



ATEROSCLEROSI I CITOCINES: INFLUÈNCIA DE CCL2 I ELS SEUS RECEPTORS

Montserrat Fibla Simó

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ATEROSCLEROSI I CITOCINES: INFLUÈNCIA DE CCL2 I ELS SEUS RECEPTORS

Montserrat Fibla Simó

Montserrat Fibla Simó

ATEROSCLEROSI I CITOCINES: INFLUÈNCIA DE CCL2 I ELS SEUS RECEPTORS

TESI DOCTORAL

dirigida pel

Dr. Joan José Sirvent Calvera

Dr. Jorge Joven Maried

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques



**UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI**

Tarragona

2016



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

C/Sant Jaume Llorenç, 21

43203 – Reus (Tarragona)

Telèfon: 977759305

Fax: 977759322

FEM CONSTAR que aquest treball, titulat “**ATEROSCLEROSI I CITOCINES: INFLUÈNCIA DE CCL2 I ELS SEUS RECEPTORS**” que presenta **Montserrat Fibla Simó**, ha estat realitzat sota la nostra direcció i que el doctorand a compleix els requeriments per poder optar al títol de Doctor.

Reus, 14 de Juny de 2016

Dr. Juan José Sirvent Calvera

Director de la tesi

Dr. Jorge Joven Maried

Codirector de la tesi

*Si escoltes al silenci, sentiràs explicar al vent que
el camí et conduirà pel gel que crema mentre la
lluna plena es reflexa a l'aigua que s'ofega, els
pensaments sempre han de cuidar els somnis,
perquè aquesta és la clau per a molts altres somnis,
la teva realitat.*

Als meus pares.

AGRAÏMENTS

Aquest ha estat un gran assoliment en la meua carrera professional.

El meu sincer agraïment a:

Al Dr. Juan José Sirvent Calvera com a director de la tesis, la seva adequada i constant metodologia durant tota la meua formació, com en tots els projectes amb els quals m'ha ajudat a portar a terme, compartint els seus coneixements, experiències, temps i idees per a millorar aquest treball d'investigació.

Al Dr. Jorge Joven Maried com a codirector de la tesis, que m'ha orientat, recolzat i corregit el meu treball científic amb un interès i entrega que han superat totes les expectatives. Gràcies per donar-me aquesta oportunitat. Ha estat un gran plaer retrobar-nos professionalment.

A l'Anna Hernández per la seva passió, professionalitat i companyerisme, perquè sense ella aquest projecte no hagués estat possible.

És a moltes persones, amics, companyes... a les que he de reconèixer la seva contribució i agraïr les diferents aportacions i recolzament tant necessari en determinats moments d'aquet llarg projecte.

Al Joan.

I a la meua família, perquè són el pilar de la meua vida.

Gràcies.

RESUM

La quimiocina (motif C-C) ligand 2 (CCL2) és una molècula quimioatraient que condueixen monòcits als llocs inflamatoris, sent una molècula clau en la iniciació dels processos inflamatoris. La funció de CCL2 en la regulació del flux de les cèl·lules es produeix a través de la seva unió a receptors funcionals (CCR2), però CCL2 també s'uneix als receptors de quimiocines atípics o silenciosos (ACKRs), amb capacitat d'eliminar o segrestar aquestes quimiocines. El paper de CCL2 en la malaltia arterial perifèrica és poc clar. Es va mesurar la concentració de CCL2 circulant en pacients amb isquèmia crònica a les extremitats inferiors. Es va observar que les artèries d'aquests pacients tenen una major expressió de CCL2 i dels receptors de quimiocines atípics comparades amb artèries normals no afectes per aterosclerosi. A més, es va analitzar l'associació del polimorfisme Asp42Gly (rs12075) del receptor atípic DARC (ACKR1) amb la concentració de CCL2 circulant en aquests pacients. Les nostres troballes van indicar que la concentració de CCL2 circulant s'associa significativament amb la gravetat i la presència de la malaltia (OR 0.966, IC del 95% des de 0.944 - 0.988, P = 0.003). La concentració de CCL2 circulant era dependent del genotip rs12075 (AA>AG>GG), això probablement indicaria una major expressió de receptors de quimiocines en les artèries dels subjectes AA. Les associacions amb variants genètiques i la sobrepressió dels receptors atípics de quimiocines en artèries malaltes pot tenir implicacions potencials, i les nostres dades indiquen que CCL2 pot representar un factor no reconegut prèviament que necessita ser considerat en la selecció de pacients amb factors de risc de malaltia arterial perifèrica. Quant al paper de CCL2 en la malaltia arterial coronària, el nostre objectiu era investigar on i en quina mesura s'expressa CCL2 i els seus receptors en artèries afectades que han causat la mort del pacient. Es va valorar l'expressió immunohistoquímica de macròfags, CCL2 i els receptors associats que van ser significativament majors en les artèries malaltes. Els increments més significatius van ser els de CCL2 i ACKR1. Malgrat algunes similituds en la distribució dels receptors associats, no hi va haver correlacions amb l'expressió de CCL2, que va ser l'única variable amb exactitud predictiva d'aterosclerosi. L'expressió de CCL2 era marginal en les

artèries normals i majoritàriament restringida a les cèl·lules musculars llises. L'associació entre la disponibilitat de CCL2 i la resposta cel·lular és complexa i per entendre completament aquesta relació hauríem d'explorar l'activitat i especificitat dels receptors associats i el paper confluent d'altres quimiocines. Les nostres troballes indiquen que CCL2 és un marcador potencialment útil en el diagnòstic de l'aterosclerosi i proporcionen dades que indiquen que els receptors convencionals i atípics per aquestes quimiocines estan sobrepassats en les artèries ateroscleròtiques.

ABREVIATURES

ACD: artèria coronària dreta

AGE: glicosilació avançada

AMP: adenocin monofosfat

ANG: angiotensina

ARA II: antagonistes dels receptors d'angiotensina II

CFE: circumflexa esquerra

cHDL: colesterol unit a lipoproteïnes d'alta densitat (HDL)

CI: cardiopatia isquèmica

cLDL: colesterol unit a lipoproteïnes de baixa densitat (LDL)

c-MGF: factor de creixement de colònies de macròfags

CMH: complex major d'histocompatibilitat

CML: cèl.lules del múscul llis

CMV: citomegalovirus

COX2: ciclooxygenasa 2

cVLDL: colesterol unit a lipoproteïnes de molt baixa densitat

DAE: descendent anterior esquerra

DM: diabetes mellitus

ECA: enzima convertidora de l'angiotensina

FAP: factor activador de plaquetes

FRCV: factors de risc cardiovasculars

FT: factor tissular

G-MSF: factor estimulador de granulocits-macròfags

ICAM: molècula d'adhesió intercel.lular

HTA: hipertensió arterial

HSV: herpes virus

IAM: infart agut de miocardi
IL: interleucina
ILGF: factor de creixement insulin-like
lysoPC: lisofosfatidilcolina
IM: infart de miocardi
IMC: índex de massa corporal
iNOS: òxid nítric sintasa induïble de l'òxid nítric
LDLox: lipoproteïna de baixa densitat oxidada
Lp(a): lipoproteïna a
LTB: formació de leucotriens
MAC: malaltia arterial coronària
MAP: malaltia arterial perifèrica
MC: malaltia coronària
MCP: quimioatració de monocits
MCV: malaltia cardiovascular
MEC: matriu extracel·lular
MMP: metaloproteinasa de matriu
MMPs: metal·loproteïnasses
MPs: microparticules
NK: natural killer
OxPL: fosfolípids oxidats
PAI: activador del plasminogen
PAMPs: patrons moleculars associats a patògens
PARS: receptors activats de proteases
PCR: proteïna C reactiva
RCV: risc cardiovascular
ROS: radicals lliures

SOCS: supressors de la senyalització de citocines

SR: scavenger receptors

TAD: tensió arterial diastòlica

TAS: tensió arterial sistòlica

TG: triglicèrids

TGF : factor de creixement transformant beta

THS: terapia hormonal substitutiva

TLRs: toll-like receptors

TNF : factor de necrosi tumoral alfa

TP: tensió del polç

VCAM: molècula d'adhesió vascular

PUBLICACIONS INTERNACIONALS QUE COMPONEN LA TESI DOCTORAL

Estudi 1

Understanding the role of circulating chemokine (C-C motif) ligand 2 in patients with chronic ischemia threatening the lower extremities.

Anna Rull, PhD1, Anna Hernandez-Aguilera, MSc1, 2, Montserrat Fibla, MSc3, Julio Sepulveda, MD2, Esther Rodríguez-Gallego, MSc1, Marta Riera-Borrull, MSc1, Juan J. Sirvent, MD, PhD3, Vicente Martín-Paredero, MD, PhD2, Javier A. Menendez, PhD4, Jordi Camps, PhD1,* , Jorge Joven, MD, PhD1,*

Vascular Medicine (2014)

Factor d'impacte: 1.785

Ranking: 45/60 (Q4)

Estudi 2

Connecting chemokine (C-C motif) ligand 2 to coronary artery disease

Anna Hernández-Aguilera¹ , Montserrat Fibla² , Noemí Cabré¹, Fedra Luciano-Mateo¹, Jordi Camps¹, Salvador Fernández-Arroyo¹, Vicente Martín-Paredero³, Javier A. Menendez⁴, Juan J. Sirvent², Jorge Joven^{1*}.

Revista: European Journal of Clinical Investigation

ÍNDEX

RESUM.....	13
ABREVIATURES.....	15
PUBLICACIONS INTERNACIONALS QUE COMPONEN LA TESI DOCTORAL ..	19
ÍNDEX.....	21
INTRODUCCIÓ	25
1. SISTEMA CIRCULATORI	27
1.1. SISTEMA CARDIOVASCULAR	27
1.1.1. Cor	27
1.1.1.1. Circulació pulmonar.....	28
1.1.1.2. Circulació sistèmica.....	28
1.1.1.3. Circulació coronària.....	29
1.1.2. Vasos sanguinis	30
2. MALALTIA ARTERIAL PERIFÈRICA.....	32
3. MALALTIA CARDIOVASCULAR CORONÀRIA.....	34
4. FACTORS DE RISC CARDIOVASCULARS.....	36
4.1.1. Factors de risc personals no modificables	39
4.1.1.1. Edat	39
4.1.1.2. Sexe	39
4.1.1.3. Raça	39
4.1.1.4. Antecedents familiars i marcadors genètics.....	39
4.1.2. Factors de risc modificables.....	40
4.1.2.1. Dislipèmies	40
4.1.2.2. Colesterol i Lipoproteïnes.....	40
4.1.2.3. Triglicèrids	43
4.1.2.4. Tensió arterial.....	44
4.1.2.5. Diabetis mellitus	45
4.1.2.6. Alcohol.....	46
4.1.2.7. Tabaquisme	47
4.1.2.8. Obesitat	47
4.1.2.9. Sedentarisme	48
4.1.3. Altres factors.....	49

4.1.3.1. Factors de la coagulació	49
4.1.3.2. Homocisteïna.....	49
4.1.3.3. Microalbuminúria	51
4.1.3.4. Àcid úric.....	51
4.1.3.5. Marcadors sèrics de la inflamació	52
5. ARTERIOSCLEROSI	53
6. ATEROSCLEROSI	53
7. PATOGÈNIA DE L'ATEROESCLEROSI.....	55
7.1. EVOLUCIÓ ANATOMOPATOLÒGICA DE LA LESIÓ ATEROESCLERÒTICA.....	58
7.1.1. Lesions inicials, estria grassa i lesions intermèdies.....	59
7.1.2. Lesions avançades.....	60
7.1.3. Resposta i complicació.....	61
8. RELACIÓ ENTRE L'ATEROESCLEROSI I LA INFLAMACIÓ	63
8.1. MECANISMES INFLAMATORIS DE L'ATEROESCLEROSI.....	64
8.1.1. Disfunció de l'endoteli vascular	64
8.1.2. Adhesió molecular i migració dels elements cel·lulars.....	65
8.1.3. Monòcits, macròfags, cèl·lules musculars llises i immunitat.....	66
8.1.4. Plaquetes.....	68
8.1.5. Fisura de la placa arterioscleròtica.....	69
8.1.6. Inflamació i trombosi.....	71
8.2. MOLECULES INFLAMATÒRIES COM A MARCADORS DE LA INFLAMACIÓ.....	73
9. LES CITOCINES	74
9.1. CITOCINES ASSOCIADES A LES VIES DE SENYALITZACIÓ EN L'ATEROSCLEROSI	79
9.1.1. Factor nuclear kB (NF- B).....	79
9.1.2. Citocines JAK i STAT	82
9.2. L'EXPRESSIÓ DE LES CITOCINES EN LES PLAQUES ATEROSCLERÒTIQUES.....	83
9.3. FONTS CEL·LULARS DE LES CITOCINES	83
9.3.1. Cèl·lules vasculares	83
9.3.2. Leucòcits	84

9.3.3. Plaquetes.....	85
9.3.4. Mastòcits	85
9.4. EFECTES BIOLÒGICS DE LES CITOCINES	86
9.4.1. Efectes sobre la permeabilitat endotelial	86
9.4.2. Activació de molècules d'adhesió i l'expressió de quimiocines	86
9.4.3. Modulació de l'expressió del receptor scavenger(RS) i el metabolisme dels lípids	86
9.4.4. Efecte de la migració de les cèl·lules del múscul llis (SMC) i la proliferació	87
9.4.5. Modulació de la remodelació de la matriu extracel·lular	87
9.4.7. Regulació de la formació de neovasos. Promoció de la neovascularització intraplaca	88
9.4.8. Inducció de l'apoptosi	89
9.4.9. Regulació de la resposta immune	89
9.5. LES CITOCINES I ELS RISCS CARDIOVASCULARS	91
10. LES QUIMIOCINES.....	91
10.1. EL PAPER PATOGENIC DE LES QUIMIOCINES EN L'ATEROSCLEROSI	95
10.2. Quimiocina CCL2 (<i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>)	97
10.3. CCR2 (<i>chemokine (C-C motif) receptor 2</i>): Receptor Funcional de CCL2.....	99
10.3.1. Receptors silenciosos de quimiocines (ACKR).....	100
10.3.2. Receptor DARC (<i>Duffy antigen receptor for chemokines</i>).....	101
10.3.3. Receptor D6 (<i>ccbp2 (Chemokine binding protein 2)</i>).....	102
HIPÒTESI I OBJECTIUS DE TREBALL	105
TREBALLS REALITZATS, MÈTODES I RESULTATS	109
Estudi 1.....	113
Estudi 2.....	141
DISCUSSIÓ	165
CONCLUSIONS	177
BIBLIOGRAFIA.....	181
MATERIAL SUPLEMENTARI	221
Material suplementari de l'estudi 1	223

Material suplementari de l'estudi 2.....	228
ANNEX 1	233
PUBLICACIONS.....	235
ARTICLES	237

INTRODUCCIÓ

1. SISTEMA CIRCULATORI

El sistema circulatori és el conjunt d'òrgans i teixits format pel sistema cardiovascular encarregat de la distribució de la sang i pel sistema limfàtic encarregat de fer circular la limfa per l'interior de l'organisme¹⁻³. S'encarrega de transportar els nutrients i l'oxigen a totes les cèl·lules del cos i rebre substàncies nocives d'origen metabòlic i transportar-les als òrgans d'excreció, és la via per on circulen les hormones i també participa en importants funcions de defensa immunitària i homeostàtica⁴.

1.1. SISTEMA CARDIOVASCULAR

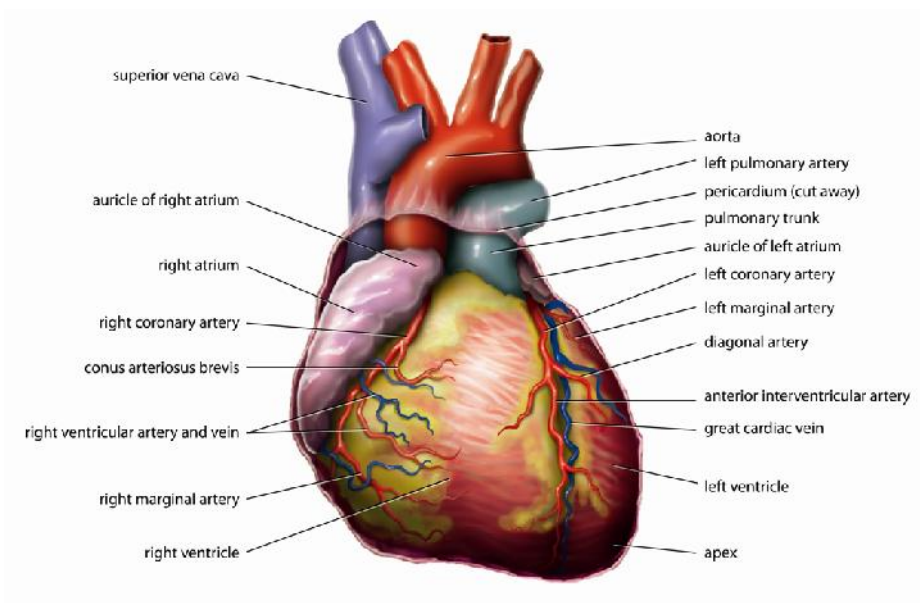
L'aparell cardiovascular és un sistema tubular tancat i està format pel cor i pels *vasos sanguinis*, les parets d'aquests vasos tenen un gruix i una estructura variable depenent de les seves funcions i de la pressió de la sang que hi circula¹.

