 81\%$ versus 8% y 11% respectivamente), lo que significa que en la población de monocitos totales, la expresión de un biomarcador, refleja la expresión de dicho marcador en la subpoblación de monocitos clásicos.

4.5 Expresión de biomarcadores en individuos con bajo riesgo de ECV (BR) y con aterosclerosis subclínica (AtS)

Un total de 319 individuos fueron enrolados siguiendo los criterios de inclusión y exclusión detallados (ver Pacientes, Materiales y Métodos), De acuerdo a estos criterios más los resultados ecográficos de carótida, datos clínicos, parámetros bioquímicos y de riesgo cardiovascular (FS) se obtuvieron dos grupos de estudio:

- GRUPO BAJO RIESGO n=21 (BR) aquellos que cumplieron todos los criterios de inclusión, sin evidencia ecográfica de aterosclerosis en arterias carotídeas. Adicionalmente, de los veintiún individuos, once individuos (n=11) fueron confirmados como de bajo riesgo por puntaje de calcio coronario (PCC).
- GRUPO ATEROESCLEROSIS SUBCLÍNICA n=82 (AtS) aquellos que presentaron factores de riesgo cardiovascular y evidencia ecográfica de aterosclerosis subclínica en arterias carotídeas. Adicionalmente, de los ochenta y dos individuos, setenta y dos individuos (n=72) fueron confirmados por PCC.

Del grupo de individuos con aterosclerosis subclínica (AtS), la totalidad (n=82) fueron analizados para la expresión de LRP-1 y CD36 en superficie celular por FACS, de los cuales, sólo a cuarenta y dos individuos (n=42), seleccionados al azar, se les cuantificó la expresión de ARNm de los biomarcadores LRP-1, CD36, MSR-1, TNF- α , IL-1 β , CCL2 y CCR2 por RT-qPCR.

El resto de los individuos (n=216) que no clasificaron dentro de los grupos BR y AtS conformaron un grupo intermedio de riesgo, puesto que no pueden ser considerados de bajo riesgo (por poseer factores de riesgo cardiovascular), pero tampoco presentan evidencia ecográfica de aterosclerosis en arterias carótidas.

En la Tabla IX se presentan los parámetros antropométricos, clínicos y bioquímicos de los individuos clasificados en cada uno de los grupos BR y AtS, observándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, en los parámetros antropométricos (edad, peso, IMC, diámetro cintura abdominal) y presión arterial (diastólica y sistólica). De estos datos se desprende que existe concordancia entre los resultados de cada parámetro en ambos grupos, con la presencia de factores predisponentes de riesgo aterogénico, como mayor edad, sobrepeso (establecido por peso, IMC y diámetro de cintura abdominal) y mayor presión arterial. La misma conclusión se desprende de los resultados de laboratorio, con diferencias

estadísticamente significativas entre ambos grupos (BR versus AtS), en parámetros relacionados a dislipemia (colesterol total, triglicéridos, LDL-colesterol, apolipoproteína B100 más elevados y; HDL-colesterol, apolipoproteína A1 más bajos), y aquellos vinculados con la presencia de síndrome metabólico, tales como hiperglucemia, hiperinsulinemia e incremento de HbA1C. No obstante, entre ambos grupos no se observa diferencia estadística para apolipoproteína (a) ni creatinina.

Tabla IX: Características antropométricas, clínicas y bioquímicas de los individuos estudiados

	BR (n=21)	AtS (n=82)	p (BR/AtS)
SEXO (Mujeres/Hombres)	12/9	37/45	---
EDAD (años)	36,10±9,10	49,27±7,61	<0,0001 (***)
PA SISTÓLICA (mmHg)	110,00±10,49	119,77±12,19	0,0011 (*)
PA DIASTÓLICA (mmHg)	75,19±5,83	83,27±7,51	<0,0001 (***)
PESO (kg)	58,53±8,31	78,24±13,69	<0,0001 (***)
IMC (kg/m²)	21,87±2,10	26,89±3,74	<0,0001 (***)
DIÁMETRO CINTURA ABDOMINAL (cm)	78,00±5,79	94,89±8,72	<0,0001 (***)
COLESTEROL TOTAL (mg/dL)	161,95±23,47	203,94±34,23	<0,0001 (***)
HDL-COLESTEROL (mg/dL)	67,95±17,75	49,02±14,94	<0,0001 (***)
LDL-COLESTEROL (mg/dL)	88,95±16,96	132,56±29,64	<0,0001 (***)
TRIGLICÉRIDOS (mg/dL)	59,76±14,17	133,24±75,59	<0,0001 (***)
APOLIPOPROTEÍNA A1 (mg/dL)	141,29±24,79	125,30±23,45	0,007 (*)
APOLIPOPROTEÍNA B100 (mg/dL)	49,95±13,17	84,82±23,56	<0,0001 (***)
LIPOPROTEÍNA (a) (mg/dL)	41,00±32,12	55,97±58,18	0,1236 (NS)
GLUCOSA (mg/dL)	90,71±5,72	100,93±9,04	<0,0001 (***)
CREATININA (mg/dL)	0,90±0,2	0,90±0,2	0,5510 (NS)
INSULINA (μU/mL)	5,09±2,22	8,50±4,94	<0,0001 (***)
HbA1c (%)	5,20±0,29	5,53±0,40	0,0007 (**)

PA (presión arterial); IMC (índice masa corporal); BR (bajo riesgo); AtS (ateroesclerosis subclínica); resultados expresados como media±SEM; p (probabilidad, Mann-Whitney test); *** (p<0,0001); ** (p<0,001); * (p<0,05); NS (no significativo)

La presencia de factores de riesgo aterogénico (dislipemia y síndrome metabólico), reflejó resultados de puntajes de riesgo cardiovascular más elevados en el grupo AtS, independientemente de la ecuación de Framingham aplicada (Tabla X).

Tabla X: Puntajes de riesgo cardiovascular de los individuos estudiados

ECUACIONES	BR (n=21)	AtS (n=82)	p (BR/AtS)
FS H 10	0,91±0,03	4,59±5,16	<0,0001 (***)
FS CVD 10	1,57±0,75 (n=14)	8,94±6,8	<0,0001 (***)
FS 30 L H	3,24±2,14	21,12±12,17	<0,0001 (***)
FS 30 BMI H	4,62±3,51	22,85±13,56	<0,0001 (***)
FS 30 L CVD	6,95±4,08	34,18±15,84	<0,0001 (***)
FS 30 BMI CVD	9,38±6,11	35,70±16,79	<0,0001 (***)
SCORE ARIC	0,60±0,10 (n=3)	5,76±4,71 (n=59)	<0,0001 (***)
PCC 10	0,34±0,22 (n=11)	4,48±3,85 (n=70)	<0,0001 (***)
PCC LIFETIME RISK	17,90±11,93	42,72±13,41	<0,0001 (***)

FRS (*Framingham Score*); H (*hard*); CVD (*Cardiovascular Disease*); L (*Lipid*); BMI (*Body Mass Index*); PCC (puntaje calcio coronario); BR (bajo riesgo); AtS (ateroesclerosis subclínica); resultados expresados como media±SEM; p (probabilidad, Mann-Whitney test); *** (p<0,0001); ** (p<0,001); * (p<0,05); NS (no significativo)

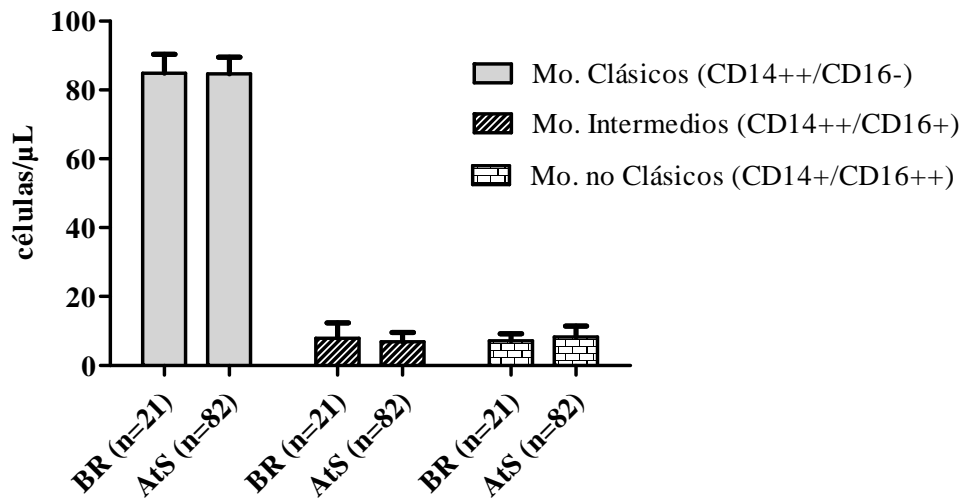
El hallazgo de diferencias significativas en la expresión de biomarcadores en monocitos de sangre periférica, entre individuos con bajo riesgo de desarrollo de aterosclerosis y aquellos que presentan aterosclerosis subclínica, le conferiría una potencial utilidad diagnóstica, y su inclusión dentro de los evaluadores de riesgo cardiovascular tradicionales, mejoraría el impacto predictivo. Como se demostró, los biomarcadores son expresados mayoritariamente por monocitos, con un aporte menor por parte de los demás leucocitos. Dentro de estas consideraciones, se procedió a medir en ambos grupos de individuos reclutados el recuento de leucocitos totales y así como de sus correspondientes subpoblaciones, con el propósito de determinar si las diferencias en los niveles de expresión de los biomarcadores en cada componente celular corresponden a cambios netos de expresión en un tipo celular o sólo reflejan modificaciones en el recuento de leucocitos totales, monocitos y/o subpoblaciones de monocitos.