1.1.1. Cor

El cor és la bomba del sistema cardiovascular que s'encarrega de propulsar la sang des del ventricle dret cap als pulmons a través dels vasos de la circulació pulmonar i des del ventricle esquerre cap tots els òrgans i teixits del cos a través dels vasos de la circulació sistèmica⁵ (Figura 1). La sang oxigenada retorna per les venes pulmonars des del pulmó fins a l'aurícula esquerra i per les venes caves, desde tot l'organisme fins l'aurícula dreta. El cor, com qualsevol múscul, necessita que la sang li aportí els nutrients i l'oxigen necessari per a funcionar, d'això s'encarrega el sistema circulatori coronari.

Estructuralment, la paret del cor està formada per tres capes:

-) l'endocardi és la capa que entapissa la cavitat cardíaca i és la continuació de la capa íntima dels vasos sanguinis que entren al cor i en surten.
-) el miocardi és la capa mitja i més gruixuda de la paret del cor.
-) l'epicardi és la capa més externa de la paret cardíaca i es correspon a la capa visceral del pericardi.



1.1.2. Vasos sanguinis

La sang circula sempre per l'interior dels vasos sanguinis: artèries, venes i capil·lars. Les artèries es ramifiquen en arterioles i aquestes, en capil·lars, després aquests s'uneixen i formen vènules i al seu torn s'uneixen per formar les venes.

- J) Les artèries són els vasos sanguinis pels quals circula la sang que surt del cor i es distribueix per tot el cos, són vasos molt elàstics i el seu diàmetre pot augmentar i disminuir gràcies a una gruixuda capa de fibres musculars de la seva paret, la qual pot suportar pressions de 11 a 14 cm Hg durant la sístole ventricular i de 6 a 9 durant la diàstole ventricular.
- J) Els capil·lars són els vasos sanguinis situats entre les artèries i les venes, i el seu diàmetre és tan petit que la sang circula molt lentament a través d'ells i els glòbuls vermells s'han de deformar per poder-hi passar. Això, més el fet que la paret del capil·lar està constituïda per una sola capa de cèl·lules epitelials (cèl·lules d'estirp mesenquimal que formen l'endoteli), facilita l'intercanvi de substàncies (aigua, nutrients, oxigen, diòxid de carboni, urea, etc.) amb els teixits i permet la sortida de glòbuls blancs.
- J) Les venes són els vasos sanguinis pels quals circula la sang que es dirigeix des dels capil·lars cap al cor, són molt menys elàstiques que les artèries i en el seu interior la pressió és molt baixa. Al seu interior hi ha les vàlvules semilunars per evitar el retrocés de la sang i la seva paret presenta també tres capes com les artèries, però amb la túnica mitjana és molt més fina i amb menys fibres elàstiques.

Les parets dels vasos de les artèries i de les venes tenen una estructura similar, encara que amb diferències que permeten classificar els diversos tipus de vasos, aquestes es deuen fonamentalment a la diferent pressió a la qual circula la sang per l'interior dels vasos: les parets de les artèries properes al cor són més gruixudes que les de les artèries més allunyades del cor, en general, les artèries tenen parets més gruixudes que les de les venes corresponents i el seu diàmetre és menor.

Malgrat aquestes diferències, la paret de les artèries i les venes tenen una sèrie de característiques comunes, en canvi, les parets dels capil·lars i de les vènules són molt menys complexes⁶.

L'estructura dels vasos (Figura 3) està constituïda per tres capes concèntriques:

Túnica íntima, la capa més interna de la paret vascular i és la que està en contacte amb el flux sanguini i els seus components. Es compon d'una sola capa de cèl·lules d'estirp mesenquimal, les cèl·lules endotelials, que formen l'endoteli, i es disposen sobre una membrana basal i una capa molt fina de teixit connectiu lax formant la capa subendotelial, amb alguna fibra muscular llisa. Aquesta estructura permet el desenvolupament d'importants funcions antiinflamatòries i contribueix al procés homeostàtic de la vasodilatació i vasoconstricció^{7,8}.

Alguns vasos presenten la làmina elàstica interna, que estableix un límit entre la túnica íntima i la túnica mitja.

Túnica mitja, més prominent en les artèries, es compon principalment de les cèl·lules del múscul llis i teixit elàstic, hi ha una capa de teixit elàstic en ambdós costats de la paret muscular: la làmina elàstica interna i la làmina elàstica externa, aquesta la separa de la túnica adventícia. El component elàstic és més prominent en les artèries elàstiques, en canvi, la part vascular del múscul llis predomina en artèries musculars i arterioles^{7,8}.

Túnica adventícia, és la capa més prominent en les venes^{7,8} i la més externa en la paret dels vasos, es compon de teixit connectiu format per fibres de col·làgena longitudinals, abundants fibres elàstiques i fibroblasts. Aquesta capa conté els nervis autònoms que innerven el múscul llis vascular i també petits vasos sanguinis anomenats vasa vasorum, que vascularitzen les cèl·lules de múscul llis.

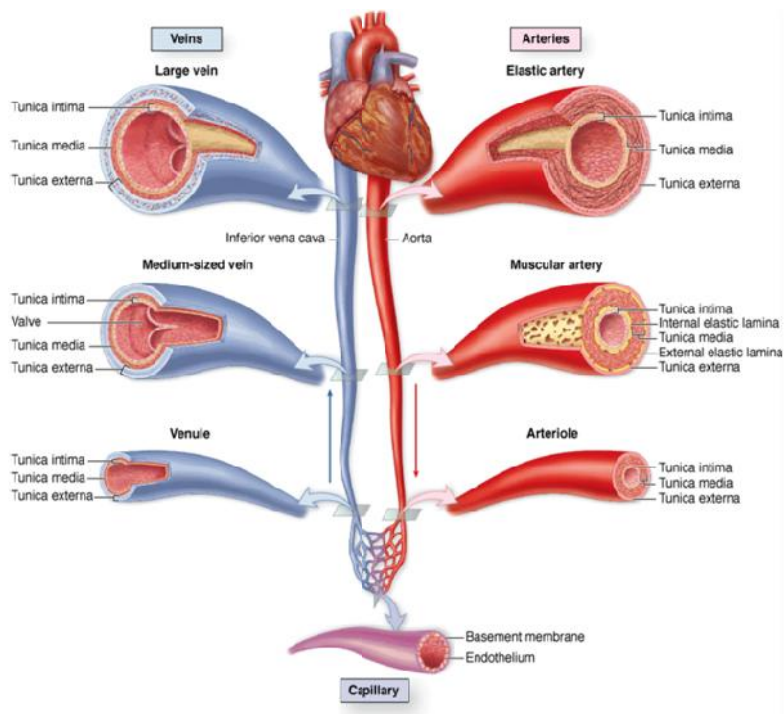
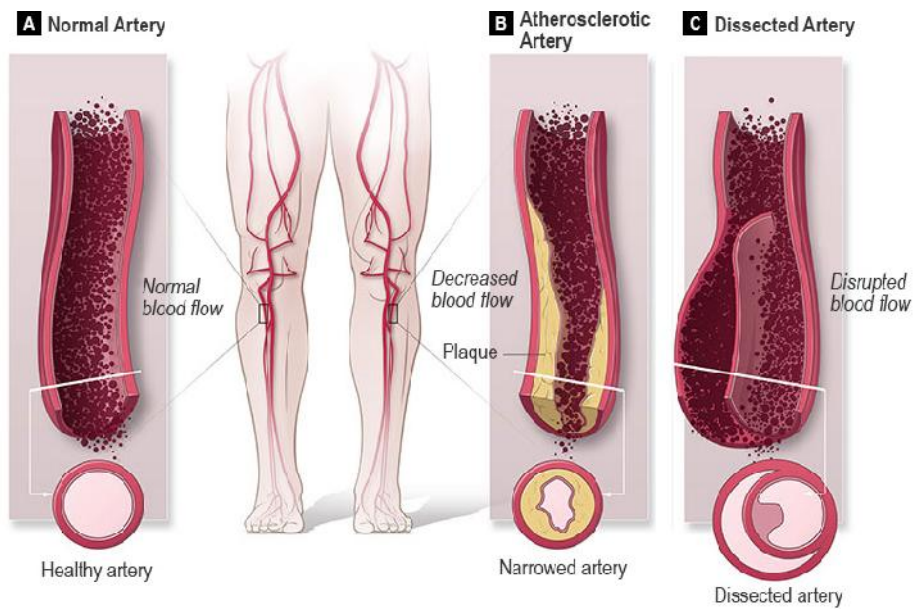


Fig. 3- Estructura dels vasos sanguinis. (Mescher AL: *Jumqueira's Basic Histology: Text and Atlas*, 12th Edition/ www.accessmedicine.com)

2. MALALTIA ARTERIAL PERIFÈRICA

La malaltia arterial perifèrica (MAP) (Figura 4), actualment afecta a un 15-20% dels subjectes majors de 70 anys^{9,10}, i si analitzessim als subjectes asimptomàtics, la prevalença seria major.

Quan es comparen malalts amb MAP amb controls de la mateixa edat, l'incidència de mortalitat cardiovascular és del 0,5% en controls i del 2,5% en pacients amb MAP. A més a més, en els pacients amb MAC coneguda, la presència de MAP augmenta el risc de mort un 25% respecte als controls. Per tot això, és important buscar la MAP fins i tot en pacients asimptomàtics, per a controlar precoçment els factors de risc i reduir la mortalitat¹¹.



3. MALALTIA CARDIOVASCULAR CORONÀRIA

Les malalties cardiovasculars (MCV) són la principal causa de mortalitat prematura al món desenvolupat. És la primera causa de mort en la població espanyola major de 30 anys; sobre ells, la MAC fa que l'impacte sigui més significatiu, la majoria dels casos deguda a l'aterosclerosi de les artèries coronàries, amb contribucions menys freqüents de vasoespasme, vasculitis o embòlia. Dades d'Estats Units mostren una reducció de la mortalitat per malaltia coronària en els últims anys com a resultat d'un millor control del consum de tabac, la hipertensió i la dislipèmia, no obstant això, hi ha un augment progressiu de la mortalitat deguda a un augment en l'obesitat i la diabetes mellitus¹²⁻¹⁴. Tot i que l'estenosi arterioscleròtica pot afectar únicament a una artèria coronària epicàrdica principal, poden estar afectades dos o tres artèries (descendent anterior esquerra (DAE), circumflexa esquerra (CFE) i artèria coronària dreta (ACD)). Les plaques clínicament significatives poden localitzar-se en qualsevol part, però predominen en els primers centímetres de la DAI i de la CFE, i en tota la longitud de la ACD, a vegades també estan afectes les rames secundàries.

La isquèmia cardíaca representa un desequilibri entre l'aport coronari i les necessitats miocàrdiques, i es manifesta amb síndromes diferents però superposats com:

L'angina de pit, que és una obstrucció d'una o més artèries coronàries que ocasiona dolor opressiu toràcic degut a una insuficiència en l'aportació d'oxigen al cor per una perfusió inadequada que generalment es deguda a una malaltia arterioscleròtica com una estenosi crítica fixa¹⁵⁻¹⁸, encara que també pot presentar-se a causa d'un espasme coronari (angina de Prinzmetal).

L'angina inestable que es deguda a una petita fissura o ruptura d'una placa arterioscleròtica que desencadena l'agregació plaquetària, la vasoconstricció i la formació de un trombe mural, que pot no ser oclusiu, provocant una disminució del fluxe sanguini al cor, augmentant així, el risc de patir un infart de miocardi.

L'infart agut de miocardi, que típicament es degut a la trombosi aguda que es produeix després de la ruptura de la placa¹⁹, comportant una insuficiència de la irrigació sanguínia al cor i provocant una necrosi al miocardi.

Mort cardíaca súbita deguda a una arrítmia que provoca una parada cardíaca mortal, la majoria de vegades en pacients amb arteriopatia coronària greu.

La cardiopatia isquèmica crònica que és una insuficiència cardíaca progressiva deguda a una lesió isquèmica per infarts previs o per una isquèmia crònica de baix grau.

Amb l'obstrucció de les artèries coronàries (Figura 5), la paret cardíaca inicialment s'adapta, però després evoluciona amb deformacions anatòmiques com pot ser un augment de la fibrosi intersticial (les cèl·lules miocàrdiques son substituïdes per teixit fibrós), cèl·lules en apoptosi (mort cel·lular), isquèmia (disminució de la densitat capil·lar), necrosi (infart), etc., causant una insuficiència cardíaca sinó la mort.

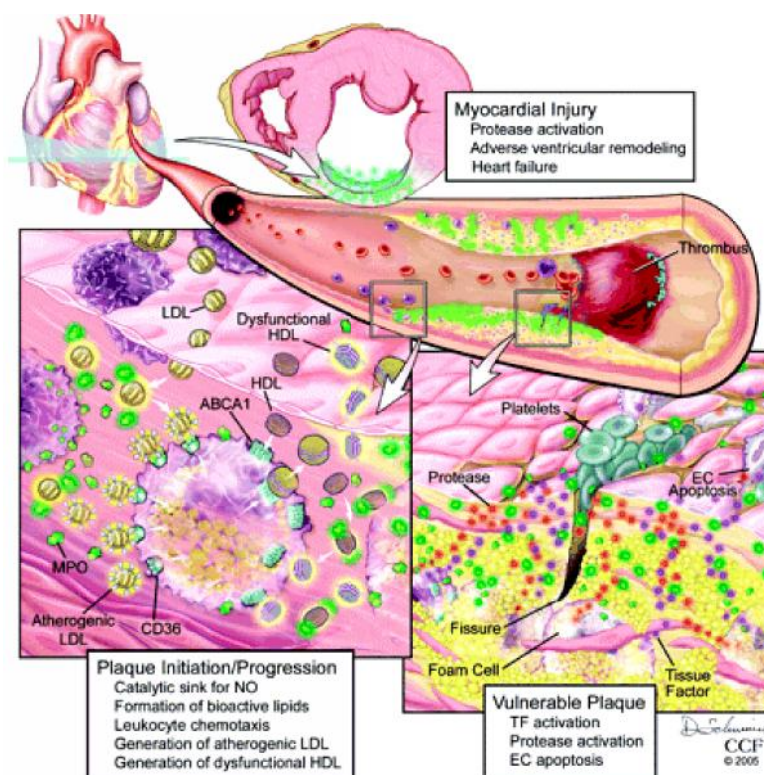


Fig. 5- Obstrucció de les artèries coronàries. (Oxidized LDL and MPO: Possible Interventions Posted by Adin Smith on Mon, Dec 16, 2013)

A Espanya, la insuficiència cardíaca és un problema sanitari de primer ordre, tot i que no disposem de xifres que permetin dimensionar el seu impacte amb exactitud per falta d'estudis amb disseny apropiat. Davant d'una prevalença d'insuficiència cardíaca del 2% en altres països europeus i als Estats Units, els estudis a Espanya mostren xifres del 5%, probablement a causa de les seves limitacions metodològiques²⁰. La insuficiència cardíaca consumeix enormes recursos sanitaris, perquè és la primera causa d'hospitalització de majors de 65 anys i representa el 3% de tots els ingressos hospitalaris i el 2,5% del cost de l'assistència sanitària. Hi ha dos patrons d'insuficiència cardíaca, un amb funció sistòlica preservada, més associat a la hipertensió, i un altre amb funció deprimida, més relacionat amb la cardiopatia isquèmica. Al 2010, la insuficiència cardíaca va constituir el 3% del total de defuncions d'homes i el 10% de les de dones¹⁴, les prediccions actuals indiquen que l'any 2020 les MCV, i l'aterosclerosi en particular, serà la primera causa mundial de mortalitat.

L'aterosclerosi no és simplement una conseqüència inevitable de l'envelliment degeneratiu, sinó una condició inflamatòria crònica que pot ser convertida en un esdeveniment clínic agut per trencament de la placa i la trombosi.

4. FACTORS DE RISC CARDIOVASCULARS

La identificació d'aquests factors de risc^{21,22} sorgeix de la combinació d'estudis experimentals i de les dades extretes d'estudis epidemiològics transversals i longitudinals realitzats a la població general, especialment l'estudi Framingham²⁰ i el projecte europeu SCORE²⁰. A partir dels resultats d'aquests estudis s'han establert diferents factors de risc i s'han desenvolupat models matemàtics que permeten calcular el risc cardiovascular individual en un pacient determinat. Els factors de risc cardiovasculars (FRCV) establerts són capaços de predir de forma independent la MCV, i poden classificar-se com a modificables, i per tant susceptibles de prevenció i tractament, i els que no són modificables, com per exemple l'edat, el sexe del pacient i la seva història familiar (Taula 1).

Principals factors de risc cardiovascular dependents del pacient.	
Factors de risc cardiovascular establerts	Factors de risc cardiovascular emergents
<p><i>No modificables</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Edat - Sexe - Antecedents familiars de primer grau de cardiopatia isquèmica precoç 	<p><i>Lipídics</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - triglicèrids - lipoproteïna (a) - Partícules LDL denses i petites - apolipoproteïna B i - apolipoproteïna A-1 - colesterol total/cHDL
<p><i>Modificables</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Tabaquisme - Hipertensió arterial - colesterol-LDL - colesterol-HDL - Diabetis mellitus - Glucosa basal alterada - Resistència insulínica - Síndrome metabòlica - Dieta aterogènica - PCR - Microalbúminúria - Deficiència d'estrògens 	<p><i>No lipídics</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - homocisteïna sèrica - Disfunció endotelial - Factors pro-tombòtics - Altres biomarcadors inflamatoris - Hipogonadisme. Disfunció erèctil - GIM caròtida - Factors genètics no lipídics
<p>GIM: gruix intima-mitja; HDL: lipoproteïna d'alta densitat; LDL: lipoproteïna de baixa densitat; PCR: proteïna c-reactiva</p>	

Taula 1 – Factors de risc cardiovascular. OMS (2004). ftp://ftp.fao.org/codex/ccnfsdu26/nf26_11s.pdf [acceso: 24-10-09]. OMS/FAO Serie de Informes Técnicos 916. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/AC911E/AC911E00.HTML> [acceso: 23-2-12].

Per altra banda, es continuen identificant altres factors de risc cardiovascular, denominats emergents, que podrien explicar perquè alguns pacients sense factors de risc tradicionals poden presentar malaltia cardiovascular, fins i tot en individus molt joves²³

Tot i la importància dels lípids plasmàtics, la formació de la lesió ateroscleròtica és un procés molt complex, en el qual intervenen l'endoteli vascular, lipoproteïnes modificades, cèl·lules sanguínies com els leucocits, cèl·lules musculars llises, proteïnes de la matriu extracel·lular i tot tipus de molècules inflammatòries. La percepció de tots aquests fenòmens reforça la idea que la prevenció de les malalties cardiovasculars ha d'implicar no només a la correcció dels factors de risc sinó a desenvolupar noves estratègies per combatre les malalties associades a aquest procés patològic²².

Existeixen hàbits adquirits, patologies, antecedents o situacions que augmenten de forma significativa la possibilitat de patir algun problema cardiovascular, es coneixen com a FRCV. Aquests FRCV són additius, és a dir que quants més factors de risc es presenten en un individu major serà la possibilitat de patir un problema cardiovascular, en un determinat període de temps, generalment 5 o 10 anys.

Les característiques principals d'un factor de risc, són:

- Ñ Relació independent i quantitativa amb la malaltia.
- Ñ Presència d'un mecanisme causal que expliqui l'associació.
- Ñ L'eliminació o reducció del factor resulta en una regressió del procés i de les seves conseqüències clíniques.

La MCV és d'origen multifactorial i un factor de risc s'ha de considerar en el context dels altres.

Els FRCV reconeguts i millor estudiats són: edat, sexe, història familiar, hiperlipèemies, tabaquisme, hipertensió arterial, diabetis i sedentarisme. Actualment, s'estan investigant nous factors de risc com la lipoproteïna (a), l'homocisteïna, la proteïna C reactiva, el fibrinogen, el factor VII i l'antigen tPA, entre d'altres.

4.1.1. Factors de risc personals no modificables

4.1.1.1. Edat

Encara que l'envelliment no sigui una causa directa d'afeccions coronaries, aquestes són més comunes en persones d'edat avançada^{24,25}. Amb el pas del temps, els sistemes que regulen l'homeòstasi de l'organisme van perdent eficàcia, els teixits perden elasticitat i el sistema immunitari i antioxidant es van debilitant, de manera que l'organisme es més susceptible davant d'algunes malalties, les cardiovasculars són les més comuns²⁶.

4.1.1.2. Sexe

Segons les estadístiques, els homes de menys de 50 anys tenen una incidència major de patir problemes cardiovasculars que les dones de la mateixa edat²⁷. Això és degut a l'efecte protector que exerceixen els estrògens en els vasos sanguinis i el sistema cardiovascular²⁶.

4.1.1.3. Raça

La freqüència de malaltia coronària difereix segons la raça, és major en homes i dones de raça negra respecte als blancs, això es pot explicar degut a la major prevalença d'hipertensió en la raça negra²⁰.

4.1.1.4. Antecedents familiars i marcadors genètics

Les persones amb antecedents familiars de malaltia coronària, especialment amb presentació clínica precoç (abans dels 55 anys per als homes i 65 per a les dones) tenen un risc personal augmentat de cardiopatia isquèmica (CI), molt més quant més precoç ha estat l'antecedent familiar i quan més membres familiars hagin estat afectats²⁸.

Els FRCV estan associats també a determinats trets genètics. Per exemple, les concentracions de la lipoproteïna (a) i de les partícules de cLDL sembla que estan sota la influència genètica²⁹. Recentment, s'ha descobert la relació entre el gen de la ECA (enzima conversiva de la angiotensina) i la CI³⁰. El genotip D/D del gen de la enzima conversiva de la angiotensina és més freqüent

en pacients amb infart de miocardi (IM) i s'associa a concentracions més elevades d'ECA, a diferència del genotip I/D i I/I. S'ha descrit, també, que el polimorfisme genètic del receptor IIb-IIIa a la membrana plaquetària es relaciona amb un risc elevat de trombosi coronària³⁰.

4.1.2. Factors de risc modificables

4.1.2.1. Dislipèmies

Les dislipèmies o dislipidèmies són alteracions en la quantitat de (lípid, triglicèrids, àcids grassos, colesterol, fosfolípids) en la sang. Poden ser d'origen genètic o bé secundàries a diferents situacions patològiques. El factor ambiental que influeix sobre la colesterolèmia és la ingestió de grasses saturades i colesterol que forma part de les lipoproteïnes per al seu transport pel torrent sanguini³¹.

L'Hiperlipèmia, l'hiperlipidèmia i hiperlipidosis consisteix amb la presència de nivells elevats de lípid en sang.

L' Hiperlipoproteïnèmia es quant el valor del colesterol total plasmàtic i/o dels triglicèrids són superiors a 200mg/dl³².

4.1.2.2. Colesterol i Lipoproteïnes

El colesterol és un lípid³³ que pertany al grup dels esteroides i forma part de les membranes cel·lulars. Les fonts de colesterol poden ser exògenes per la dieta, o endògenes per reaccions anabòliques en el reticle endoplasmàtic llis de pràcticament totes les cèl·lules.

Atès que el colesterol és insoluble en aigua, el colesterol plasmàtic només existeix en forma de complexos macromoleculars. Els encarregats de transportar el colesterol i els triacilglicèrids són les partícules lipoproteïques, que tenen la capacitat de fixar i transportar-ne grans quantitats. Aquestes es poden agrupar segons la seva densitat creixent: quilomicrons, remanents de quilomicrons, lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL), lipoproteïnes de densitat intermitja, lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) i lipoproteïnes d'alta densitat (HDL).

Les LDL són el principal transportador de colesterol en la sang. Aquestes partícules tenen un diàmetre de 22 nanòmetres, una massa d'uns tres milions de daltons i contenen unes 1.500 molècules de colesterol esterificat. La funció de les LDL és transportar el colesterol als teixits perifèrics i regular la síntesi de *ex novo* en aquests llocs. D'altra banda, la funció de l'HDL és captar el colesterol alliberat en el plasma procedent de les cèl·lules que moren i del recanvi de membranes. Tot seguit, una aciltransferasa present en les HDL esterifica el colesterol i el transfereix a les VLDL o a les LDL.

L'augment de les molècules de LDL en el plasma sanguini afavoreix la formació de la placa d'ateroma³⁴ i augmenta la densitat de la sang afavorint la formació de trombus³⁵.

Mentre que la disminució de LDL mitjançant teràpia amb inhibidors de la HMG-CoA reductasa redueix la progressió i fins i tot induïx la regressió de les lesions ateroscleròtiques coronàries, comprovant-se mitjançant l'angiografia coronària³⁶.

Actualment, se sap que les partícules de LDL tenen diferents mides i densitat. Hi ha evidència de la influència genètica en la producció de les partícules LDL denses que tenen un efecte més aterogènic i es coneguda la seva associació amb la MC^{29,37-39}.

Hi ha molts estudis que han comprovat el valor predictiu dels nivells de HDL en relació inversa a l'aparició de MCV^{31,32}. En l'estudi PROCAM ("Prospective Cardiovascular Münster Study") la influència de HDL sembla ser més important que la resta dels factors lipídics⁴⁰. El HDL baix és predictor de la mortalitat en pacients amb CI i valors del colesterol total normals. Les concentracions baixes també s'associen amb la gravetat i el nombre de les lesions ateroscleròtiques coronàries.

Entre les causes que afavoreixen els valors elevats de HDL hi ha l'obesitat, el tabaquisme, el sedentarisme, el tractament amb beta-bloquejants, poques vegades s'associen a deficiències genètiques. En canvi, les concentracions elevades de HDL estan relacionades amb dietes riques amb àcids poliinsaturats, activitat física i consum moderat d'alcohol, així com amb els

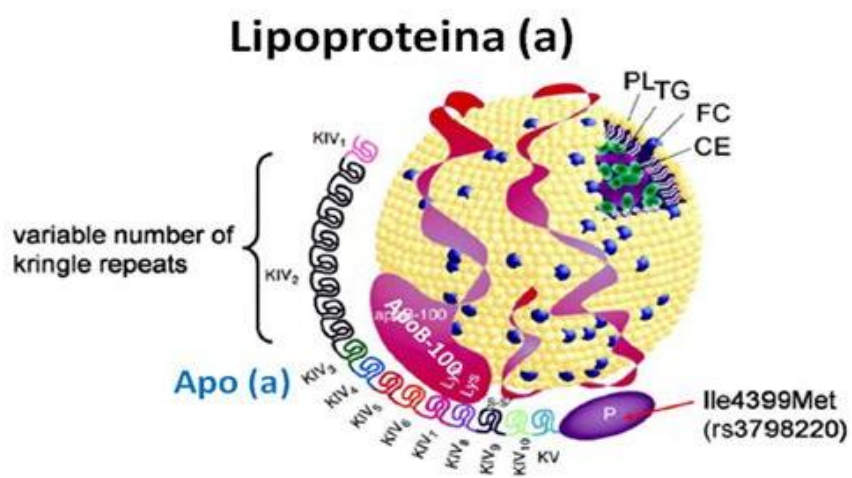
estrògens, això explicaria que les dones estan protegides fins a la edat postmenopàusica.

La xifra elevada de colesterol, tant per al total com per al LDL³⁰ és el principal factor de risc de la cardiopatia isquèmica. Aquest risc és continuu i augmenta de forma apreciable quan la concentració de colesterol és superior a 250mg/dl/6.5mmol/l i més encara, quan els valors superen els 300mg/dl/7.8mmol/l, la incidència de la malaltia coronària es redueix quan les xifres disminueixen^{28,41,42}.

La reducció del colesterol disminueix la morbimortalitat per malalties cardiovasculars i la mortalitat total, aquests resultats es poden observar en els estudis WOSCOP i AFCAPS/ TexCAPS que han investigat l'efecte de les estatines en la prevenció primària de la CI. L'assaig 4S "Scandinavian Simvastatin Survival Study" va estudiar la prevenció secundària en pacients amb valors alts de colesterol⁴³, sent els resultats que els pacients tractats amb simvastatina va reduir la mortalitat per CI en un 42% i la mortalitat total en un 30%^{41,44}.

L'efecte del tractament amb estatines sobre l'evolució dels ponts aortocoronaris va ser analitzat amb l'estudi "Post Coronary Artery Bypass Graft"/ Post CABG/. Concloent que la progressió de l'aterosclerosi en els ponts es redueix disminuïnt el cLDL per sota de 100 mg/dl⁴⁵. L'estudi "Atorvastatin versus Revascularization" va demostrar, en pacients amb angina estable amb tractament hipolipemiant intens, que la disminució del cLDL fins a 77 mg/dl era tant efectiu com la revascularització amb angioplàstia coronària amb el tractament habitual, en la disminució de la incidència d'episodis isquèmics⁴⁶. Diversos assajos clínics recents de tractament amb estatines (ASCOT, CARDS, PROVE-IT, TNT, LIPS, ALERT, ALLHAT, PROSPER, HPS) han demostrat el seu efecte beneficiós en diferents grups de la població en dones, gent major de edat, hipertensos, diabètics, pacients amb malaltia coronària aguda i amb transplant renal i fins i tot en persones amb valors de colesterol total i cLDL normals o baixos previ al tractament amb estatines. S'ha vist que el benefici absolut del tractament amb estatines depèn principalment del risc cardiovascular individual i del grau de reducció de cLDL³⁷.

La lipoproteïna (a) (Lp (a)) és una proteïna de baixa densitat formada per un nucli lipídic, fonamentalment constituït per èsters de colesterol i triglicèrids,



de TG poden actuar sinèrgicament amb altres trastorns lipídics⁵⁰, fent predir un augment del risc cardiovascular, especialment quan estan relacionats amb xifres baixes de HDL o amb un quocient LDL/HDL elevat⁴⁹. Un metanàlisis de tractament amb fibrats (fàrmac principal en el control de la hipertrigliceridèmia) ha demostrat una reducció del 25% en el risc d'episodis coronaris majors, però no s'ha observat reducció de la mortalitat total⁵¹.

4.1.2.4. Tensió arterial

Per a un adult sa es considera que els valors òptims de la tensió arterial han de ser inferiors a 120/80 mmHg tot i que tendeix a incrementar-se amb l'edat⁵².

La tensió arterial sistòlica (TAS) amb un valor normal de 90-119 mmHg i la tensió arterial diastòlica (TAD) amb un valor normal de 60-79 mmHg han estat els únics factors mecànics considerats com a predicadors del risc cardiovascular.

Es considera hipertensió arterial (HTA) quan els valors en sang són majors de 140/90 mmHg, podent augmentar l'activitat del cor comportant una hipertròfia cardíaca; això fa que ambdós, el cor i les artèries, siguin més susceptibles a patir una lesió cardiovascular⁵³, incrementant el risc d'IM i l'aterosclerosi⁵⁴. Per tant, el control de la hipertensió arterial té un paper fonamental en la reducció de la morbimortalitat coronària, ja que la incidència de la MC és major en la població hipertensa, augmentant el risc de patir-la en relació amb les xifres tant sistòliques com diastòliques⁵⁵, junt amb la reducció del colesterol en la dieta, la prevenció secundària amb àcid acetilsalicílic i l'abstinència tabàquica⁵⁶. L'estudi de Framingham⁵⁷ va comparar la morbimortalitat per MC entre la població d'hipertensos, trobant un descens de un 60% en el grup tractat amb medicació durant dos dècades, respecte al grup no tractat. Diversos assajos clínics demostren el benefici del control tensional obtingut amb la utilització dels nous antihipertensius: inhibidors de l'ECA (IECAS), calciantagonistes i antagonistes dels receptors d'angiotensina II (ARA II)⁵⁸. S'ha vist que el benefici del tractament amb hipertensius depèn del grau del control de la HTA i no del tipus de fàrmac utilitzat^{37,59}. Totes les guies clíniques sobre el control de la HTA recomanen un

ractament antihipertensiu precoç i agressiu per a aconseguir una reducció de la morbiditat i mortalitat cardiovascular⁶⁰.