Tabla XI: Parámetros leucocitarios de las muestras estudiadas

	BR (n=21)	AtS (n=82)	p (BR/AtS)
LEUCOCITOS (células/μL)³	7,1 \pm 1,7	6,9 \pm 1,7	0,7550 (NS)
MONOCITOS (%)	7,6 \pm 2,3	7,7 \pm 1,9	0,9014 (NS)
MONOCITOS CLÁSICOS - CD14⁺⁺/CD16⁻ (%)	84,90 \pm 5,47	84,74 \pm 4,71	0,8912 (NS)
MONOCITOS INTERMEDIOS - CD14⁺⁺/CD16⁺ (%)	7,86 \pm 4,54	6,85 \pm 2,75	0,3433 (NS)
MONOCITOS NO CLÁSICOS - CD14⁺/CD16⁺⁺ (%)	7,24 \pm 1,97	8,30 \pm 3,19	0,0623 (NS)

BR (bajo riesgo); AtS (ateroesclerosis subclínica); resultados expresados como media \pm SEM; p (probabilidad, Mann-Whitney test); *** (p<0,0001); ** (p<0,001); * (p<0,05); NS (no significativo)

PERFIL MONOCÍTICO EN SANGRE PERIFÉRICA

**Figura 21:** Perfil monocítico en sangre periférica

Se muestran los recuentos absolutos correspondiente a cada subpoblación de monocitos (clásicos, intermedios y no clásicos) en sangre periférica de individuos BR (n=21) e individuos AtS (n=82), datos mostrados corresponden a media \pm SEM.

En la Tabla XI y Figura 21 se muestran los parámetros leucocitarios medidos en ambos grupos (BR versus AtS), donde no muestran diferencias estadísticamente significativas en el recuento de leucocitos, porcentaje de monocitos totales y distribución porcentual de las subpoblaciones de monocitos. Por lo tanto, el mayor riesgo cardiovascular (determinado por ecuaciones y factores de riesgo) no reflejó un cambio leucocitario, ni en la proporción de monocitos o subpoblaciones circulantes en sangre periférica. Por lo tanto, la homogeneidad de estos parámetros celulares en ambos grupos, no requiere realizar futuras correcciones en los resultados de expresión de los biomarcadores determinados en monocitos circulantes o subpoblaciones.

4.6 Expresión de LRP-1 y CD36 en superficie celular de monocitos totales y

subpoblaciones monocíticas por FACS

LRP-1 participa en varios mecanismos responsables de la iniciación y progresión de la placa aterosclerótica, mientras que la importancia de CD36 radica en la captación de lipoproteínas modificadas, y junto a otros receptores *scavenger* son, responsables de la formación de *foam cells* y estría grasa en la placa de ateroma. En la Figura 22 se muestran los valores de LRP-1 medidos por FACS en la superficie de monocitos totales donde se observa una significativa disminución ($p=0,0260$) de este receptor en individuos AtS respecto a los individuos BR.

LRP-1 EN SUPERFICIE CELULAR MONOCITOS

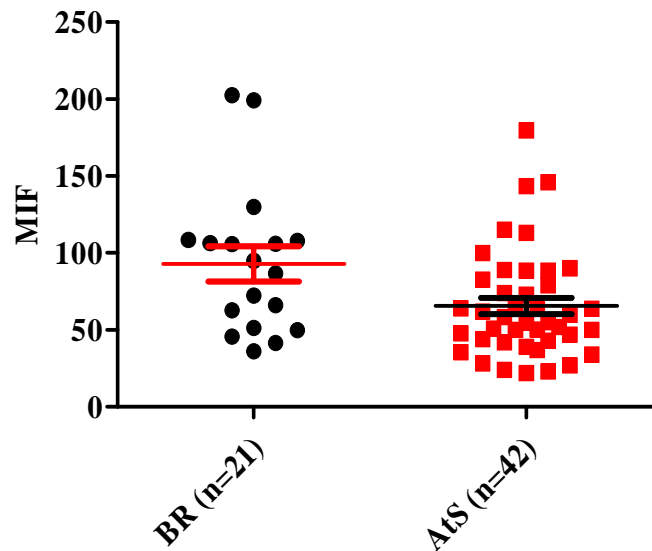


Figura 22: LRP-1 en superficie celular de monocitos totales.

El gráfico muestra la Intensidad de Fluorescencia Media (MIF, Eje y) determinada por FACS en la población de Monocitos para ambos grupos de estudio, BR versus AtS, datos mostrados corresponden a la media \pm SEM. La comparación de medias se realizó mediante test estadístico Mann-Whitney dando diferencia estadísticamente significativa ($p=0,0260$).

La Figura 23 muestra los resultados del análisis de LRP-1 en subpoblaciones de monocitos donde se observa una tendencia a la disminución de este receptor en las tres subpoblaciones monocíticas en individuos AtS respecto a los individuos BR. Sin embargo, la disminución con significancia estadística ($p=0,0249$), sólo se observa en la subpoblación de monocitos clásicos.

LRP-1 EN SUP. CELULAR SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS

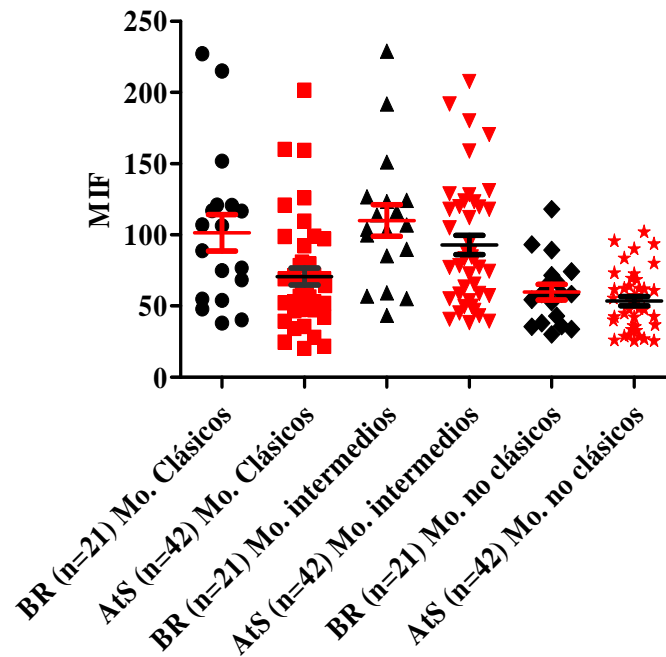


Figura 23: LRP-1 en superficie celular de subpoblaciones de monocitos.

El gráfico muestra la Intensidad de Fluorescencia Media (MIF, *Eje y*) determinada por FACS en cada una de las subpoblaciones (Mo. clásicos, BR n=21 y AtS n=42; Mo. intermedios, BR n=21 y AtS n=42; Mo. no clásicos, BR n=21 y AtS n=42), datos mostrados corresponden a la media \pm SEM. La comparación de medias se realizó mediante test estadístico Mann-Whitney del grupo BR versus AtS para cada subpoblación de monocitos, dando diferencia estadísticamente significativa sólo para monocitos clásicos ($p=0,0249$).

Aplicando el mismo análisis para la expresión de CD36 en superficie celular de monocitos totales, se observa una tendencia al aumento en AtS, sin llegar a ser estadísticamente significativo ($p>0,05$) (Figura 24).

CD36 EN SUPERFICIE CELULAR MONOCITOS

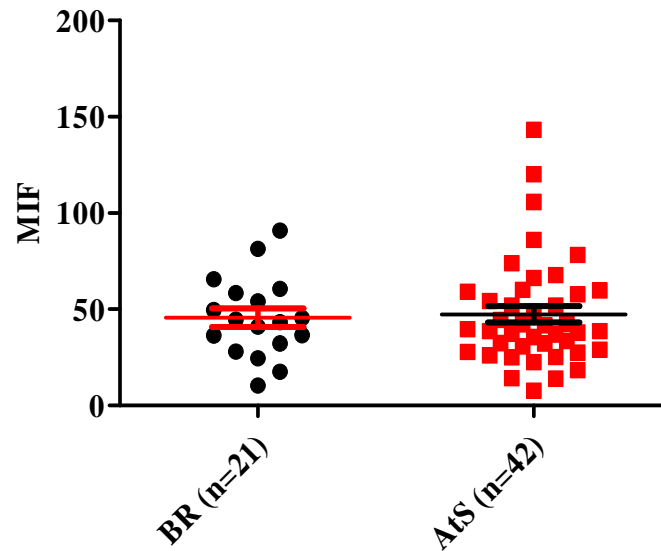


Figura 24: CD36 en superficie celular de monocitos totales.

El gráfico muestra la Intensidad de Fluorescencia Media (MIF, *Eje y*) determinada por FACS en la población de monocitos para ambos grupos de estudio, BR versus AtS, datos mostrados corresponden a media \pm SEM. La comparación de medias se realizó mediante test estadístico Mann-Whitney del grupo BR versus AtS dando diferencia no significativa ($p=0,7963$).

Respecto al análisis de CD36 en subpoblaciones de monocitos, se observó una tendencia de aumento en las tres subpoblaciones (clásicos, intermedios y no clásicos), sin embargo, sólo resulta significativo ($p=0,0064$), en la población minoritaria de monocitos no clásicos (Figura 25).

CD36 EN SUP. CELULAR SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS

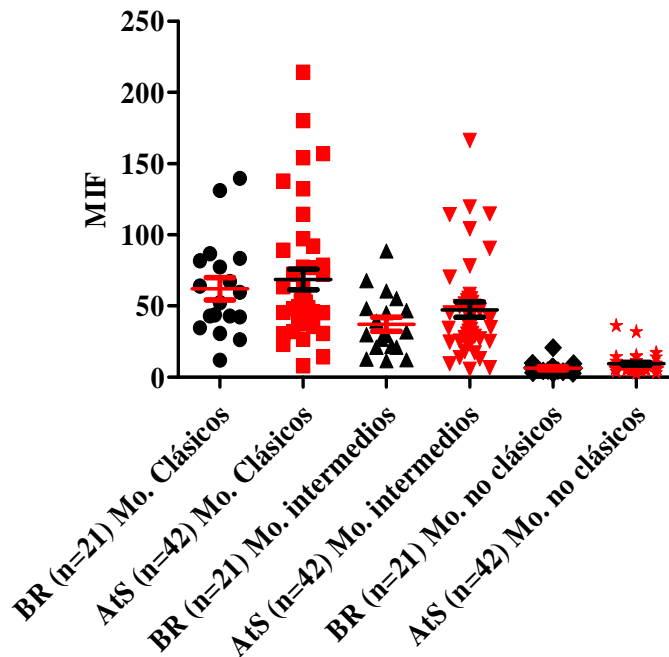


Figura 25: CD36 en superficie celular de subpoblaciones de monocitos.

El gráfico muestra la Intensidad de Fluorescencia Media (MIF, *Eje y*) determinada por FACS en cada una de las subpoblaciones (Mo. clásicos, BR n=21 y AtS n=42; Mo. intermedios, BR n=21 y AtS n=42; Mo. no clásicos, BR n=21 y AtS n=42), datos mostrados corresponden a media \pm SEM. La comparación de medias se realizó mediante test estadístico Mann-Whitney del grupo BR versus AtS para cada subpoblación de Monocitos, obteniéndose diferencia significativa sólo para monocitos no clásicos ($p=0,0064$).

4.7 Expresión de ARNm específico de LRP-1, CD36 y MSR-1 en células mononucleares

por RT-qPCR

Los análisis de expresión de ARNm de LRP-1, CD36 y MSR-1 por RT-qPCR en células mononucleares separadas por gradiente de Ficoll de ambos grupos (BR versus AtS), concuerda con lo determinado para la expresión proteica de LRP-1 y CD36 en membrana celular por FACS, con diferencia estadísticamente significativa ($p=0,0002$) para la disminución en la expresión del ARNm de LRP-1 en el grupo AtS respecto al grupo BR. Nuevamente se observa un aumento en la expresión del ARNm de CD36 en el grupo de mayor riesgo aterogénico (AtS) sin llegar a tener significación estadística. El otro receptor *scavenger*, muestra niveles de expresión muy bajos en ambos grupos, observándose un aumento en los niveles de expresión del ARNm de MSR-1 en el grupo AtS ($p<0,0001$) (Figura 26).

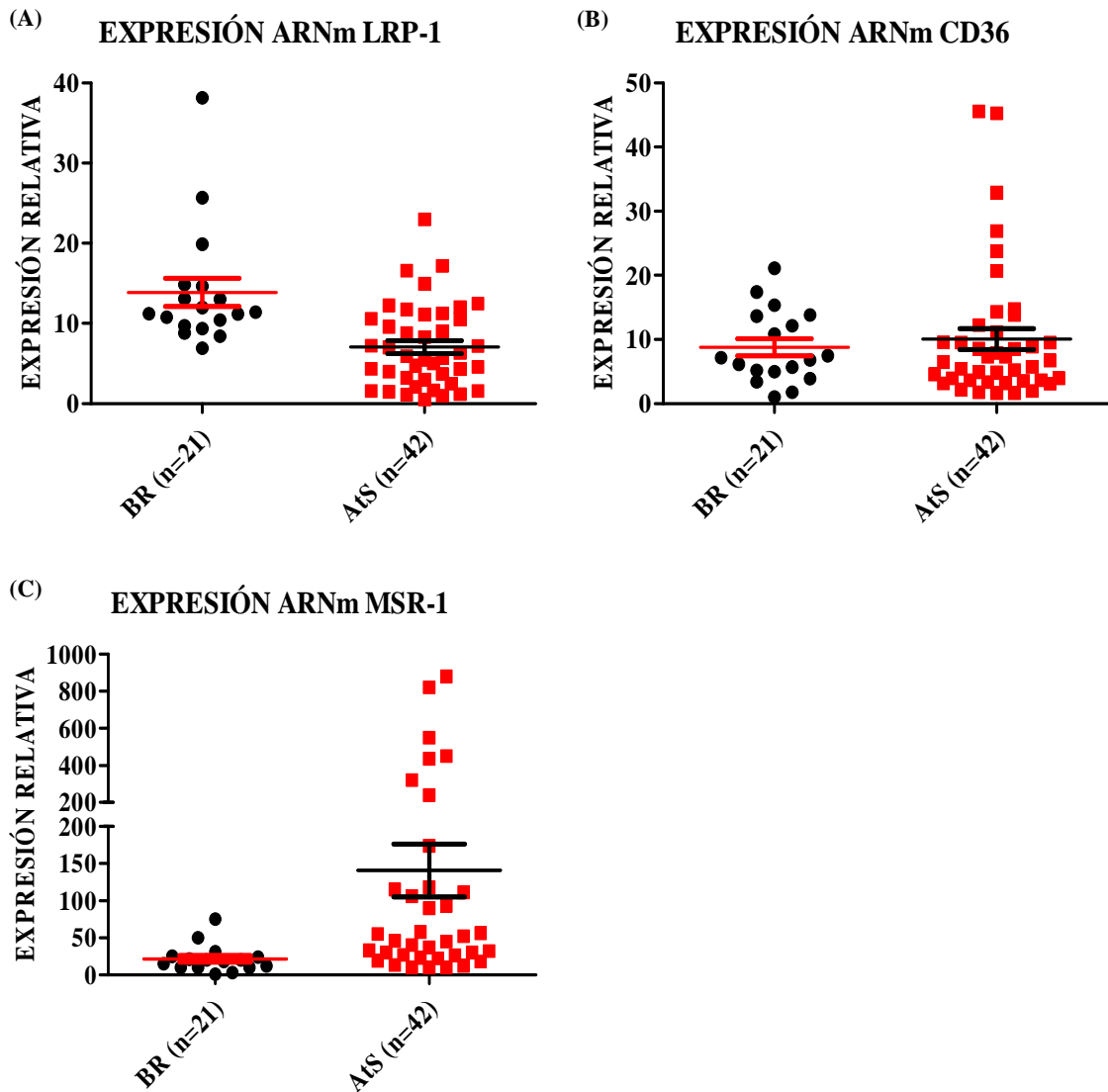


Figura 26: Expresión de ARNm de biomarcadores en células mononucleares de sangre periférica. Se muestra la expresión relativa de ARNm de cada biomarcador respecto al ARNm normalizador (GADPH), determinado por RT-qPCR y representado como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en Células Mononucleares aisladas por gradiente de Ficoll, datos mostrados corresponden a la media \pm SEM. La comparación de medias se realizó mediante test estadístico Mann-Withney del grupo BR versus AtS. **(A)** Expresión relativa de LRP-1 en BR n=21 versus AtS n=42 dando diferencia estadísticamente significativa ($p=0,0002$). **(B)** Expresión relativa de CD36 en BR n=21 versus AtS n=42 dando diferencia no significativa ($p=0,6808$). **(C)** Expresión relativa de MSR-1 en BR n=21 versus AtS n=42 dando diferencia estadísticamente significativa ($p<0,0001$).