S'ha identificat un factor anomenat tensió de pols (TP=TAS-TAD), amb valors de normalitat de 50 mmHg tant per a homes com per a dones, que és un component de risc independent sobre la morbimortalitat i mortalitat cardiovascular⁶¹, tant en pacients normotensos com hipertensos, tractats o no farmacològicament⁶¹. Les variacions de la TP obeeixen a tres factors principals: el dèbit cardíac, la distensibilitat arterial i el temps de reflexió de les ones del pols; l'augment de rigidesa arterial va acompanyada d'un augment de la TP en els pacients d'edat avançada, la qual cosa dona lloc a dos models de hipertensió arterial: hipertensió arterial sistòlica aïllada, i una sistòlico-diastòlica amb augment desproporcionat de la primera^{62,63}.

4.1.2.5. Diabetis mellitus

Es considera que un individu és diabètic quan la concentració plasmàtica de glucosa en dejú és superior a 126 mg/dl, la Diabetis Mellitus (DM) ve precedida per un llarg període de hiperglucèmia assintomàtica. Ambdós tipus de DM, tant el tipus I i el tipus II (insulinodepenent i no insulinodepenent respectivament) són factors de risc per a l'evolució de la CI⁶⁴, en dones, es creu que perden el seu factor protector de gènere⁶⁵, hi ha estudis que demostren que el risc de patir un IM per a un pacient amb DM tipus II és tant alt com en el pacient amb MC⁶⁶.

El fet patogènic principal en la DM tipus II és la resistència a la insulina i la hiperinsulinèmia. La hiperinsulinèmia es considera un FRCV independent⁶⁷. La resistència a la insulina s'associa a anormalitats hemodinàmiques i de la coagulació, així mateix produeix alteracions lipídiques entre les que destaca un augment dels triglicèrids, de les proteïnes de molt baixa densitat, partícules especialment aterogènies, així com un descens del cHDL⁶⁸. S'ha vist també que aproximadament 2/3 dels pacients amb HTA essencial tenen alteracions en el metabolisme de la glucosa⁶⁹. La resistència augmentada a la insulina o a la DM tipus II i la intolerància a la glucosa associats a TG alts, cHDL baix, HTA, obesitat central; es coneix com a síndrome metabòlic i s'associa a un major potencial trombogènic i major risc de patir malalties cardiovasculars^{70,71}. Entre altres

característiques clíniques no incloses en els criteris diagnòstics d'aquest síndrome, però presents freqüentment, estan el Síndrome de Apnea Obstructiva del Son, la hiperuricèmia, els nivells elevats de l'inhibidor del factor activador del plasminogen i la proteïna C reactiva⁷²⁻⁸⁴.

La obesitat i la inactivitat física són dos factors de risc per la DM tipus II, quan ambdues condicions coexisteixen, la prevalença de la malaltia cardiovascular és d'un 19.2 % i la mortalitat per IM és significativament superior que en pacients no diabètics^{85,86}.

En la DM tipus I el bon control de la glucèmia és de major pes específic en la prevenció de la CI, amb la optimització d'aquest es redueixen tant les complicacions microcardiovasculars, com les lesions macrocardiovasculars⁸⁷ i en la DM tipus II l'aparició de la MC es relaciona amb els valors de glucèmia i d'hemoglobina glucosilada i amb altres factors de risc com cLDL, cHDL, TG, THA i tabaquisme⁸⁸. En els individus amb intolerància a la glucosa el risc de desenvolupar la MC es duplica⁸⁹, també es coneix la associació positiva entre els valors d'hemoglobina glucosilada i el risc cardiovascular³⁷. L'estudi 4S demostren que la reducció del colesterol amb simvastatina millora el pronòstic dels pacients diabètics amb CI⁹⁰, el benefici clínic absolut aconseguint mitjançant la reducció del colesterol podria ser major en els diabètics amb CI que en els no diabètics, perquè els primers tenen un major risc absolut d'episodis coronaris recurrents. L'estudi CARDS demostra el benefici de les estatines en la prevenció primària de la CI en pacients diabètics⁹¹. Concloent que la modificació dels factors de risc associats en els pacients diabètics tenen gran importància, ja que el control estricte de la HTA disminueix a la meitat la mortalitat relacionada amb les complicacions macro i microvasculars de la diabetis⁹².

4.1.2.6. Alcohol

El consum moderat d'alcohol, 1-2 copes diàries de vi negre, s'associa a un menor risc de malaltia cardiovascular en comparació amb abstenir-se de beure, però el consum en grans quantitats incrementa de forma significativa la concentració de LDL en sang i afavoreix l'aparició hipertensió arterial⁹³.

L'augment del risc de patir una malaltia cardiopàtica coronària amb el consum d'alcohol elevat en la gent gran és del 22%⁹³.

4.1.2.7. Tabaquisme

El tabac produeix un augment dels nivells d'adrenalina, del ritme cardíac i de la pressió sanguínia, també produeix una falta d'oxigen a les cèl·lules i danys a les parets de les artèries, és a dir, té efectes a nivells sistèmics, vasculars i protombogènics^{94,95} (augmenta l'activitat plaquetària, el fibrinogen i el factor VII), altera la funció endotelial disminuint el flux sanguini i la capacitat dilatadora dels vasos i és un factor per a la producció de l'espasme coronari⁹⁶. Els components perniciosos dels que es coneix millor el seu efecte són la nicotina que actua a nivell presinàptic produint l'alliberació de diverses substàncies com la norepinefrina, l'adrenalina, augmenta la pressió arterial, les resistències perifèriques, la freqüència i la despesa cardíaca; i el monòxid de carboni que forma carboxihemoglobina interferint amb la capacitat transportadora de l'oxigen.

El consum de cigarretes modula el perfil lipídic (augmenta la concentració de LDL-colesterol, triglicèrids i baixa la concentració d'HLD⁹⁷, altera el metabolisme dels estrògens^{98,99}, de les cèl·lules endotelials i dels limfòcits¹⁰⁰, promou la disfunció endotelial^{101,102}, etc... totes aquestes dades suggereixen que el consum de cigarretes modula una gran varietat de sistemes fisiològics involucrats en l'inici i progressió del procés ateroscleròtic. Un metanàlisis sobre tabaquisme passiu ha trobat un increment del risc de malaltia coronària del 25% amb una relació significativa de dosis-resposta, l'augment del risc és del 23% per als fumadors exposats al fum entre 1 i 19 cigarretes i del 31% per als exposats a més de 20 cigarretes⁹⁶, també incrementa el risc de desenvolupar una malaltia cardiovascular^{100,103}, hi ha estudis que confirmen que els fumadors que han patit un infart de miocardi tenen més probabilitat de morir sobtadament que els infartats no fumadors¹⁰⁴.

4.1.2.8. Obesitat

L'Índex de Massa Corporal és un índex del pes d'una persona en relació amb la seva altura (IMC= pes (kg)/altura(metres), tot i que no fa distinció entre els

components grassos i no grassos de la massa corporal total, tampoc no distingeix entre les diferents formes d'adipositat, algunes de les quals poden estar associades de forma més estreta al RCV, però aquest és el mètode més pràctic per avaluar el grau de risc associat amb l'obesitat.

Els valors de l'IMC són:

- J L'índex ideal es situa entre els 18,5-24,9 Kg/m²
- J Per baix dels 20 Kg/m² s'observen majors índex de dolences pulmonars i desnutrició
- J Entre 25,0 - 29,9 kg/ m² es considera "sobrepès"
- J Entre 30 i 34,9 kg/ m² es considera "obesitat lleu", entre 35,0 i 39,9 kg/ m² es considera "obesitat moderada"
- J Més de 40 kg/ m² es considera "obesitat mòrbida"

En un estudi fet per ACS (American Càncer Society) es demostra que cada augment de 1 en l'IMC correspon un augment de 1.1 del risc relatiu de mort cardiovascular en homes de 30-44 anys i de 0.3 entre els 65-74 anys. En les dones aquesta relació és de 1.08 de risc relatiu per al primer grup d'edat i de 1.02 per al segon¹⁰⁵. A mesura que augmenta l'ICM, les xifres de colesterol i HTA augmenten. S'ha identificat que l'obesitat central (diàmetre de la cintura major de 102 cm en homes i de 88 cm en dones) s'associa a altres factors de risc com la resistència a la insulina, hipertensió i dislipèmia i es relaciona amb major risc cardiovascular³⁷.

4.1.2.9. Sedentarisme

D'acord amb l'Organització Mundial de la Salut, la inactivitat física és el quart factor de risc de mortalitat mundial (6% de les morts arreu del món). L'activitat física és beneficiosa per a controlar els nivells normals de la TA, el colesterol, la glucosa i l'IMC. Una activitat física moderada pot reduir el risc de morbiditat i mortalitat cardiovascular¹⁰⁶

4.1.3. Altres factors

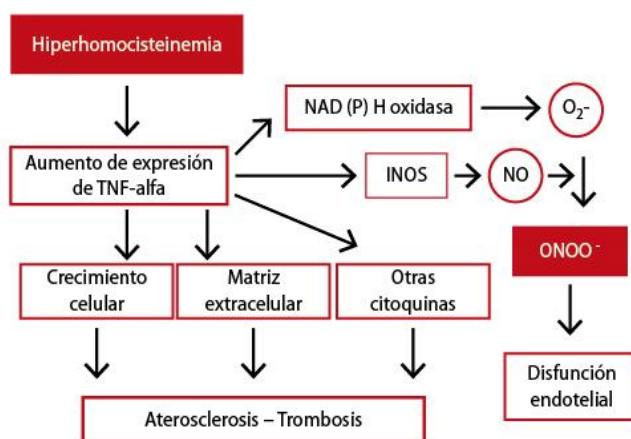
4.1.3.1. Factors de la coagulació

Diferents factors de la coagulació com el fibrinogen, el factor VII, l' inhibidor de l'activitat tissular del plasminogen (PAI-1), etc. han estat descrits com a factors trombogènics. Les dades de l'estudi ECAT ("The European Concerted Action on Thrombosis") demostren que els nivells de fibrinogen, del factor de von Willerbrand i de antigen rtPA són predictors independents per a complicacions coronàries¹⁰⁷. Conclou que el risc coronari és menor en els pacients amb els nivells de fibrinogen baix, fins i tot quan tenen unes concentracions elevades de colesterol. Gensini et al. apunten a que els seus valors plasmàtics de fibrinogen poden estar influenciats pel tabaquisme, l'activitat física, l'edat i l'estat menopàusic³⁰. Altres autors consideren que encara no hi ha una evidència clara per a determinar si el fibrinogen té un paper causal en la aterotrombosis, o simplement, és un marcador del grau del dany vascular¹⁰⁸. Els nivells elevats del factor VII també s'associen amb la CI, correlacionant-se amb les concentracions dels TG, del colesterol, del fibrinogen i amb el període menopàusic de les dones¹⁰⁹.

4.1.3.2. Homocisteïna

És un -aminoàcid que es pot reciclar cap a metionina o convertir-se en cisteïna amb l'ajuda de les -vitamines. És un FRCV independent, tot i que encara no s'ha demostrat de forma concloent que el tractament d'aquest trastorn tingui un efecte preventiu diversos estudis, demostren que les concentracions elevades de homocisteïna (Hcy) augmenten el risc de patir malaltia vascular amb afectació del sistema vascular perifèric, el coronari i el cerebral^{110,111}.

La hiperhomocisteïnemia moderada sol ser deguda a un defecte en la activitat de les enzimes implicades en el metabolisme de la homocisteïna¹¹², la disminució de l'activitat d'aquestes enzimes pot ser degut a alteracions en l'estructura primària/defectes genètics/o a disminucions funcionals secundàries a dèficit de les seves coenzimes: la vitamina B12, vitamina B6 i l'àcid fòlic¹¹³.



4.1.3.3. Microalbuminuria

Es parla de microalbuminuria quan els valors de la proteïna albúmina en orina estan entre 30-300 mg/24h. És un element bàsic en la avaluació i el seguiment del RCV dels pacients amb DM i HTA, es considera que és un marcador de la disfunció endotelial, ja que pot reflexar un estat de disfunció endotelial i protombòtic, com a augment de les concentracions del factor de von Willebrand, els valors plasmàtics d'angiotensina II, endotelina, factor activador del plasminogen, fibrinogen, trombomodulina, complexos trombina - antitrombina III i deteriorament de l'activitat fibrinolítica, que comporta un augment de la viscositat sanguínia i de la resistència vascular perifèrica. La major permeabilitat de l'endoteli permet la penetració de lipoproteïnes a la paret dels vasos, el que inicia la formació de les plaques de ateroma.

S'ha demostrat el seu valor pronòstic per a la mortalitat o per al desenvolupament de les MCV en la població tant diabètica com no diabètica¹¹⁴.

4.1.3.4. Àcid úric

L'àcid úric és una substància de rebuig que genera el mateix organisme, derivada de diversos processos metabòlics. La concentració normal d'àcid úric en sang és d'entre 2,5 i 6 mg/dl per a les dones i fins a 7,2 mg/dl per als homes segons l'Associació Mèdica Nord-americana, els nivells alts o hiperuricèmia s'associen normalment amb xifres altes de pressió arterial. Aquesta elevació dels nivells d'àcid úric en la hipertensió pot estar ocasionada per una mala funció renal, per l'ús de fàrmacs diürètics o per altres circumstàncies, per tant, malgrat que és un fet que la hiperuricèmia es relaciona amb la hipertensió, clàssicament no se l'ha considerada com un factor causal ni tampoc com un "veritable" factor de risc cardiovascular, de manera que el seu paper és controvertit. Això no obstant, investigacions recents atorguen un paper més important als nivells alts d'àcid úric en la gènesi de la hipertensió arterial.

Un estudi recent¹¹⁵ mostra que l'alopurinol, fàrmac que s'utilitza per disminuir les xifres d'àcid úric en sang, aconsegueix normalitzar les xifres de pressió arterial en barons adolescents; i l'estudi Rotterdam descriu que els valors elevats de l'àcid úric s'ha associat a un risc augmentat de patir IM i ictus¹¹⁶.

4.1.3.5. Marcadors sèrics de la inflamació

El procés inflamatori té un paper important en l'aterogènesi, tant durant la formació de la placa ateroscleròtica com durant la fissura aguda o erosió de la mateixa, que afavoreix la formació dels trombus^{117,118}. S'han realitzat estudis sobre el valor predictiu de diversos marcadors inflamatoris sistèmics com la proteïna C reactiva (PCR), interleukina 1,6,8, el factor d'adhesió plaquetària (FAP), el factor de necrosi tissular alfa (TNF-), també hi ha estudis sobre la influència de diferents factors infecciosos com la *Chlamydia pneumoniae*, la *Mycoplasma pneumoniae*, el *Helicobacter pylori* i el *Citomegalovirus*. S'ha investigat més àmpliament la relació de la malaltia cardiovascular i la proteïna C reactiva (PCR), les concentracions elevades de PCR en homes aparentment sans es correlaciona amb una taxa més alta d'episodis vasculars¹¹⁹, demostrant que els nivells alts de PCR tenen un valor pronòstic per a esdeveniments coronaris en pacients amb angina estable o inestable¹⁸. Els valors de PCR s'han relacionat amb diversos factors com la HTA, l'ICM, la DM, l'obesitat, la teràpia hormonal substitutiva (THS) i les infeccions o inflamacions cròniques, i tant l'activitat física, com la pèrdua de pes o el tractament amb estatinas i fibrats es relacionen amb una disminució dels valors de la PCR, per tant podem dir que la determinació de la PCR té avui en dia la utilitat de completar la estratificació del risc cardiovascular en la població sana amb risc cardiovascular moderat¹²⁰.

Altres nous marcadors de l'activitat ateroscleròtica són la proteïna plasmàtica associada a l'embaràs que podria tenir un paper com a marcador de la inestabilitat de la placa ateroscleròtica, la fosfolipasa A2 associada a la lipoproteïna A que és un predictor d'episodis coronaris en subjectes de mitjana edat amb diferents valors de colesterol aparentment sans, i la cistina C com un factor pronòstic en pacients amb síndrome coronària aguda¹²⁰.