4.8 Expresión de ARNm de citocinas en células mononucleares por RT-qPCR

Las citocinas proinflamatorias juegan un papel clave en la iniciación y progresión de la aterosclerosis, siendo responsables del cuadro inflamatorio crónico que se inicia en la injuria endotelial. La cuantificación de estas citocinas es un indicador fehaciente del proceso, que no sólo afecta al endotelio, sino que son los monocitos circulantes los que reciben la señal

de activación desde el endotelio y comienza su reclutamiento al espacio subendotelial. En esta etapa se procedió a realizar en las células mononucleares de sangre periférica separadas por gradiente de Ficoll de ambos grupos (BR versus AtS) el perfil de expresión de ARNm para mediadores proinflamatorios. En la Figura 27 se muestra un perfil de activación proinflamatorio en células mononucleares, que a juzgar del nivel de expresión de estos factores antes mencionados, se predice que son expresados en los monocitos circulantes. De este modo se observa un aumento significativo en la expresión del ARNm de IL-1 β ($p=0,0014$) y TNF- α ($p=0,0121$) en el grupo AtS respecto a los individuos del grupo BR.

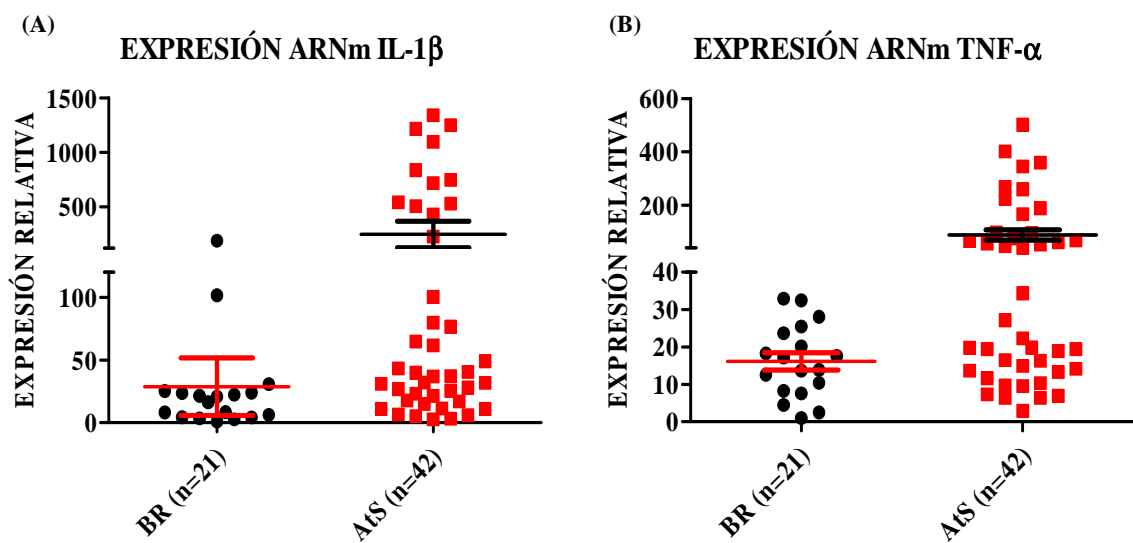


Figura 27: Expresión de ARNm de biomarcadores inflamatorios en células mononucleares de sangre periférica. Se muestra la expresión relativa de ARNm de cada biomarcador respecto al ARNm normalizador (GADPH), determinado por RT-qPCR y representado como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en células mononucleares aisladas por gradiente de Ficoll, datos mostrados corresponden a la media \pm SEM. La comparación de medias se realizó mediante test estadístico Mann-Whitney del grupo BR versus AtS. **(A)** Expresión relativa de IL-1 β en BR n=21 versus AtS n=42 dando diferencia estadísticamente significativa ($p=0,0014$). **(B)** Expresión relativa de TNF- α en BR n=21 versus AtS n=42 dando diferencia estadísticamente significativa ($p=0,0121$).

4.9 Expresión de ARNm de quimiocina y su receptor en células mononucleares por RT-qPCR

En células mononucleares de sangre periférica separadas por Ficoll de ambos grupos (BR versus AtS), fue analizado el perfil de expresión de ARNm para CCL2, considerado el principal mediador quimiotáctico para el reclutamiento de monocitos hacia el espacio subendotelial, el cual interacciona con su receptor específico CCR2. En la Figura 28 se

demuestra un estado de activación de monocitos circulantes con mayor sensibilización quimiotáctica, lo que favorece su migración hacia la íntima arterial, con aumento de expresión del ARNm de CCL2 ($p=0,0069$) y CCR2 ($p=0,0429$) en el grupo AtS respecto a los individuos del grupo BR.

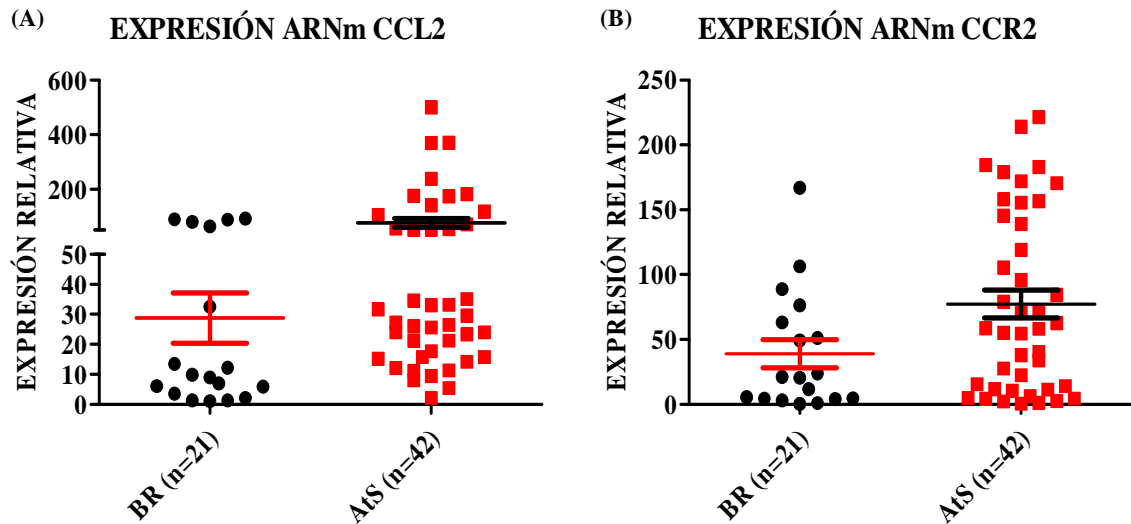


Figura 28: Expresión de ARNm de CCL2 y CCR2 en células mononucleares de sangre periférica.

Se muestra la expresión relativa de ARNm de cada biomarcador respecto al ARNm normalizador (GADPH), determinado por RT-qPCR y representado como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en células mononucleares aisladas por gradiente de Ficoll, datos mostrados corresponden a la media \pm SEM. La comparación de medias se realizó mediante test estadístico Mann-Whitney del grupo BR versus AtS. **(A)** Expresión relativa de CCL2 en BR n=21 versus AtS n=42 dando diferencia estadísticamente significativa ($p=0,0069$). **(B)** Expresión relativa de CCR2 en BR n=21 versus AtS n=42 dando diferencia estadísticamente significativa ($p=0,0429$).

5. DISCUSIÓN

El endotelio vascular es capaz de percibir estímulos sistémicos y locales, y en respuesta, modificar su estado funcional para mantener la homeostasis de la pared vascular, cuya función es intercambiar numerosas sustancias entre la sangre y tejidos, controlar el tono vascular y el tránsito de células inflamatorias (28). Además de la dislipemia y la presencia de citocinas proinflamatorias, otros factores pueden desencadenar la activación de las CE, los cuales son considerados de riesgo en el desarrollo de enfermedad cardiovascular (ECV). Entre ellos se destacan la edad, hipertensión arterial, diabetes, hiperhomocisteinemia y tabaquismo. Estos factores se asocian al incremento de estrés oxidativo y menor biodisponibilidad de NO por parte de las CE que contribuyen a la alteración del flujo sanguíneo y el desarrollo de un proceso inflamatorio crónico (29 – 33, 84). A partir de estas alteraciones en las CE, consideradas “tempranas” en el desarrollo de la aterosclerosis, es que se promueve el desarrollo de la placa de ateroma a nivel de la íntima vascular (16, 29, 32, 39, 85). Por ende, es necesario desde el punto clínico de un paciente con riesgo de ECV poder detectar modificaciones en la expresión de moléculas que se expresan a nivel de células del sistema inmune innato, principalmente en monocitos y células mononucleares de sangre periférica, con el propósito de poder disponer de biomarcadores de diagnóstico “temprano” de la aterosclerosis. En función de esto, en esta tesis se estudiaron potenciales biomarcadores, expresados en monocitos y células mononucleares, en dos grupos de contraste que agruparon individuos con bajo riesgo de desarrollo de ECV (BR) e individuos con aterosclerosis subclínica (AtS). Estos grupos de contraste se clasificaron a partir de factores y puntajes de riesgo de ECV y por estudios de imágenes, tomando como *gold standard* la detección de PAC por ecografía carotídea y PCC. De esta manera se determinó que los individuos AtS presentaron diferencias significativas en los niveles de LRP-1 así como de factores proinflamatorios en comparación con los individuos BR. Por lo tanto, estos biomarcadores monocíticos de sangre periférica constituyen potenciales herramientas de diagnóstico temprano de aterosclerosis subclínica y ECV.

Los ensayos de expresión de biomarcadores mediante qRT-PCR en monocitos y subpoblaciones de monocitos, los cuales fueron previamente aislados por citometría de flujo (FACS *sorting*), presentan una sustancial dificultad técnica. Esta obedece al gran volumen de muestra de sangre periférica que requiere ser extraída por individuo (no menos de 60 mL de sangre) para el procedimiento de aislación celular y purificación del ARN para la etapa de medición de los biomarcadores. Por ello se realizó la validación de la expresión de cada biomarcador en células mononucleares de sangre periférica, separadas por gradiente de densidad con Ficoll, lo cual requiere un menor volumen de sangre a ser extraída (4 mL). Los

resultados permitieron establecer que la expresión de cada biomarcador en la población de células mononucleares es correlativa directa a la expresión en monocitos totales, y por otra parte, también se correlaciona con la expresión medida en la subpoblación de monocitos clásicos (CD14⁺⁺/CD16⁻). Además de los ensayos de expresión de ARNm de cada biomarcador, también se realizó el análisis de expresión proteica en superficie celular de monocitos mediante FACS. La finalidad fue determinar la existencia de correlación directa entre la expresión de ARNm y expresión proteica en membrana celular. La utilización de FACS es un procedimiento más sencillo, de menor costo, sujeto a menos interferentes y requiere menor volumen de muestra que la determinación de la expresión de ARNm de los biomarcadores propuestos. A partir de esta comparación se pudo concluir que los niveles de transcripto de cada biomarcador en células mononucleares fueron correlativos a los niveles de proteínas medidos en monocitos totales y clásicos por FACS.

Se ha denominado disfunción endotelial, a toda alteración de la fisiología normal del endotelio que induce un desequilibrio de la pared vascular (29, 86, 87). La detección temprana de disfunción endotelial sería un marcador “ideal” de aterosclerosis incipiente, aunque las modificaciones que ocurren en las CE no pueden ser determinadas con facilidad por su inaccesibilidad y por ende esta posibilidad resulta poco factible para la aplicación diagnóstica en humanos (88). La activación de las CE se caracteriza por la expresión de moléculas de adhesión, tales como VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina, inducidas por citocinas proinflamatorias, incluidas TNF- α , IL-1, IFN- γ e IL-6 (87). A cambio de detectar las modificaciones que ocurren en las CE una estrategia valedera sería buscar cambios fenotípicos en los monocitos circulantes, los cuales son inducidos en respuesta a las alteraciones del endotelio (33, 51). Los monocitos, como células clave en la inmunidad innata, se dirigen a los sitios de injuria endotelial, direccionados por citocinas quimiotácticas, invaden el espacio subendotelial, se diferencian en macrófagos, proceso mediado por citocinas específicas (IL-1, TNF- α , IL-8 y GM-CSF) y expresan múltiples receptores, entre ellos, receptores *scavengers* (SR), los cuales desempeñan un papel central en la formación de FC y perpetuación del ambiente inflamatorio que domina la placa de aterosclerosis (23, 36, 89, 90). Como se demostró en este trabajo de tesis, las células mononucleares de sangre periférica en el grupo de individuos AtS respecto a individuos BR, poseen niveles incrementados en la expresión de ARNm de TNF- α e IL-1 β . Como se ha demostrado en modelos animales de aterosclerosis, TNF- α es una citocina decisiva en la inducción del proceso y tamaño de la lesión aterosclerótica, cuya inhibición, es capaz de evitar la progresión (39, 91). Por lo tanto, los monocitos circulantes de individuos con elevados

factores de riesgo aterogénico, inician un cambio fenotípico con inclinación a un estado proinflamatorio. Por su parte, IL-1 β tiene fuertes funciones inmunomoduladoras, promoviendo respuestas Th1. Modelos de ratón de aterosclerosis han confirmado la regulación positiva de moléculas de adhesión endotelial y activación de macrófagos y CE, comprobándose que la inhibición endógena de la señalización de IL-1 β en ratones *ApoE*^{-/-} o *LDL-R*^{-/-}, disminuyó notablemente el tamaño de las lesiones (39). El receptor de IL-1 señala a través de MyD88, que es un mediador crítico en la señalización de la superfamilia de receptores TLR, los cuales también son expresados por macrófagos y se asocian con la expresión de genes proinflamatorios como NF- κ B e inflamación aterosclerótica (23, 39). La activación de las CE induce la transcripción de citocinas proinflamatorias a través de NF- κ B, facilitando el reclutamiento y adhesión de los leucocitos circulantes a la pared (33, 34).

Estudios en animales y humanos han establecido que la aterosclerosis es impulsada por un proceso inflamatorio crónico dentro de la pared arterial, iniciado principalmente en respuesta a estructuras modificadas endógenamente, particularmente lipoproteínas oxidadas que estimulan respuestas inmunes tanto innatas como adaptativas (8, 23, 26). En esta tesis observamos que los individuos clasificados en el grupo AtS poseían parámetros relacionados con el metabolismo lipídico indicativos de mayor riesgo cardiovascular, como colesterol total, triglicéridos, LDL-colesterol y ApoB100 elevados, y HDL-colesterol y ApoA1 disminuidos, respecto a los individuos BR. La retención de LDL en la capa íntima arterial, es un proceso crucial en el inicio y progresión de la aterosclerosis (92), porque dispara un proceso inflamatorio local que desencadena la expresión de moléculas de adhesión y secreción de quimiocinas por las CE, promoviendo la infiltración de la capa íntima arterial por células inmunes, monocitos, linfocitos T, neutrófilos y CML (9, 25, 28). Las lipoproteínas modificadas son internalizadas por macrófagos, CE y CML, por endocitosis mediada por los receptores LRP-1 y SR (36, 93). Dentro de los SR se destacan CD36 y MSR-1, quienes a su vez están involucrados en la transformación de macrófagos en FC, las cuales por su parte pueden proliferar y secretar citocinas y factores de crecimiento que perpetúan el estado inflamatorio (30). En este estudio de tesis se constató mediante el análisis de expresión de ARNm de CD36 y MSR-1, que los individuos AtS poseen una expresión incrementada en monocitos circulantes, principalmente en monocitos clásicos, lo cual indica que este proceso activador mediado por SR podría estar ocurriendo en circulación y por ende anterior a la diapédesis, migración y transformación de monocitos a macrófagos que ocurre a nivel subendotelial. En el caso específico de CD36, se observó tendencia a incrementos de expresión a nivel de ARNm, así como su expresión en superficie celular de monocitos

circulantes, sin embargo, la diferencia no resultó estadísticamente significativa, lo cual puede deberse al bajo número de individuos estudiados asociado con la gran variabilidad de resultados que presentó CD36, incluido aquellos individuos con bajo riesgo.

La estría grasa, primera evidencia de enfermedad aterosclerótica, se compone de macrófagos cargados de ésteres de colesterol o FC, y en esta etapa temprana de la lesión CCL2 desempeña un papel crítico porque su expresión se encuentra elevada en placas ateroscleróticas ricas en macrófagos (25, 26, 28, 32, 33). Por lo tanto, la sobreexpresión de CCL2 causa más infiltración localizada de monocitos/macrófagos, lo cual exacerba el estado proinflamatorio y la progresión de la enfermedad aterosclerótica (28, 32, 94). En esta tesis se demostró que en el contraste de individuos AtS versus BR, se encuentra mayor expresión de ARNm de CCL2 y su receptor específico CCR2, lo cual indica que las células mononucleares, preferentemente monocitos circulantes, no solo tienen inclinación proinflamatoria con capacidad de reclutar más células al sitio de la lesión, sino además, presentan mayor sensibilización para el reclutamiento mediado por ésta quimiocina.