5. ARTERIOSCLEROSI

L'arteriosclerosi és un terme usat per descriure l'engruiximent del vas que redueix el diàmetre de la llum vascular, que pot comprometre la perfusió d'òrgans, i la pèrdua d'elasticitat de les artèries, que augmenta la probabilitat de ruptura dels vasos si s'exposa a un major estrès mecànic¹²¹, independentment de la mida del vas¹²². Hi ha tres tipus importants de l'arteriosclerosi^{7,123}:

- **Aterosclerosi**: engruiximent de la paret de les artèries de mida mitja i gran. Que pot afectar qualsevol artèria del cos¹²⁴, incloent artèries del cervell, del cor, de les cames, dels braços i dels ronyons. Com a resultat, depenent de les artèries afectades, es poden desenvolupar diferents malalties, com són la malaltia arterial coronària (MAC), l'accident cerebrovascular, la malaltia arterial perifèrica (MAP) i la malaltia renal crònica¹²⁴.

- **Arteriosclerosi calcificada “ de la mitja de Mönckeberg”**: les calcificacions es troben a la capa mitja de les artèries de petita i mitjana mida.

- **Arteriolo-sclerosi**: engruiximent de la paret en les petites artèries i arterioles.

6. ATEROSCLEROSI

L'aterosclerosi és el patró més freqüent i clínicament més important d'arteriosclerosi i es caracteritza per lesions de l'íntima¹²³ anomenades plaques ateromatoses que protueixen a la llum vascular.

L'aterosclerosi és una malaltia lenta, complexa i progressiva que s'inicia en la infància i normalment progressa durant tota la vida¹²⁵. Es troben lesions asimptomàtiques en la majoria dels individus de les societats occidentals al final de la segona dècada de vida, apareixen quan el vas sanguini està seriosament compromès, a partir del 70% d'obstrucció de la llum (denominada “estenosis crítica”), es produeix isquèmia simptomàtica en un context d'un augment de les necessitats, i una estenosis del 90% pot produir un flux sanguini inadequat fins i tot en repòs.

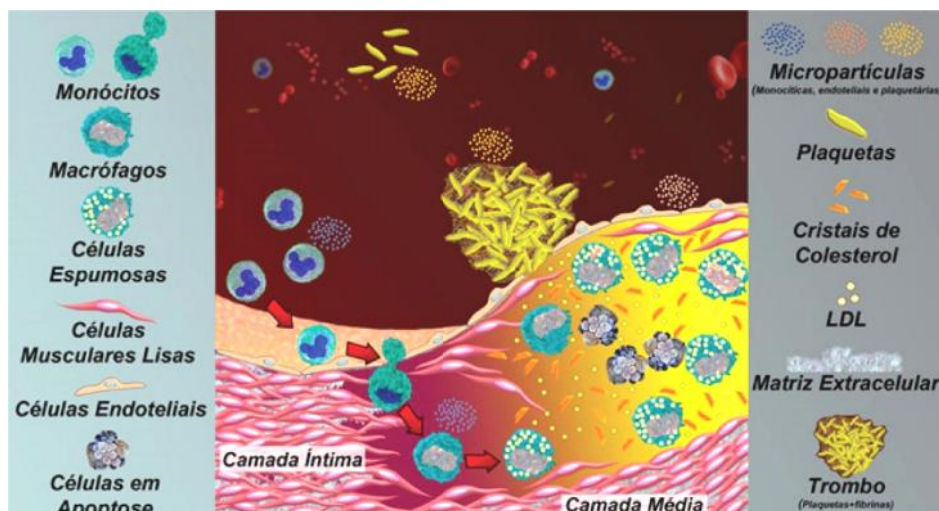


Fig. 8- Formació de l'ateroma. (Micropartícules como Possíveis Biomarcadores da Doença Cardiovascular Arq. Bras. Cardiol. vol.104 no.2 São Paulo Feb. 2015 Epub Jan 27, 2015 http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0066-782X2015000200011&script=sci_arttext&lng=pt)

L'aterosclerosi comença amb la interacció entre les cèl·lules endotelials i els leucòcits circulants, donant lloc al reclutament i l'activació dels limfòcits T i dels macròfags. Aquestes cèl·lules posteriorment estimulen la proliferació de les cèl·lules musculars lisas, amb l'acumulació de quantitats variables de matriu extracel·lular (MEC) al voltant del nucli ateromatós lipídic, tou, groc i pastós (fonamentalment constituït per colesterol i èsters de colesterol, greix, detritus cel·lulars, cèl·lules escumoses, fibrina i d'altres substàncies) coberta d'una capa fibrosa, ferma i blanquinosa (Figura 8) que a més d'obstruir el flux sanguini¹²⁶ debiliten la capa mitja subjacent i poden arribar a trencar-se, provocant trombosi vascular. En fases posteriors, es produeix la desestabilització de la placa arterioscleròtica per la secreció de metaloproteinasses.

Les plaques ateroscleròtiques poden patir canvis aguts súbits que agrujen la malaltia (Figura 9), degut a:

Ruptura, fissura o ulceració de las plaques, que exposa els components elevadament trombògens de la placa o membrana basal subendotelial.

Hemorràgia en el nucli de les plaques, amb expansió del volum de la placa i empitjorament de la oclusió luminal.

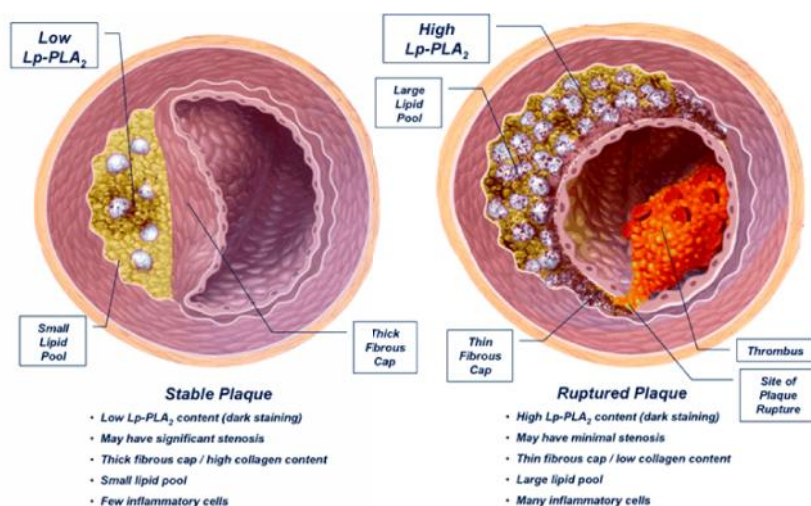


Fig. 9-Alteració d'una placa arterioscleròtica. (http://www.getfilings.com/sec-filings/100528/VAXGEN-INC_8-K_FORM2/c01918exv99w1.htm)

Les observacions clínicopatològiques indiquen que les plaques més vulnerables i les més trombogèniques són les més riques en lípids, fa que les plaques riques en col·lagen que són més dures i fibroses. Hi ha factors que faciliten la ruptura, com la presència de cèl·lules inflamatòries^{127,128} i l'alliberació de substàncies tòxiques i/o proteolítiques pels macròfags presents en la lesió¹²⁸. La ruptura de la capa fibrosa desencadena el procés trombòtic a l'exposar els fosfolípids, el factor tissular i les molècules d'adhesió de les plaquetes al torrent circulatori¹²⁹. L'evolució d'aquestes lesions poden desencadenar l'aparició de manifestacions clíniques com la malaltia cardiovascular (MCV) i MAP^{12,14}.

7. PATOGÈNIA DE L'ATEROSCLEROSI

Estudis amb teixits cel·lulars suggereixen diverses i possibles vies d'iniciació i progressió de la malaltia ateroscleròtica¹²¹ (Figura 10), tot i així, la principal evidència és el paper clau que desenvolupa l'endoteli induint la

inflamació, l'acumulació del LDL oxidades en l'espai subendotelial^{130,131}, el reclutament de monòcits i la formació de cèl·lules escumoses. La progressió de l'aterosclerosi s'inicia com a resposta a la disfunció endotelial i a la inflamació vascular, seguit per la progressiva acumulació de colesterol, calci i restes cel·lulars en l'íntima de la paret vascular de les artèries¹³².

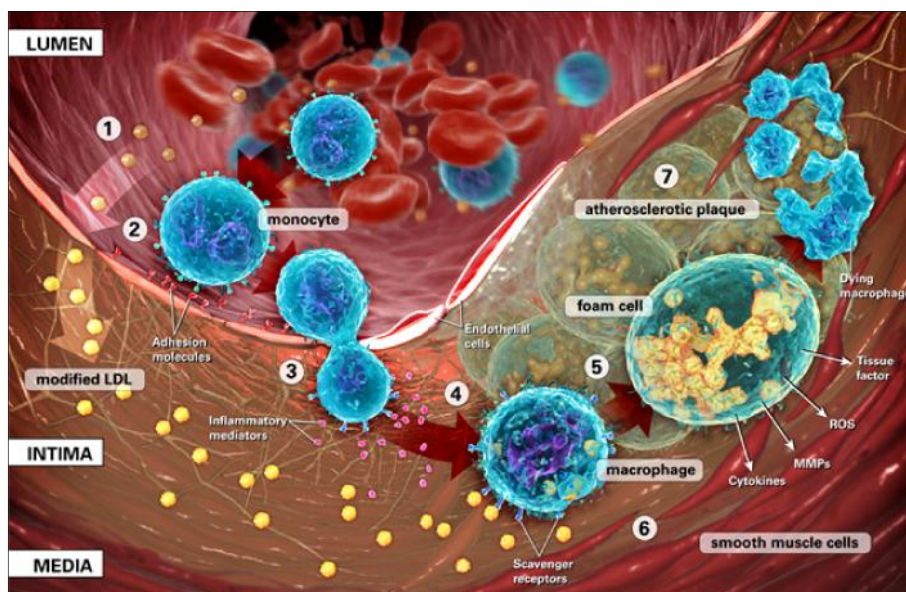


Fig.10- Aterogènesi de l'aterosclerosi. (IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidèmias e Prevenção da Aterosclerose,2007. <http://www.mmcuidadosintensivos.com.br/colesterol-e-aterosclerose/>)

Les primeres lesions consisteixen en la l'acumulació subendotelial de colesterol amb macròfags i la formació de cèl·lules escumoses, les cèl·lules endotelials actuen exercint un gran nombre de funcions en l'homeostasi de la paret vascular (regulació de la permeabilitat vascular i transport de molècules), que contribueixen al manteniment del to vascular regulant el balanç de molècules vasodilatadores i vasoconstrictores i proporcionen una superfície no adherent pels leucòcits circulants. L'activació i la disfunció endotelial, que apareix en el primer estadi de l'aterogènesi, és caracteritzada per l'augment de la permeabilitat vascular en lipoproteïnes, augment del reclutament de leucòcits, reducció de la producció d'òxid nítric i l'augment de la producció de vasoconstrictors, provocant un

desequilibri en l'homeòstasi de l'endoteli vascular. Entre els agents que mesuren l'efecte de reclutament de monòcits, trobem les molècules d'adhesió (selectines i integrines) i les molècules quimiotàctiques com la proteïna quimioatrant de monòcits-1 (MCP-1), el factor de necrosi tumoral alfa (TNF-) i la interleucina (IL-6), entre d'altres.

Les selectines (E i P-selectina) promouen una unió transitòria del monòcits a l'endoteli anomenada rolling, de manera que augmenta el temps de contacte i permet la unió amb la molècula d'adhesió intercel.lular-1 (ICAM-1) i la molècula d'adhesió vascular-1 (VCAM-1), l'augment de permeabilitat vascular dóna lloc a la penetració del subendoteli de les LDL circulants, les quals interaccionen amb els proteoglicans de la matriu subendotelial i n'afavoreix la retenció i els processos de modificació proteolítica i oxidativa, passant a ser altament aterogèniques. L'entrada de colesterol té lloc principalment pels *receptors scavenger* (CD36). Aquest procés dóna lloc a la formació de cèl.lules escumoses, que en posar-se en forma de capes estratificades a l'íntima arterial, es converteix en l'anomenada *estria grassa*, que representa la primera lesió detectable en el procés ateroscleròtic.

En els éssers humans, la lesió d'estria grassa es pot trobar a l'aorta desde la primera dècada de la vida, en les artèries coronàries en la segona dècada i en les artèries cerebrals en les dècades tercera i quarta. A causa de les diferències en la dinàmica del flux sanguini, existeixen regions que predisposen la formació d'aquestes.

Si el procés de proliferació continua, l'estria grassa pot evolucionar cap a una lesió més aguda o placa d'ateroma. Les plaques poden arribar a ser cada vegada més complexes amb calcificació, ulceració a la superfície luminal, i presència de lesions avançades poden produir símptomes d'isquèmia com a resultat d'una progressiva oclusió de la llum vascular, la complicació clínica més important és una ruptura de la placa ateromatosa i la formació d'un trombe o coàgul de sang, donant lloc a un accident agut.

7.1. EVOLUCIÓ ANATOMOPATOLÒGICA DE LA LESIÓ ATEROSCLERÒTICA

L'evolució de la lesió (Figura 11) des de els estadis inicials en els que es produeixen canvis detectats només microscòpicament fins a fases avançades en les que es produeix una alteració de la llum arterial¹³³.

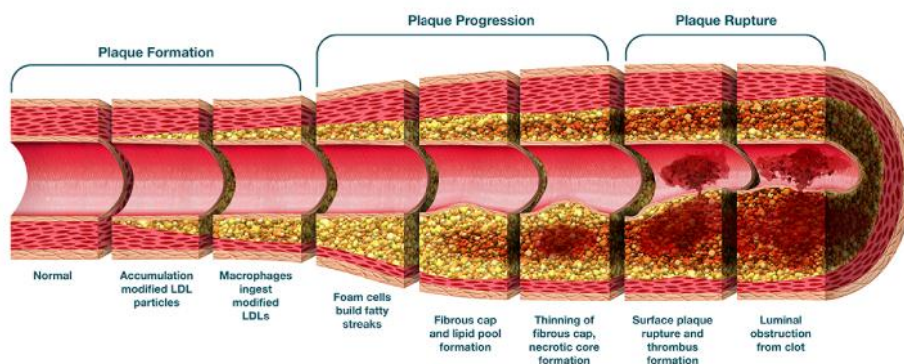


Fig. 11- L'evolució de la placa ateroscleròtica. (Illustration – Medical Posted on May 6, 2013 By).

Les fases inicials de l'aterosclerosi comencen en la capa íntima de la paret arterial, des de l'endoteli fins la capa mitja. La capa íntima es separa en dos nivells: el més pròxim a la llum vascular es compon principalment per proteoglicans, cèl·lules endotelials, macròfags i cèl·lules musculars llises. Una segona capa per baix d'aquesta composta per cèl·lules musculars llises i fibres elàstiques. Aquesta zona es separa per la capa mitja mitjançant una capa elàstica absent en bifurcacions, ramificacions o curvatures¹³⁴.

Des del punt de vista morfològic existeixen segments d'artèries amb engruïment de la capa íntima sense que aquesta perdi les seves característiques morfològiques, es considera una adaptació a canvis en el flux i pressió de la paret arterial i es donen en més freqüència en zones de ramificacions i orificis, amb una distribució irregular dins de la secció circular de l'artèria^{134,135}. En aquestes zones es produeix un major recanvi de cèl·lules endotelials i cèl·lules musculars llises, a

més a més d'acumulació de lipoproteïnes i altres macromolècules del plasma²². En aquestes localitzacions és on posteriorment, la majoria de vegades s'assentaran les lesions ateroscleròtiques, per la qual cosa l'engruiximent de la capa íntima suposaria l'estadi inicial de la lesió ateroscleròtica.

7.1.1. Lesions inicials, estria grassa i lesions intermèdies

Els tres estadis successius dins de les fases inicials de l'aterosclerosi són els següents:

Lesió tipus I o lesió inicial. Es caracteritzen un dipòsit de lípids a la capa íntima i amb una reacció cel·lular associada. Microscòpicament correspon a grups aïllats de macròfags amb lípids en els seu interior circumscrits a les zones més engruixides.

Lesió tipus II. Són les primeres detectables macroscòpicament i es descriuen com "estries grasses". Microscòpicament s'observen major nombre de cèl·lules escumoses organitzades en capes, amb lípids al seu interior i per fora, principalment èsters de colesterol¹³⁶. També s'observen cèl·lules musculars llises amb lípids en els seu interior i major quantitat de matriu extracel·lular, limfòcits i mastòcits.

Només una part d'aquestes lesions evolucionaran cap a l'estadi següent, creant un subtipus dins les lesions de tipus II, freqüentment en zones de major estrès per l'alteració en la direcció del flux sanguini sense que sigui necessari coexistir amb altes concentracions de colesterol de lipoproteïnes de baixa densitat (cLDL). Es creu que es degut a la pressió exercida en la paret vascular, aquests provoquen un major temps de contacte entre la superfície cel·lular i la sang, facilitant la internació de les lipoproteïnes a la capa íntima.