Los resultados hallados también indican que los mayores aumentos en la expresión de SR y mediadores proinflamatorios (TNF- α e IL-1 β), ocurren en la subpoblación de monocitos clásicos, que polarizan a macrófagos M1 cuando migran al espacio subendotelial, productores de citocinas proinflamatorias, ROS, RNS, expresan mayores niveles de SR y TLR, además participan en la formación de FC, y remodelación de la matriz extracelular, todas actividades claramente inflamatorias y proateroscleróticas, siendo la principal señal de reclutamiento mediada por CCL2 secretada por las CE lesionadas, quien interacciona con su receptor específico (CCR2) para mediar sus efectos (30).

Algunos estudios refieren que pacientes con aterosclerosis presentan leucocitosis, monocitosis o neutrofilia, lo cual podría suponer que el incremento de biomarcadores circulantes, no se debe a cambios en su nivel de expresión, sino a la diferencia en el número o tipo de leucocitos (41, 43, 95). En el presente estudio observamos que los individuos que fueron incluidos dentro del grupo AtS no presentaban diferencias en el número absoluto de leucocitos o cambios en los recuentos diferenciales respecto a los individuos BR. Posiblemente nuestro hallazgo obedece al estadio temprano del proceso aterosclerótico de los individuos estudiados. Por el contrario, en otros estudios se ha demostrado que individuos con Síndrome Coronario Agudo muestran un incrementado número de leucocitos, en especial monocitos, lo cual podría deberse a la extensión y tiempo de evolución de la placa (96, 97).

Los monocitos circulantes son heterogéneos en el sentido que expresan receptores de quimiocinas distintos y tienen diferentes propiedades de migración y diferenciación (98). En

humanos, se ha caracterizado una subpoblación mayoritaria (~81% del total de monocitos) denominada “clásica” (CD14⁺⁺/CD16⁻), otra minoritaria (~8%) designada como “intermedia” (CD14⁺⁺/CD16⁺), y la tercera (~11%) o “no clásica” (CD14⁺/CD16⁺⁺), también minoritaria (53). En las etapas iniciales de la aterosclerosis, los monocitos de sangre periférica son reclutados en la íntima vascular, siendo responsables de los eventos tempranos ateroscleróticos (54). En este estudio observamos que los biomarcadores analizados son expresados casi exclusivamente en la población de monocitos respecto al resto de leucocitos, y por otra parte, de manera diferencial en la subpoblación clásica monocítica. Los monocitos CD14⁺⁺/CD16⁻ demuestran alta eficiencia para estimular la proliferación de células T CD4⁺ y capacidad proangiogénica, expresan altos niveles de CCR2, alta capacidad fagocítica y potencial inflamatorio, siendo los principales productores de ROS en condiciones no estimuladas, y secreción de IL-1 β y TNF- α tras la estimulación con LPS (51, 54). Interesantemente, en esta tesis demostramos que tanto CCR2 como IL-1 β y TNF- α están significativamente incrementados en células mononucleares de individuos AtS.

La variedad de ligandos que unen a LRP-1 posicionan a este receptor como sensor del microambiente extracelular y de ahí surge el especial interés de establecer su nivel de expresión en monocitos circulantes de pacientes con aterosclerosis. Siendo expresado en macrófagos, CML y FC, principales componentes de la aterosclerosis, se ha podido establecer previamente que sus niveles de expresión se modifican en la aterosclerosis tanto en modelos animales como en humanos (99).

En los leucocitos circulantes, la expresión de LRP-1 se confina mayoritariamente a la subpoblación monocítica (100), siendo este hallazgo confirmado en el presente trabajo de tesis, sin embargo, su expresión en relación a la heterogeneidad de subpoblaciones de monocitos, aún quedaba por establecerse. Mediante análisis de ARNm por RT-qPCR en subpoblaciones de monocitos aislados por FACS *sorting*, se determinó que LRP-1 se expresa mayoritariamente en monocitos clásicos e intermedios, con baja expresión en monocitos no clásicos.

LRP-1 tiene funciones muy variadas relacionadas a su capacidad de receptor multiligandos (35). Por múltiples mecanismos, puede regular la señalización celular y, en última instancia, la fisiología celular y la expresión génica, mediante señales originadas por la unión en la superficie celular a numerosas proteínas extracelulares (60). La función molecular de LRP-1 dependería de su expresión a nivel de la superficie celular, donde LRP-1 puede interactuar y regular otras proteínas de membrana tales uPAR, PDGF-R β , y MMP de membrana plasmática (MT-MMP) (60, 101, 102). En algunas células, incluidos los

macrófagos, LRP-1 disminuye la abundancia en la superficie celular del TNF-R1, atenuando la activación de la señalización de la quinasa I κ B, lo cual limita la activación de NF- κ B, disminuyendo la expresión de mediadores inflamatorios (62, 68). Además, como NF- κ B induce la producción de CCL2, las lesiones ateroscleróticas de ratones con monocitos y macrófagos deficientes en LRP-1 muestran niveles incrementados de esta quimiocina y de la densidad de macrófagos en las placas de ateroma. Por lo tanto, es razonable suponer que la capacidad de LRP-1 para suprimir la señalización de NF- κ B puede limitar el reclutamiento de monocitos en placas ateroscleróticas y los efectos adversos de los mediadores generados por macrófagos en la pared arterial (47, 48, 60, 61). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran una disminución en la expresión de LRP-1 en monocitos circulantes relacionada con el mayor riesgo cardiovascular. Dicha disminución afecta principalmente la subpoblación de monocitos clásicos, los cuales pueden polarizar a macrófagos M1 que expresan altos niveles de CCR2, poseen alta capacidad fagocítica y proangiogénica y potencial inflamatorio, los cuales contribuirían a la progresión del proceso (23, 30). Los efectos de estos eventos sobre la expresión de mediadores importantes, como CCL2, pueden ser aditivos. La pérdida de LRP-1 de la superficie celular en monocitos y macrófagos puede incrementar la expresión de CCL2 mediante la activación de la señalización de NF- κ B (60, 62). Por lo tanto, LRP-1 en monocitos/macrófagos, no sólo es capaz de modular la respuesta inmune local, sino que sus niveles de expresión determinarán la progresión de la placa y, en última instancia, regular los eventos de desestabilización, ruptura y trombosis, los cuales configuran la etapa clínica de la aterosclerosis (23, 41, 43, 52).

5.1 Perspectivas

La evaluación del riesgo de ECV, ha sido un elemento clave en los esfuerzos por definir los factores de riesgo, identificar nuevos marcadores, delinear y evaluar posibles objetivos terapéuticos y mejorar la implementación de programas de prevención, tanto primaria como secundaria (5 – 7). Las evaluaciones de riesgo presentan limitaciones provenientes de las variaciones de factores poblacionales, étnicos e individuales y sólo predicen la posibilidad relativa de que un evento cardiovascular (fatal o no fatal) pueda ocurrir en un determinado periodo de tiempo (7), y no indican que el paciente haya iniciado o tenga enfermedad aterosclerótica al momento de su evaluación clínica. Aproximadamente 1/3 de las personas con 0 ó 1 factor de riesgo, desarrollan enfermedades coronarias y hasta el 40% de los individuos con niveles de colesterol por debajo de la media poblacional mueren de

ECV. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis son alentadores y representan el puntapié inicial en la utilización de estos biomarcadores monocíticos desde el punto de vista diagnóstico y predictivo de la enfermedad aterosclerótica, si bien, estudios poblacionales con un número mayor de individuos son necesarios para validar su utilidad clínica y valor predictivo diagnóstico. De esta manera, en un futuro, la incorporación de los biomarcadores aquí analizados, podría mejorar el impacto predictivos de las ecuaciones de riesgo sin representar un gran costo o implementación de tecnología compleja, si bien estudios de valor predictivo diagnóstico son necesarios, cualquier mejora en la sensibilidad diagnóstica redundará en beneficios a pacientes y menores gastos de salud.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes de este trabajo son:

- No se hallaron diferencias significativas en el recuento de leucocitos, porcentaje de monocitos totales y distribución de las subpoblaciones de monocitos en individuos AtS comparados con BR.

- Todos los biomarcadores ensayados (LRP-1, CD36, MSR-1, TNF- α , IL-1 β , CCL2 y CCR2), son expresados mayoritariamente en la población de monocitos circulantes, y respecto a las subpoblaciones de monocitos, los biomarcadores LRP-1, CD36, TNF- α , y CCR2 son expresados predominantemente en la población de monocitos clásicos (CD14⁺⁺/CD16⁻).

- LRP-1 se expresa en el componente monocítico, y dentro de éste, predominantemente en monocitos clásicos (CD14⁺⁺/CD16⁻) y monocitos intermedios (CD14⁺⁺/CD16⁺). LRP-1 media la señalización intracelular celular, fisiología celular y expresión génica, en respuesta a numerosas proteínas extracelulares. Además, LRP-1 puede regular la expresión en la membrana plasmática de otros receptores, regulando su actividad y en última instancia la señalización intracelular.

- El análisis de los biomarcadores en monocitos de ambos grupos de individuos (AtS y BR) muestra una significativa disminución de LRP-1 asociado a incrementos de CD36 y MSR-1 en el grupo AtS respecto al grupo BR.

- En subpoblaciones de monocitos se observó que la disminución de LRP-1 y aumento de CD36 (aunque no significativo en este último caso), ocurren en la población mayoritaria de monocitos clásicos de individuos AtS.

- Se demuestra un estado de activación proinflamatorio en monocitos circulantes de individuos AtS, con aumento de expresión del ARNm de IL-1 β y TNF- α , asociado con un incremento de la quimiocina CCL2 y su receptor CCR2.

- La incorporación de nuevos biomarcadores que identifiquen de manera subclínica la aparición de lesiones ateroscleróticas (disminución de LRP-1 combinado con aumentos de CD36, TNF- α e IL-1 β , CCL2 y CCR2 en monocitos circulantes), mejoraría la predicción de ocurrencia de eventos ateroscleróticos y enfermedad cardiovascular, lo cual justifica el seguimiento regular y examen más exhaustivo de este grupo de individuos mediante pruebas de diagnóstico por imágenes.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. The Global Burden of Disease: 2004 [Internet]. Health statistics and information systems. 2008. Available from: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/
2. World Health Organization. Fact sheet [Internet]. Cardiovascular Diseases. 2016. Available from: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html
3. Republica Argentina, Ministerio de Salud. Estadísticas Vitales 2014. [Internet]. Available from: www.deis.msal.gov.ar
4. Targets S, Targets D. Cardiovascular disease and risk management. *Diabetes Care*. 2016;39(1):S60–71.
5. Wang TJ. Assessing the role of circulating, genetic, and imaging biomarkers in cardiovascular risk prediction. *Circulation*. 2011;123(5):551–65.
6. Lloyd-Jones DM. Cardiovascular risk prediction: Basic concepts, current status, and future directions. *Circulation*. 2010;121(15):1768–77.
7. Grau M, Marrugat J. Risk functions and the primary prevention of cardiovascular disease. *Rev Esp Cardiol*. 2008;61(4):404–16.
8. Roos R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *NEJM*. 1999;340(2):115–26.
9. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011;17(11):1410–22.
10. Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith SJ, Fuster V. AHA/ACC scientific statement: Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34(4):1348–59.
11. Pencina MJ, Agostino RBD, Larson MG, Massaro JM, Vasan RS. Predicting the 30-Year Risk of Cardiovascular Disease The Framingham Heart Study. *Circulation*. 2009;119:3078–84.
12. Masson W, Siniawski D, Krauss J, Cagide A. Aplicabilidad clínica de la función de Framingham a 30 años. Utilidad en la estratificación del riesgo cardiovascular y en el diagnóstico de placa aterosclerótica carotídea. *Rev Esp Cardiol*. 2011;64(4):305–11.
13. Stefano R, Massimiliano C, Marina C, Rossella M, Chiara P, Alessio L, et al. A score including ADAM17 substrates correlates to recurring cardiovascular event in subjects with atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2015;239(2):459–64.
14. Gopal DM, Larson MG, Januzzi JL, Cheng S, Ghorbani A, Wollert KC, et al. Biomarkers of cardiovascular stress and subclinical atherosclerosis in the community.

- Clin Chem. 2014;60(11):1402–8.
15. Yeboah J, McClelland RL, Polonsky TS, Burke GL, Sibley CT, Leary DO, et al. Comparison of Novel Risk Markers for Improvement in Cardiovascular Risk Assessment in Intermediate-Risk Individuals. *JAMA*. 2017;308:788–95.
 16. Aziz M. Pathogenesis of Atherosclerosis A Review Pathophysiology. *Med Clin Rev*. 2016;2(3):1–6.
 17. Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathophysiology of Atherosclerosis Plaque Progression. *Heart Lung Circ*. 2013;22(6):399–411.
 18. Li X, Liu M, Sun R, Zeng Y, Chen S, Zhang P. Atherosclerotic coronary artery disease: The accuracy of measures to diagnose preclinical atherosclerosis. *Exp Ther Med*. 2016;12(5):2899–902.
 19. Poredoš P, Kaja Ježovnik M. Markers of preclinical atherosclerosis and their clinical relevance. *Open Atheroscler Trombos J*. 2015;44(4):247–56.
 20. Aaron R. Folsom, MD; Richard A. Kronmal, PhD; Robert C. Detrano, MD, PhD; Daniel H. O’Leary, MD; Diane E. Bild, MD; David A. Bluemke, MD, PhD; Matthew J. Budoff, MD; Kiang Liu, PhD; Steven Shea, MD; Moyses Szklo, MD, DrPH; Russell P. Tracy, PhD; Karol E. M. Coronary Artery Calcification Compared With Carotid Intima-Media Thickness in the Prediction of Cardiovascular Disease Incidence. *Arch Intern Med*. 2012;168(12):1333–9.
 21. Azevedo CF, Rochitte CE, Lima JAC. Coronary artery calcium score and coronary computed tomographic angiography for cardiovascular risk stratification. *Arq Bras Cardiol*. 2012;98(6):559–68.
 22. Tarkin JM, Dweck MR, Evans NR, Takx RAP, Brown AJ, Tawakol A, et al. Imaging Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):750–69.
 23. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:165–97.
 24. Schultz M. Rudolf Virchow. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(9):1479–81.
 25. Libby P. History of Discovery : Inflammation in Atherosclerosis. *Arter Thromb Vasc Biol*. 2012;32(9):2045–51.
 26. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(23):2129–38.
 27. Getz G, Reardon C. ApoE knockout and knockin mice: The history of their contribution to the understanding of atherogenesis. *J Lipid Res*. 2015;56(7):1542(773):33–6.

28. Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteínas, plaquetas y aterotrombosis. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62(10):1161–78.
29. Chhabra N. Endothelial dysfunction – A predictor of atherosclerosis. *Internet J Med Updat.* 2009;4(1):33–41.
30. Shalhoub J, Falck-Hansen MA, Davies AH, Monaco C. Innate immunity and monocyte-macrophage activation in atherosclerosis. *J Inflamm.* 2011;8(1):9.
31. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci.* 2013;9(10):1057–69.
32. Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res.* 2004;95(9):858–66.
33. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):762–74.
34. Liao JK. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *J Clin Invest.* 2013;123(2):540–1.
35. Herz J, Strickland DK. LRP: A multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest.* 2001;108(6):779–84.
36. Moore KJ, Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: Beyond lipid uptake. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2006;26(8):1702–11.
37. Østerud B, Bjørklid E. Role of Monocytes in Atherogenesis. *Physiol Rev.* 2003;83(4):1069–112.
38. Fredman G, Spite M. Recent advances in the role of immunity in atherosclerosis. *Circ Res.* 2013;113(12):111–5.
39. Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2011;31(5):969–79.
40. Arredouani MS. Is the scavenger receptor MARCO a new immune checkpoint? *Oncoimmunology.* 2014;3(10):e955709.
41. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(10):709–21.
42. Muratoglu SC, Belgrave S, Lillis AP, Migliorini M, Robinson S, Smith E, et al. Macrophage LRP1 suppresses neo-intima formation during vascular remodeling by modulating the TGF- β signaling pathway. *PLoS One.* 2011;6(12):e28846.
43. Woollard KJ. Immunological aspects of atherosclerosis. *Clin Sci.* 2013;125(5):221–35.
44. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest.*