Lesions tipus III. Histològicament es caracteritzen per l'acumulació extracel·lular de lípids que conflueixen entre capes de cèl·lules musculars llises en zones de l'íntima. Els lípids extracel·lulars reemplacen el contingut de la matriu, confluint i desplaçant la resta dels elements cel·lulars donant lloc al seu acúmulo. La capa mitja adjacent a la lesió roman intacta.

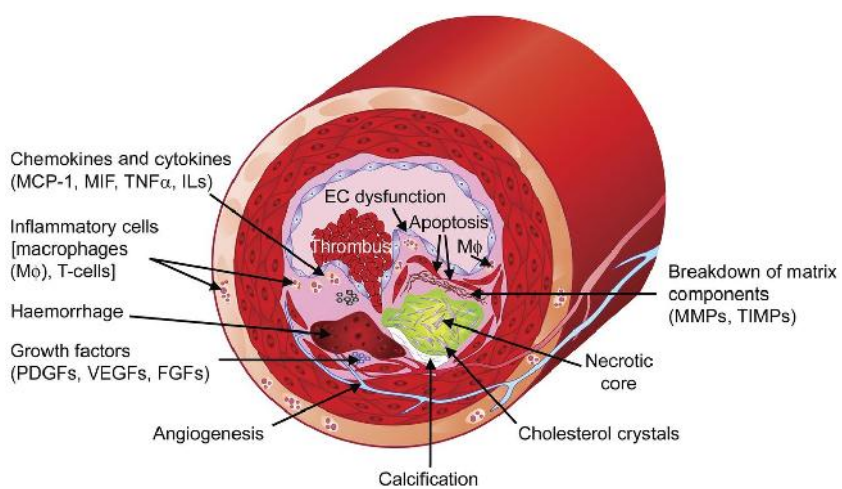
7.1.2. Lesions avançades

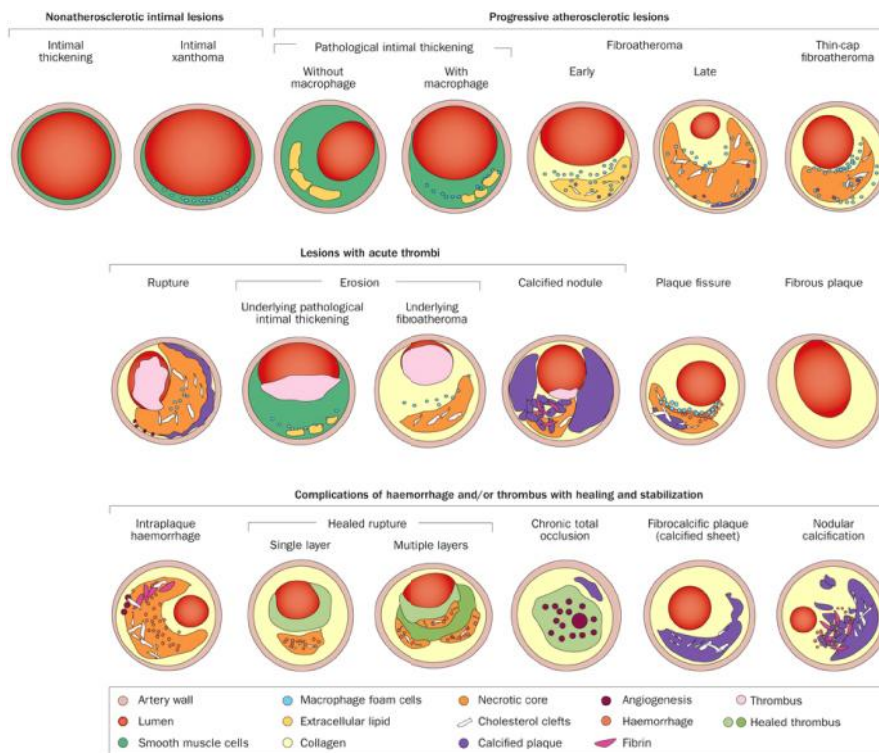
En aquestes lesions, l'acumulació del material extracel·lular, principalment lípids, provoca una important alteració en l'estructura de la capa íntima produint un engruïment i desorganització juntament amb la deformació de la paret arterial. A partir d'aquest estadi, els dipòsits extracel·lulars de lípids produeixen la deformació i ruptura de la íntima, i pot arribar a afectar a les capes mitja i adventícia, augmentant la probabilitat d'aquestes complicacions de manera sobtada per mecanismes trombòtics secundaris o a la ruptura de la placa¹³⁷.

Hi ha tres tipus de lesions avançades:

Lesió tipus IV. La confluència de petites gotes de lípids extracel·lulars i cèl·lules escumoses dins de l'íntima dona lloc a un nucli lipídic conegut com ateroma, és el resultat de l'afluència contínua de lipoproteïnes des del plasma¹³⁸. Els lípids augmenten visiblement en la capa íntima però sense produir la disminució del diàmetre en la llum arterial. La matriu extracel·lular es troba entre el core lipídic i la superfície endotelial, en el seu interior es concentren macròfags, limfòcits, mastòcits i cèl·lules musculars llises. Acostuma acompanyar-se de capil·lars que bordegen els límits de la lesió. La disminució de col·lagen i l'augment de macròfags faciliten la formació de fissures en aquesta zones, com a conseqüència es poden produir amb major complicacions aterotrombòtiques que donaran lloc a manifestacions clíniques per disminució del flux arterial¹⁹.

Lesió tipus V. La capa de matriu extracel·lular que rodeja el core lipídic es transforma amb una gruixuda capa de teixit fibrós formada principalment per col·lagen i cèl·lules musculars llises amb abundant expressió del reticle endoplasmàtic rugós que augmenta el gruix de la capa íntima (Fig.8). El gruix de la capa augmenta més quan engloba restes del trombe que s'han incorporat i reorganitzat en el seu interior. Als marges de la capa fibrosa apareixen capil·lars que solen ser majors i més nombrosos que en l'estadi tipus IV, juntament amb macròfags, limfòcits i cèl·lules plasmàtiques. Acostumen a acompanyar-se de microhemorràgies quedant-se les restes d'aquestes dins la pròpia lesió. Hi ha una important disminució de la llum vascular i alteracions en el flux sanguini donant lloc a majors complicacions^{19,137}.





Esquema. 1- Adaptació del calibre vascular en l'evolució de la lesió. (Pathophysiology of native coronary, vein graft, and in-stent atherosclerosis. Nature Reviews Cardiology (2015)

La ruptura de la placa ateromatosa és la complicació més freqüent de les lesions ateroescleròtiques. En estudis un 50% de les lesions causants d'esdeveniments isquèmics aguts no van mostrar estenosi significativa de la llum arterial en una primera angiografia per la qual cosa la complicació aguda de la placa, més que la estenosi de la llum, sembla ser el factor desencadenant del episodi clínic^{140,141}. Es considera que és la causa del 70% de tots els infarts aguts de miocardi (IAM) i morts sobtades¹⁴²

En els casos no relacionats amb la ruptura de la placa, el principal desencadenant d'un esdeveniment isquèmic agut és l'erosió de l'endoteli o la calcificació nodular donant lloc a fenòmens de trombosi i obstrucció de la llum arterial per l'activació de plaquetes a la superfície de la placa¹³⁹. En altres ocasions la dilatació del segment de la paret on hi ha la lesió produeix lesions aneurismàtiques. Cal tenir en compte que en un mateix subjecte coexisteixen lesions en diferents estadis evolutius.

8. RELACIÓ ENTRE L'ATEROSCLEROSI I LA INFLAMACIÓ

El concepte de la MC com un procés inflamatori¹⁴³, ha obert noves vies de recerca en el camp de la CI, estudis recents han suggerit que l'ús de marcadors inflamatoris ajuda a la identificació de pacients amb elevat risc CV^{120,121,143-145}.

La inflamació és la resposta de reparació del sistema immune als danys en les cèl·lules i teixits, ja sigui per patògens bacterians o un altre tipus d'agressió (física, química o biològica)¹⁴⁶, la seva funció és reduir o limitar l'àrea de la infecció, no obstant això, l'exposició de l'organisme a un estat amb inflamació prolongada, una inflamació crònica, produeix un efecte totalment oposat que pot arribar a destruir el teixit i/o determinar la pèrdua de funcionalitat de l'òrgan afectat. L'infiltrat de cèl·lules immunitàries típiques de la inflamació crònica, està compost per: macròfags, limfòcits i cèl·lules plasmàtiques, l'alliberació crònica de mediadors de la inflamació produirà: lesió del teixit, cicatrització i la possible pèrdua de funció del teixit, així com un augment de la morbiditat i la mortalitat a causa de la MCV¹⁴⁷.

L'aterosclerosi es considera una malaltia inflamatòria crònica intervinguda principalment per la infiltració de macròfags i cèl·lules T a la paret vascular, els macròfags participen en mecanismes que impliquen receptors de reconeixement de patrons i receptors scavenger mentre diversos subtipus de cèl·lules T responen a lípids o proteïnes antigens modificats per promoure cascades inflamatòries^{146,148}.

Recentment, hi ha estudis que ho demostren, com:

- les tècniques immunohistoquímiques, que permeten identificar els macròfags i limfòcits T en plaques d'aterosclerosi en necròpsies.
- el marcat d'anticossos monoclonals, que demostra l'existència d'un infiltrat cel·lular inflamatori en material ateromatós de pacients vius.
- diferents marcadors inflamatoris, en el context clínic de l'aterosclerosi, que es detecten en sang perifèrica.
- l'experimentació amb models animals indiquen que l'isquèmia desencadena l'expressió de citocines en la superfície de les cèl·lules inflamatòries, les quals: perpetuen la infiltració cel·lular, estan implicats en els processos de

síntesi i degradació del col·lagen, així com en l'angiogènesi, i agreuja la disfunció endotelial.

8.1. MECANISMES INFLAMATORIS DE L'ATEROESCLEROSI

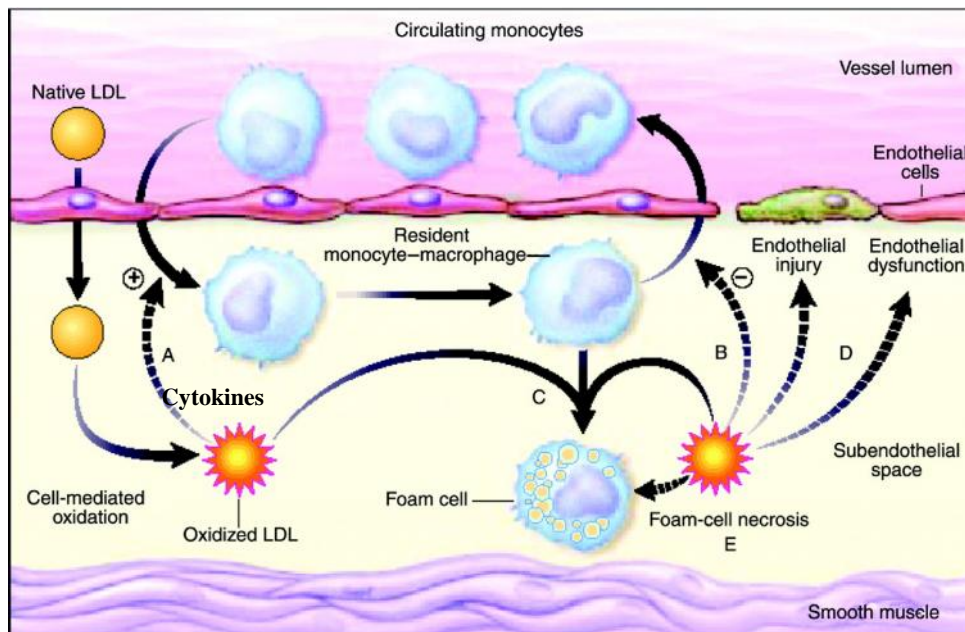
Actualment no es coneixen amb certesa, la naturalesa de l'estímul (probablement antigènic), mitjançant el qual, l'alliberació dels factors quimiotàctics, produeixen tota la "resposta inflamatòria cel·lular aterogènia".

Hi ha una possible implicació de bacteries i de virus com a factors desencadenants de la mateixa, però també pot ser que l'aterosclerosi tingui per si mateixa un component inflamatori, sense mediació d'un agent infeccios¹⁴⁹.

8.1.1. Disfunció de l'endoteli vascular

La disfunció de l'endoteli vascular és la primera alteració produïda com a resposta a una agressió exercida a la paret vascular¹⁵⁰. Diversos estudis han demostrat correlació entre disfunció endotelial i la presència de FRCV en persones sense evidència clínica de malaltia ateroscleròtica.

Com a primera conseqüència s'altera l'equilibri entre la producció d'agents vasodilatadors com òxid nítric¹⁵¹ i vasoconstrictors com l'endotelina i l'angiotensina II, les que cooperen en la iniciació, progressió i complicació de la lesió ateroscleròtica⁵. També s'ha demostrat l'activació focal de l'endoteli en les artèries de gran i mitjà calibre, secundària al augment de la concentració de colesterol en sang, iniciant la resposta inflamatòria a la paret arterial¹¹⁷. A partir de certes concentracions de cLDL augmenta la producció de VCAM-1 així com la adhesió a la superfície de l'endoteli de limfòcits i macròfags i la seva posterior migració al espai subendotelial (Figura 13).



probabilitat de que s'interioritzen dins de l'endoteli posant en marxa els mecanismes desencadenants de la resposta inflamatòria.

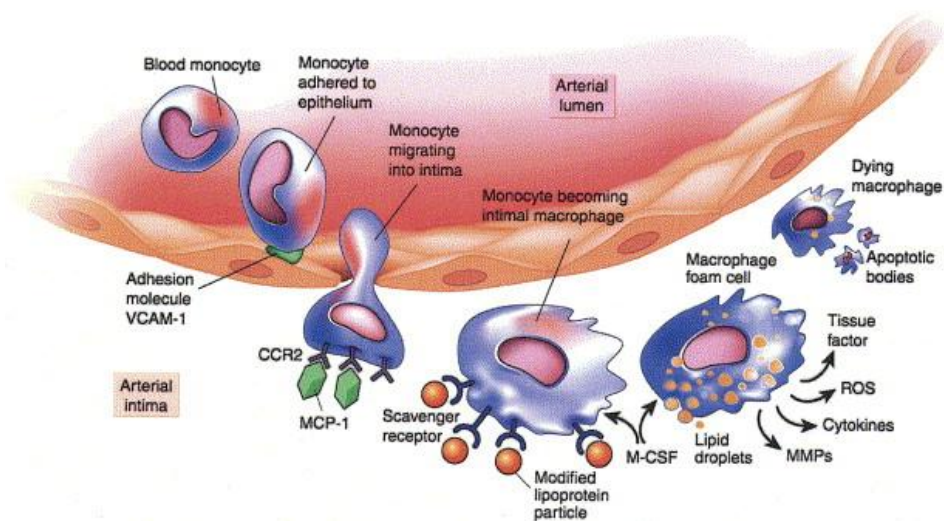
La resposta de les cèl·lules a l'acció de diferents FRCV es tradueix també amb una major capacitat d'adhesió i permeabilitat de leucocits i plaquetes a la capa endotelial que adquireix capacitat procoagulant a la vegada que estimulen la producció de citocines, aquestes molècules i altres substàncies vasoactives i proinflamatòries atrauran cap a la lesió macròfags i limfòcits T provinents del torrent circulatori.

Les molècules de LDL en l'endoteli exerceixen una acció quimiotàctica sobre monòcits i augmenta l'expressió de gens activadors del creixement de colònies de macròfags (CMGF) la qual cosa suposa un fenomen decisiu en l'evolució de la lesió ateroscleròtica. Els macròfags activats alliberen mediadors de la inflamació com uroquinasa i interleucina 1 (IL-1) facilitant l'entrada de monòcits i l'adhesió de les molècules de LDL a les cèl·lules endotelials.