- 2001;108(6):785–91.
45. Mehta JL, Chen J, Hermonat PL, Romeo F, Novelli G. Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): A critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc Res.* 2006;69(1):36–45.
 46. Valacchi G, Sticozzi C, Lim Y, Pecorelli A. Scavenger receptor class B type I: a multifunctional receptor. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1229:1–7.
 47. Wolf D, Stachon P, Bode C, Zirlik A. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Hamostaseologie.* 2014;34(1):63–71.
 48. Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF- κ B signaling. *Annu Rev Biophys.* 2013;42(3):443–68.
 49. Gui T, Shimokado A, Sun Y, Akasaka T, Muragaki Y. Diverse roles of macrophages in atherosclerosis: From inflammatory biology to biomarker discovery. *Mediators Inflamm.* 2012;2012(693083):1–14.
 50. Badimón L, Martínez-González J. Disfunción endotelial. *Rev Esp Cardiol.* 2006;6:21–30.
 51. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang X, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation : circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res.* 2014;2:1–9.
 52. Camejo G, Hurt-Camejo E. Macrophages, extracellular matrix, and lipoproteins in arterial cholesterol balance. *J Lipid Res.* 2014;55(1):1–3.
 53. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010;116(16):e74–80.
 54. Zawadaa A, Rogaceva K, Schirmerb S, Sester M, Böhm M, Flisera D HG. Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease. *Immunobiology.* 2012;217(12):1273–84.
 55. Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, Ruiz-Rosado JDD, Popovich PG, Partida-Sanchez S, et al. Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages. *PLoS One.* 2015;10(12):5–11.
 56. Roszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2015;2015(816460):16–8.
 57. Soehnlein O. Multiple roles for neutrophils in atherosclerosis. *Circ Res.* 2012;110(6):875–88.
 58. Döring Y, Drechsler M, Wantha S, Kemmerich K, Lievens D, Vijayan S, et al. Lack of neutrophil-derived CRAMP reduces atherosclerosis in mice. *Circ Res.*

- 2012;110(8):1052–6.
59. Barbero JG, Nicolás JC. Complejos inmunes IgM-ApoB100 modificadas. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam.* 2017;51(1):75–81.
 60. Gonias SL, Campana WM. LDL receptor-related protein-1: A regulator of inflammation in atherosclerosis, cancer, and injury to the nervous system. *Am J Pathol.* 2014;184(1):18–27.
 61. May P, Bock HH, Nofer JR. Low density receptor-related protein 1 (LRP1) promotes anti-inflammatory phenotype in murine macrophages. *Cell Tissue Res.* 2013;354(3):887–9.
 62. Mantuano E, Brifault C, Lam MS, Azmoon P, Gilder AS. LDL receptor-related protein-1 regulates NF κ B and microRNA-155 in macrophages to control the inflammatory response. *PNAS.* 2016;113(5):1369–74.
 63. Ferrer DG, Jaldín-Fincati JR, Amigone JL, Capra RH, Collino CJ, Albertini RA, et al. Standardized flow cytometry assay for identification of human monocytic heterogeneity and LRP1 expression in monocyte subpopulations: Decreased expression of this receptor in nonclassical monocytes. *Cytom Part A.* 2014;85(7):601–10.
 64. Yancey PG, Ding Y, Fan D, Blakemore JL, Zhang Y, Ding L, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 prevents early atherosclerosis by limiting lesional apoptosis and inflammatory Ly-6C high monocytosis: Evidence that the effects are not apolipoprotein e dependent. *Circulation.* 2011;124(4):454–64.
 65. Boucher P, Gotthardt M, Li W-P, Anderson R, Herz J. LRP: Role in Vascular Wall Integrity and Protection from Atherosclerosis. *Science.* 2003;300(5617):329–32.
 66. Gorovoy M, Gaultier A, Campana WM, Firestein GS, Gonias SL. Inflammatory mediators promote production of shed LRP1/CD91, which regulates cell signaling and cytokine expression by macrophages. *J Leukoc Biol.* 2010;88(4):769–78.
 67. Ceschin DG, Sánchez MC, Chiabrando GA. Insulin induces the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) degradation by the proteasomal system in J774 macrophage-derived cells. *J Cell Biochem.* 2009;106(3):372–80.
 68. Zhu L, Giunzioni I, Tavori H, Covarrubias R, Ding L, Zhang Y, et al. Loss of Macrophage Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Confers Resistance to the Antiatherogenic Effects of Tumor Necrosis Factor-alpha Inhibition. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2016;36(8):1483–95.
 69. Packard RRS, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: From vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem.* 2008;54(1):24–38.

70. Strickland DK, Au DT, Cunfer P, Muratoglu SC. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: Role in the regulation of vascular integrity. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2014;34(3):487–98.
71. Llorente-Cortés V, Royo T, Otero-Viñas M, Berrozpe M, Badimon L. Sterol regulatory element binding proteins downregulate LDL receptor-related protein (LRP1) expression and LRP1-mediated aggregated LDL uptake by human macrophages. *Cardiovasc Res.* 2007;74(3):526–36.
72. Lillis AP, Muratoglu SC, Au DT, Migliorini M, Lee MJ, Fried SK, et al. LDL receptor-related protein-1 (LRP1) regulates cholesterol accumulation in macrophages. *PLoS One.* 2015;10(6):1–20.
73. Framingham Heart Study [Internet]. Cardiovascular Disease (30-year risk). 2017. Available from: <https://www.framinghamheartstudy.org/risk-functions/cardiovascular-disease/30-year-risk.php#>
74. ARIC Stroke Risk Calculator [Internet]. 2017. Available from: http://www.csc.unc.edu/aricnews/strokecalc/html/s_RC1.html
75. Immunoblot affinity purification. *Nat Meth.* 2005;2(10):797–8.
76. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1–2):248–54.
77. National Center for Biotechnology Information Search database [Internet]. 2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
78. Lee JTY, Tsang WH, Chow KL. Simple Modifications to Standard TRIzol® Protocol Allow High-Yield RNA Extraction from Cells on Resorbable Materials. *J Biomater Nanobiotechnol.* 2011;2(1):41–8.
79. Masek T, Vopalensky V, Suchomelova P, Pospisek M. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Anal Biochem.* 2005;336(1):46–50.
80. Ståhlberg A, Bengtsson M. Single-cell gene expression profiling using reverse transcription quantitative real-time PCR. *Methods.* 2010;50(4):282–8.
81. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn I, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3(711):34–1.
82. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods.* 2001;25:402–8.
83. Van Winkle D, Beheshti A, Rill R. DNA electrophoresis in agarose gels: A simple

- relation describing the length dependence of mobility. *Electrophoresis*. 2002;23(1):15–9.
84. Minamino T, Komuro I. Vascular cell senescence: Contribution to atherosclerosis. *Circ Res*. 2007;100(1):15–26.
 85. Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager MA, Deanfield J, Ganz P, et al. The assessment of endothelial function: From research into clinical practice. *Circulation*. 2012;126(6):753–67.
 86. Bourlon Cuéllar RA, López Nuche M. Aterosclerosis y lesión endotelial: ¿proceso irreversible? *Med Interna Mex*. 2010;26(6):590–6.
 87. Gimbrone MA, García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620–36.
 88. Kumita S, Kobayashi Y, Kiriyama T, Tomiyama T, Hayash H, Ishihara K. Molecular imaging in atherosclerosis. *Japanese J Clin Radiol*. 2013;58(7):955–62.
 89. Badimon L, Storey RF, Vilahur G. Update on lipids, inflammation and atherothrombosis. *Thromb Haemost*. 2011;105(SUPPL. 1):34–42.
 90. Silverstein RL, Li W, Park YM, Rahaman SO. Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2010;121:206–20.
 91. Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: A comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res*. 2008;79(3):360–76.
 92. Tomkin G.H., and Owens D. LDL as a cause of atherosclerosis. *Atheroscler Thromb J*. 2012;5(1):13–21.
 93. Cai L, Wang Z, Ji A, Meyer JM, van der Westhuyzen DR. Scavenger receptor CD36 expression contributes to adipose tissue inflammation and cell death in diet-induced obesity. *PLoS One*. 2012;7(5):1–11.
 94. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest*. 2007;117(4):902–9.
 95. Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Mol Cell Biol*. 2010;7(2):1–19.
 96. Furman MI, Gore JM, Anderson FA, Budaj A, Goodman SG, Avezum Á, et al. Elevated leukocyte count and adverse hospital events in patients with acute coronary syndromes: Findings from the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). *Am Heart J*. 2004;147(1):42–8.

97. Coller BS. Leukocytosis and ischemic vascular disease morbidity and mortality: Is it time to intervene? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(4):658–70.
98. Randolph GJ. The fate of monocytes in atherosclerosis. *J Thromb Haemost.* 2009;7(SUPPL. 1):28–30.
99. Lillis A, Duyn L Van. LRP tissue-specific knockout studies. *Physiological.* 2008;887–918.
100. Mosig S, Rennert K, Krause S, Kzhyshkowska J, Neunübel K, Heller R, et al. Different functions of monocyte subsets in familial hypercholesterolemia: potential function of CD14⁺ CD16⁺ monocytes in detoxification of oxidized LDL. *FASEB J.* 2009;23(3):866–74.
101. Gonias SL, Wu L, Salicioni AM. Low density lipoprotein receptor-related protein: Regulation of the plasma membrane proteome. *Thromb Haemost.* 2004;91(6):1056–64.
102. Barcelona PF, Jaldín-Fincati JR, Sánchez MC, Chiabrando GA. Activated α 2-macroglobulin induces Muller glial cell migration by regulating MT1-MMP activity through LRP1. *FASEB J.* 2013;27(8):3181–97.