En una etapa posterior es produeix la migració de les cèl·lules musculars llises de la capa més profunda de la íntima i de macròfags i limfòcits T del torrent sanguini a l'espai subendotelial. El monòcits es transformen en macròfags que capten i fagociten les lipoproteïnes dipositades en l'espai subendotelial a través de receptors de membrana anomenats scavenger receptor (SR), l'activació d'aquestes cèl·lules es segueix amb la alliberació d'enzimes hidrolítiques, citocines, quimiocines i factors de creixement que amplifiquen la resposta inflamatòria arribant a produir-se necrosi focal en algunes zones, tenint en compte que la repetició cíclica d'aquests fenòmens s'acompanya d'acumulació de cèl·lules mononucleades i de la formació de teixit fibrós que provoquen el creixement i reorganització de la lesió i com a resultat final es forma una capa fibrosa que cobreix un nucli de lípids extracel·lulars i teixit necròtic⁵.

8.1.3. Monòcits, macròfags, cèl·lules musculars llises i immunitat.

Els monòcits, àmpliament distribuïts en els teixits humans i precursors dels macròfags que estan presents en totes les fases del procés ateroscleròtic¹⁵⁴ (Figura 14), augmenten l'expressió dels receptors inespecífics del sistema immune



IL-1 β que actua com a mesurador de la inflamació i es produïda pels macròfags, IL-2, secretada pels limfòcits o IL-8 produïda també pels macròfags, amb potent acció quimiotàctica i angiogènica. Dins de les famílies de les quimiocines CXC la CXCL3 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 3) contola la migració i adhesió dels macròfags. Per contra, l'acció del interferó- γ activa la mort programada dels macròfags, quan passa això, les restes cel·lulars apareixen dins dels nuclis necròtics característics de les lesions ateroscleròtiques avançades.

S'ha comprovat la gran importància de les cèl·lules musculars llises i dels limfòcits T en la progressió de la lesió ateroscleròtica¹⁵⁵ i la seva gran capacitat per a produir citocines com el factor de necrosis tumoral- (TNF-) i IL-1, enzimes proteolítiques, particularment metaloproteinases i factors de creixement com el factor de creixement insulin-like (ILGF) és crítica en la seva capacitat de reparar teixits. A la vegada els macròfags activats presenten antígens als limfòcits T mitjançant antígens d'histocompatibilitat tipus II, una de les molècules que actua com antígen és LDLox.

8.1.4. Plaquetes

L'activació de les plaquetes és un dels fenòmens determinants en l'iniciació i progressió de les lesions ateroscleròtiques¹⁸, s'adhereixen a l'endoteli disfuncionant així com el col·lagen exposat en les lesions i als macròfags, una vegada activades alliberen granulòcits que contenen citocines i factors de creixement que juntament en la trombina poden contribuir a la migració i proliferació de les cèl·lules musculars llises i limfòcits¹⁹, a més, les plaquetes són una de les principals fonts d'òxid nítric, per la qual cosa la seva disfunció altera la homeòstasi de la paret vascular.

En quant a la resposta vasomotora, l'estimulació de les plaquetes porta a la formació d'àcid araquidònic que a la vegada pot transformar-se en tromboxà A2, una de les substàncies vasoconstrictores i proagregants més potents que es coneixen, o bé amb leucotriens que amplifiquen la resposta inflamatòria, per tant, en lesions avançades les plaquetes exerceixen una important funció protectora mantenint l'integritat de la paret arterial i protegint-la davant d'hemorràgies espontànies.

8.1.5. Fisura de la placa arterioscleròtica

En el trencament d'una placa d'ateroma intervenen diversos factors, com la seva pròpia composició, l'estrès mecànic que pateix la seva paret i la presència de fenòmens inflamatoris actius.

Generalment les plaques «toves», amb un important nucli lipídic i una càpsula prima i poc fibrosa, són més susceptibles de trencament, mentre que les plaques fibroses, amb un important recobriment capsular i fins i tot calcificades, són més estables i menys vulnerables. Aquestes últimes coincideixen amb freqüència amb les plaques més evolucionades i obstructives, i les primeres amb plaques joves poc obstructives, de manera que el dramàtic esdeveniment que suposa un IM per trencament de placa d'ateroma es dona sovint en individus que prèviament no presentaven cap símptoma coronari.

L'estrès mecànic a què estan sotmeses les diferents regions de la placa d'ateroma és diferent, el que fa que el trencament es produeixi habitualment allà on és més gran, que és la zona d'unió entre placa i artèria indemne. Aquesta tensió ve condicionada en part pel moviment continu de torsió i estirament a què estan sotmeses les artèries.

Els fenòmens inflamatoris actius es tradueixen en l'acumulació, a les zones de trencament, de cèl·lules inflamatòries que segreguen diverses enzimes conegudes com metaloproteinases de matriu extracel·lular (metaloproteinasa 3 o estromelisina i metaloproteinasa 9 o gelatinasa B), que degraden la matriu extracel·lular i el col·lagen en plaques ateroscleròtiques¹⁵⁶, debilitant la càpsula de la placa. Dins del component inflamatori del casc fibrós de la placa d'ateroma, hi ha factors que afavoreixen el col·lagen i altres que l'inhibeixen:

-) Les citocines i els factors de creixement, com: TGF-beta o factor beta transformador del creixement i PDGF, afavoreixen la síntesi de col·lagen.

-) El INF-gamma (només el fan els limfòcits T activats), altera la síntesi de col·lagen en les cèl·lules musculars llises i inhibeix la seva proliferació^{157,158}.

El procés inflamatori crònic, implica un increment en la producció d'INF-gamma, disminuint la síntesi i reparació de col·lagen¹⁵⁹. Això canviarà el balanç normal entre la síntesi i degradació dels components de la matriu, debilitant el casc fibrós en les plaques vulnerables, trencant-les i desencadenant esdeveniments trombòtics.

Així, mentre les cèl·lules musculars llises afavoreixen la síntesi de col·lagen i estableixen la lesió, els macròfags alliberen enzimes proteolítiques, augmentant la degradació del col·lagen tissular, debilitant la càpsula fibrosa de la placa, ajudant al seu trencament amb complicacions de la mateixa (Figura 15).

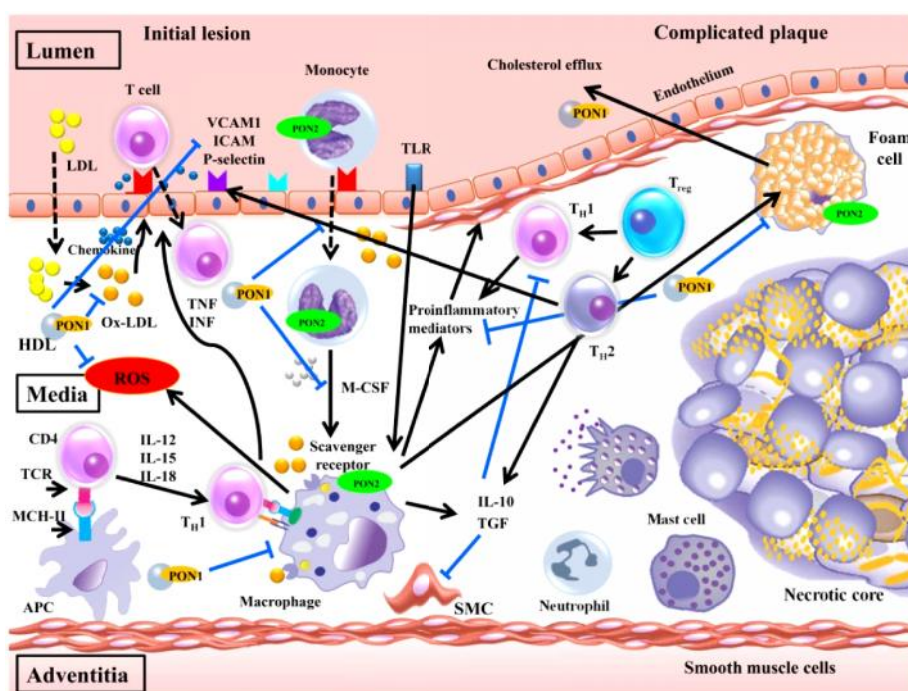


Fig.15- Representació esquemàtica de la progressió de la placa ateroscleròtica des de l'estadi inicial de la disfunció endotelial fins a un estadi avançat amb la presència d'una placa complicada i la ruptura de la mateixa. (<http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-11-92>)
M-CSF = Factor de estimulació de la colònia de Macròfags). MCP-1 = Proteïna quimioatracent de monòcits. MMP = Metaloproteinases. PAI-1 = Inhibidor de l'activador del plasminogen 1
PDGF = Factor de creixement derivat de plaquetes. TF = Factor Tissular (III). UPA= Activador del plasminogen tipus uroquinasa

8.1.6. Inflamació i trombosi

La inflamació i la trombosi són reaccions en cadena en què intervenen bon nombre de proteïnes (les cascades de la inflamació i la coagulació), l'activitat biològica pot presentar diferències individuals si els gens que les codifiquen són polimòrfics, és a dir, tenen dos o més variants (o al·lels), el gen normal i el minusvàlid resultant de la mutació. Les diferències d'activitat podrien determinar la susceptibilitat individual a patir problemes trombòtics o inflamatoris.

Els polimorfismes són mutacions subtils en la seqüència de l'ADN, caracteritzades gairebé sempre per la substitució d'un simple nucleòtid entre els milers que componen la cadena ("single nucleotide Polymorphisms" o SNP). Poden ser causa d'alteracions funcionals mínimes, recognoscibles per petites diferències en la concentració plasmàtica de les proteïnes, o en l'activitat de certs receptors (fenotip intermedi), però que no arriben a tenir entitat suficient per provocar una malaltia (fenotip clínic), tot i que poden facilitar la seva aparició si es sumen diversos polimorfismes desfavorables (malaltia poligènica). A diferència de les rares mutacions mendelianes, en què un sol gen pot ser causa d'una malaltia (malaltia monogènica), són relativament comuns (per definició ocorren en més de l'1% de la població).

Després del descobriment fonamental dels SNP, els avenços en les tècniques de seqüenciació han facilitat la detecció de cert nombre de polimorfismes (dimorfismes) relacionats amb la inflamació i la trombosi arterial (taula 2), la repercussió funcional es sustenta en estudis epidemiològics d'associació genotip/fenotip. El model clínic més assequible i millor analitzat ha estat l'aterosclerosi, on aquests dos processos exerceixen un paper fisiopatogènic decisiu.

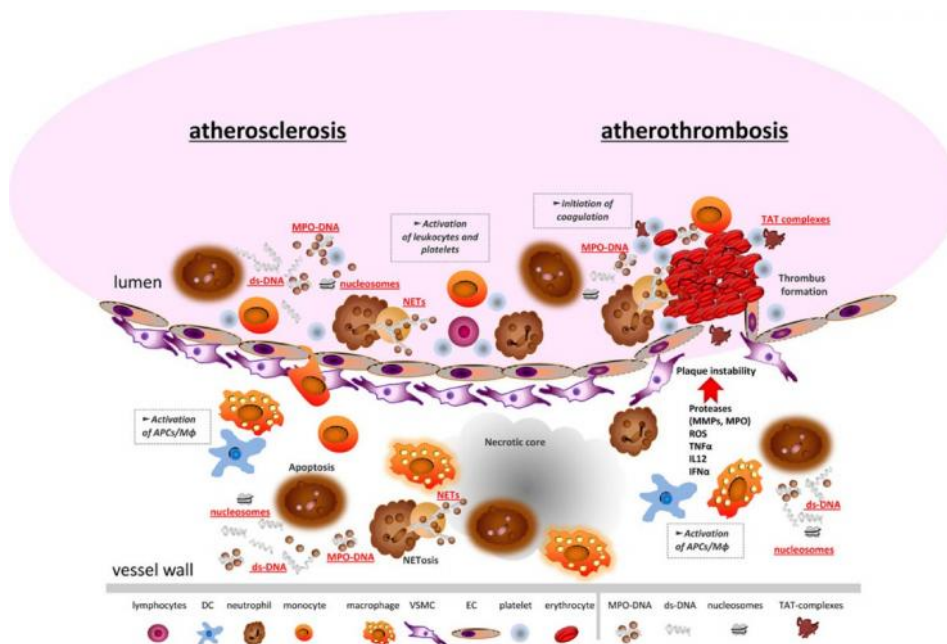
Tabla 1. Polimorfismos relacionados con la trombosis arterial y la inflamación (factores de riesgo de aterotrombosis)

Genes	Polimorfismos (alelos de riesgo)	Frecuencia genotipo (%)		Fenotipo intermedio	Interacción con factores ambientales
		Heterocigoto (%)	Homocigoto (%)		
Trombosis					
FGN (fibrinógeno-β)	G/A -455 (HaeIII H1/H2) C/T -148	20-30	4	↑ FGN Estructura coágulo	Tabaco
Factor XIII	Val34Leu			Estructura coágulo	
Factor VII	R353Q (Arg/Gln 353) S*F7 R (A1-A2)	25-34 25	3,8-4,5	↓ FVIIa	
PAI-1	4G/5G (-675)	48	21	↓ PAI-1	Triglicéridos, resistencia Insulina, obesidad
GP IIb/IIIa	GP IIIa P1 ^{A1} /P1 ^{A2}	12	4	↑ Agregación pl.	
GP Ib (Kozak)	T/C-5			↑ Agregación pl.	
Inflamación					
TLR 4	Asp 299 Gly			↓ Proteínas inflamatorias	
IL-1β	C/T-511	87	(CC 13)		
IL-6	G/C -174	40		↓ IL-6, ↑ FGN	Chlamydia. Tabaco
R. quemocinas	CCR5	-	-		
Receptor CD14 monocitos	C/T-260	55	15		

Taula 2.- Polimorfismes relacionats amb la trombosi arterial i la inflamació (factors de risc aterotrombòtics). (<http://www.elsevier.es/es-revista-haematologica-49-articulo-inflamacion-trombosis-del-laboratorio-clinica-13053701>)

Diversos mecanismes recíprocs¹⁶⁰ (Figura 16) vinculen la inflamació i la trombosi:

- El TNF produeix substàncies procoagulants.
 - Factor Von Willebrand.
 - Factor tissular.
 - Inhibidor 1 i 2 de l'activador del plasminogen¹⁶¹.
- Fibrinogen¹⁶²⁻¹⁶⁷.
 - Desorganitza i afavoreix la migració de les cèl·lules endotelials.
 - Altera la permeabilitat vascular¹⁶³.
 - Estimula la proliferació de cèl·lules de musculars llises¹⁶⁴.
- La IL-1 estimula la producció de PAI-1 en cèl·lules endotelials^{136,168-173}.
- La IL-4 indueix la producció de t-PA en monòcits^{170,171}.
- la Lp (a) que per la seva estructura similar al fibrinogen s'uneix a la fibrina reduint l'eficàcia catalitzadora de t-Pa.



9. LES CITOCINES

Les citocines són un grup de proteïnes o glicoproteïnes, generalment glicosilades, de baix pes molecular (30kDa) secretades fonamentalment per monòcits i limfòcits T, produïdes durant les respostes immunes naturals i específiques. S'uneixen a receptors específics de la membrana de les cèl·lules on exerceixen la seva funció iniciant una cascada de transducció de senyal que altera el patró d'expressió gènica, de manera que aquestes cèl·lules diana produeixen una determinada resposta biològica. S'agrupen en diverses classes: interleucines (IL), factors de necrosi tumoral (TNF), interferons (IFN), factors estimulants de colònies (CSF), factors de creixement transformant (TGF) i quimiocines.

Són especialment importants per a la regulació de les respostes inflammatòries i immunes, i tenen funcions crucials en el control de la immunitat tant innata com adaptativa. En la immunitat adaptativa són importants les cèl·lules auxiliars-T (Th), que han estat classificades sobre la base del patró de citocines que poden secretar, donant com a resultat o bé una resposta immune mediada per cèl·lules Th1 associat IL-2 i IFN- γ , o una resposta immune humoral Th2, associat amb IL-4, IL-5, IL-10, i IL-13.

Les citocines es classifiquen d'acord a l'homologia estructural dels seus receptors, de classe I o classe II ^{174,175} (Taula 3). La majoria d'interleucines, MCA, i IFNs pertanyen a una d'aquestes dues classes de citocines, que actüen a través dels transductors i activadors de transcripció via JAK-STAT. Altres tres principals famílies de citocines abasten la família IL-1 (incloent IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, i IL-18), la família TNF i la superfamília TGF- β . Algunes de la família IL-1 i TNF activen el factor nuclear-kB (NF-kB) i la proteïna activada per mitogen (MAP) de les vies de senyalització de la quinasa, mentre que els membres de la superfamília TGF-beta activen les proteïnes de senyalització de la família Smad .

Grups de les principals citocines	
Nom del grup	Principals components
Interleucines	IL-1 a 18
Interferons	IFN-alfa, beta i gamma
Factors de necrosi tumoral	TNF-alfa, beta
Quimiocines	Limfotactina MCP-1 IL-8 RANTES Proteïna inflamatòria macrofàgica 1 alfa
Factors estimulants de la formació de colònies (CSF)	CSF per a granulòcits, macròfags
Factors de Creixement (GF)	Fibroblàstic Derivat de plaquetes Epidèrmic Insulin-like Transformador Eritropoetina

Taula 3-Principals citocines. <http://www.cardioaragon.com/doc.php?op=revista3&id=43&id2=7>. Modificada de Sheldon J. Riches P. inflammatory cytokines. J. Cardiovasc Risk Factors

La superfamília TGF- es compon de moltes citocines multifuncionals incloent TGF- 1-2-3, activines, inhibines, hormona anti-mülleriana (AMH), proteïnes morfogenètiques òssies (BMP) i la miostatina¹⁷⁶. Algunes de la família TGF- es secreten en forma de complexos inactius units al pèptid associat a la latència (LAP), una proteïna derivada de la regió NH₂-terminal del producte del gen TGF- . El LAP forma enllaços covalents amb les proteïnes latents d'unió a TGF - (LTBPs), de la qual existeixen proteïnes d'alt pes molecular amb quatre

isoformes diferents¹⁷⁷. Els grans complexos latents resultants són segrestats dins de la matriu extracel·lular, on les proteases poden digerir LTBP, dissociant LAP de TGF- β .

Poden actuar com a (Taula 4):

- Mediadores de la resposta immune innata (inflamació, quimiotaxis, activació de macròfags, cèl·lules NK) i adquirida (humoral i cel·lular).
- Reguladores de l'activació, proliferació i diferenciació dels limfòcits.
- Estimuladores del creixement dels precursors hematopoètics.

Amb acció:

- Autocrina, unint-se a la mateixa cèl·lula que les secreta.
- Paracrina, actuant sobre la cèl·lula veïna.
- Endocrina, unint-se a cèl·lules distants.

La regulació de l'acció de les citocines es garanteix per mecanismes de:

- Regulació de l'expressió dels receptors.
- Necessitat d'interacció cèl·lula a cèl·lula.
- Duració breu de producció (mentre dura l'estímul) i curta vida mitja de les citocines en sang i fluïts. Els seus corresponents ARNm tenen una curta vida mitja, i depenen de que les zones 3' no traduïbles siguin riques en A i U.
- Unió de proteïnes específiques al receptor.
- Acció de citocines antagoniques.

Les qualitats de les citocines són:

Pleiotropia, múltiples efectes a l'actuar sobre diferents cèl·lules.

Redundància, diverses citocines poden exercir el mateix efecte.

Sinergisme, dos o més citocines produeixen un efecte que es potència mútuament.

Antagonisme, inhibició o bloqueig mutu dels efectes.

Citocines inflammatòries: cèl·lules productores i principals funcions biològiques		
Citocines	cèl·lules productores	Principals funcions biològiques
IL-1	Monòcits i macròfags Neutròfils limfòcits T i B Fibroblasts cèl·lules muscular llises cèl·lules endotelials	Estimula la proliferació de limfòcits T i B Augmenta l'expressió del receptor IL-2 Activa les cèl·lules NK Activa les cèl·lules endotelials Indueix respostes de fase aguda Actua com a pirogen endogen Té gran varietat d'efectes sobre el sistema nerviós central i el sistema endocrí
IL-4	Limfòcits T (Th2) Eosinòfils Basòfils	Modulació de les funcions dels macròfags Diferenciació de les cèl·lules T Inducció de la producció de IgE Regulació de l'adhesió endotelial Inhibició de la producció de TNF-gamma, IL-1B, IL-6, ICAM-1 i NO
IL-6	Monòcits Neutròfils Eosinòfils limfòcits T i B Fibroblasts Hepatòcits cèl·lules endotelials	Indueix el cicle de la cèl·lules progenitores primitives hematopoètiques Estimula la maduració de megacariòcits i la producció de plaquetes Estimula el creixement i

		<p>maduració de limfòcits</p> <p>Estimula la producció hepàtica de proteïnes de fase aguda</p> <p>Actua com pirogen endogen</p>
IL-10	<p>limfòcits T i B</p> <p>Macròfags</p>	<p>Suprimeix l'activitat funcional dels macròfags</p> <p>Inhibeix la producció de citocines pro inflamatòries pels monòcits i els macròfags</p> <p>Augmenta la proliferació de limfòcits B i la secreció d'immunoglobulines</p>
TNF alfa	<p>Macròfags i monòcits</p> <p>limfòcits T i B</p> <p>Neutròfils</p> <p>cèl·lules endotelials</p>	<p>Modula l'expressió gènica de diversos factors de creixement, citocines, factors de transcripció i receptors de superfície cel·lular</p> <p>Modula les defenses de l'hoste</p> <p>Modula el creixement tumoral</p> <p>Estimula la producció hepàtica de proteïnes de fase aguda</p> <p>Pirogen endogen</p>
INF-gamma	<p>cèl·lules NK</p> <p>cèl·lules T-CD8+ i CD4+ (subgrups T2 1 i T2 0)</p>	<p>INF-gamma i INF-beta tenen propietats antivirals</p> <p>Propietats antiproliferatives en moltes línies cel·lulars transformades i neoplàsiques</p> <p>Potent estimulador de les cèl·lules TNK i citocines</p> <p>Regula l'activitat funcional de monòcits i macròfags</p> <p>Regulació de la immunitat humoral a través de les cèl·lules CD4T, influint en la</p>

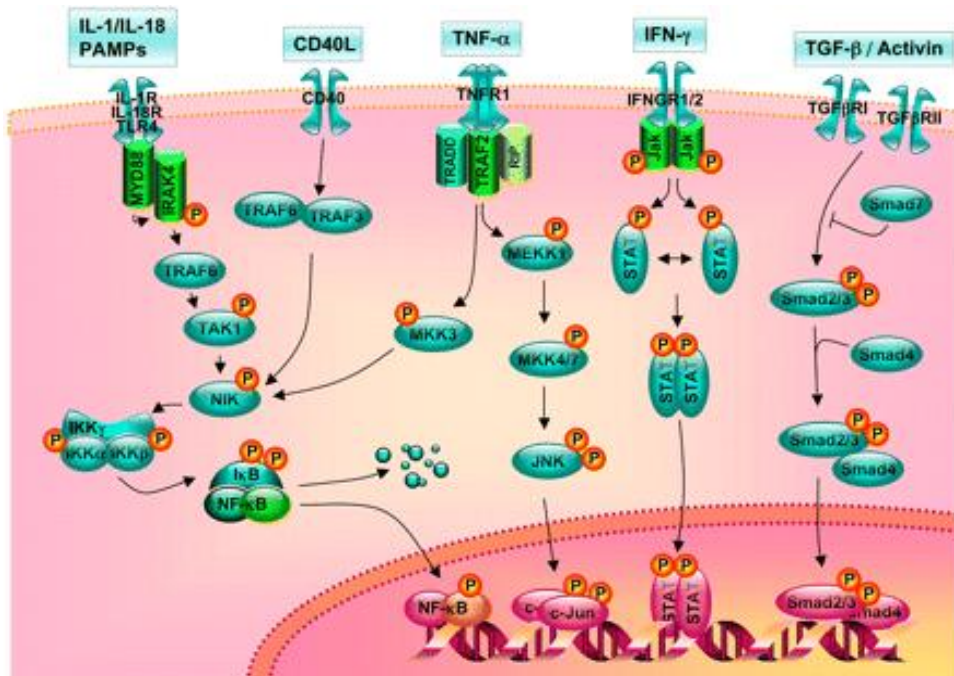
		producció d'Ig per les cèl·lules B Regulació de la producció de diversos components del complement i d'algunes proteïnes de la fase aguda directa o indirectament Regulació de la síntesi i activitat d'altres citocines (IL-1, IL-2 i TNF) Permet que l'endoteli pugui presentar antígens
--	--	---

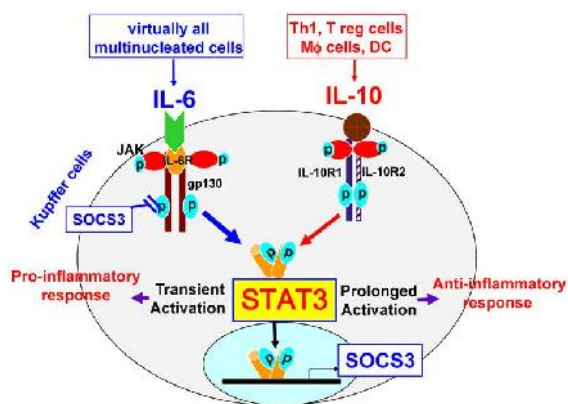
Taula 4- Citocines inflamatòries. (<http://www.cardioaragon.com/doc.php?op=revista3&id=43&id2=> 7. Modificada de Sheldon J. Riches P. inflammatory cytokines. J. Cardiovasc Risk Factors)

9.1. CITOCINES ASSOCIADES A LES VIES DE SENYALITZACIÓ EN L'ATEROSCLEROSI

9.1.1. Factor nuclear kB (NF- B)

La ruta de NF-kappa B és una de les principals vies de senyalització activades en resposta a citocines proinflamatòries, incloent TNF- , IL-1 i IL-18 (Figura 17), així com després de l'activació dels receptors de tipus Toll (TLR) pel reconeixement de patrons moleculars associats a patògens (PAMPs). L'activació d'aquesta via té un paper central en la inflamació a través de la regulació dels gens que codifiquen les citocines pro-inflamatòries, molècules d'adhesió, quimiocines, factors de creixement i enzims induïbles com ara la ciclooxigenasa-2 (COX2) i l'òxid nítric sintasa induïble (iNOS)¹⁷⁸.





9.2. L'EXPRESSION D' LES CITOCINES EN LES PLAQUES ATEROSCLERÒTIQUES

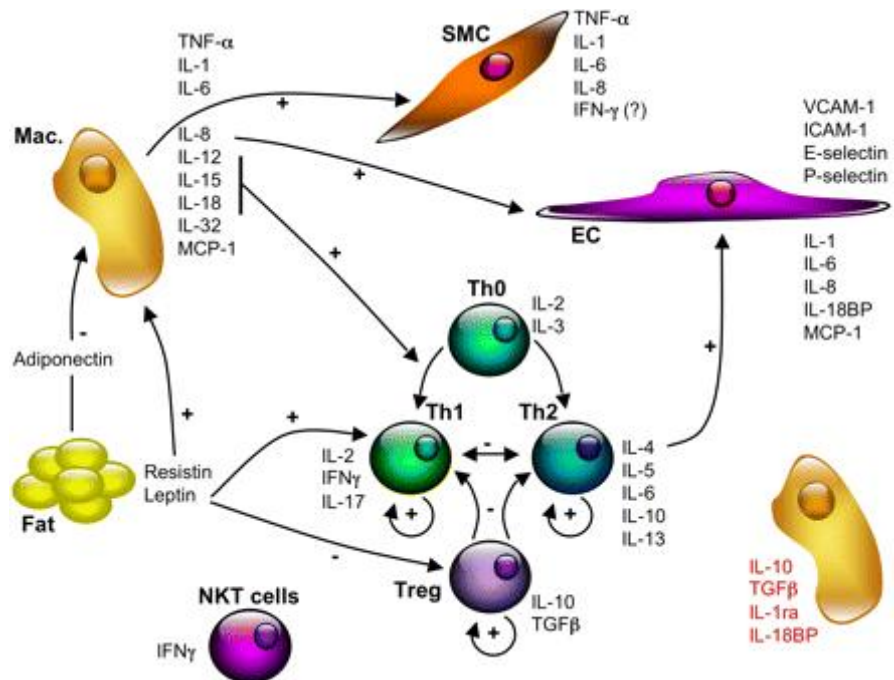
Alguns estudis van determinar el perfil d'expressió de citocines Th1 i Th2 en les plaques ateroscleròtiques avançades: la IL-2 era present en el 50% de les plaques, i es va detectar IFN- en algunes però no totes les plaques IL-2-positives. Pel contrari, l'expressió d'IL-4 i IL-5, citocines Th2, i TNF- (linfotoxina-), era molt escassa, i la IL-10 no es va detectar en absolut. No obstant això altres estudis han trobat que l'IL-10 es produeix en les lesions ateroscleròtiques i es correlaciona amb la disminució de l'expressió de mediadors inflamatoris¹⁸². TGF- s'expressa abundantment en totes les plaques¹⁸³. L'equilibri entre les citocines proinflamatòries i antiinflamatòries és decisiva per al desenvolupament de l'aterosclerosi i la seva progressió^{184,185}.

9.3. FONTS CEL·LULARS DE LES CITOCINES

9.3.1. Cèl·lules vasculars

Les citocines són produïdes per diversos tipus de cèl·lules, incloent les cèl·lules inflamatòries, vasculars i adipòcits. IL-12 i IL-18 produïdes pels macròfags són potents inductors d'IFN- i promouen la diferenciació de cèl·lules T verges en cèl·lules Th1 proaterogèniques. Tant els macròfags com les citocines derivades de macròfags també activen les cèl·lules del múscul llis (SMC) i cèl·lules endotelials (CE) per a produir una gran varietat de mediadors proinflamatoris. D'altra banda, les citocines antiinflamatòries IL-10 i TGF-beta, també produïdes pels macròfags, promouen la diferenciació de cèl·lules Treg antiaterogèniques. Altres mediadors antiinflamatoris amb propietats antiaterogèniques importants inclouen el receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra) i la proteïna d'unió a IL-18 (IL-18BP).

Curiosament, IL-4, el prototip de les cèl·lules Th2, té propietats proinflamatòries a les cèl·lules endotelials. Els adipòcits produeixen dos mediadors pro i antiinflamatoris (Figura 20).



Hi ha receptors de quimiocines associats a subpoblacions de cèl·lules Th. CCR5 i, en menor grau CXCR3, es troben preferentment en les cèl·lules Th1, mentre que CCR4 es troba preferentment sobre cèl·lules Th2¹⁸⁷. I CCR4 i CCR8 s'expressen específicament per les cèl·lules CD4 + CD25 + Treg¹⁸⁸.

9.3.3. Plaquetes

Les plaquetes tenen accions antiinflamatòries i són una font rica de quimiocines, citocines i factors de creixement que poden participar en l'aterosclerosi.

A partir dels seus alfa-grànuls, les plaquetes secreten quimiocines CXC, com ara el factor plaquetari 4 (PF4 / CXCL4) el pèptid epitelial activador de neutròfils (ENA-78 / CXCL5), així com quimiocines CC, com ara MIP-1 o RANTES. La deposició i la immobilització de RANTES derivats de plaquetes desencadenen un major reclutament de monòcits a l'endoteli activat. Les plaquetes activades poden lliurar RANTES i PF4 al revestiment endotelial de les lesions ateroscleròtiques, així com a la superfície dels monòcits a través d'un mecanisme que implica la plaqueta P-selectina¹⁸⁹.

9.3.4. Mastòcits

Els mastòcits són cèl·lules inflamatòries presents a la paret arterial que formen part de l'infiltrat de cèl·lules inflamatòries i poden contribuir a l'aterosclerosi¹⁹⁰. Els mastòcits poden ser una font addicional de citocines inflamatòries dins de la placa, ja que són capaços de produir grans quantitats de TNF-¹⁹¹.

9.4. EFECTES BIOLÒGICS DE LES CITOCINES

9.4.1. Efectes sobre la permeabilitat endotelial

L'alteració de la permeabilitat endotelial és una característica important durant la inflamació i s'associa amb la migració de leucòcits i l'acumulació transendotelial dins dels teixits. El complex d'unió intercel·lular i les seves interaccions amb el citoesquelet són importants per al manteniment de la permeabilitat endotelial¹⁹². Una sèrie de citocines proinflamatòries, com ara TNF- α i IFN- γ , altera la distribució dels receptors d'adhesió implicats en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula, donant lloc a la pèrdua de la permeabilitat endotelial i afavorint la transmigració de leucòcits¹⁹³.

9.4.2. Activació de molècules d'adhesió i l'expressió de quimiocines

Les citocines indueixen l'expressió d'ELAM i VCAM-1. Moltes citocines, IL-1, TNF- α , i IFN- γ estan implicades en la inducció d'una sèrie de molècules i quimiocines a la paret vascular. IL-1 i TNF- α estimulen l'expressió a la membrana de molècules d'adhesió leucocitàries com ara ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, E-selectina i P-selectina. Aquestes molècules interactuen amb lligands específics expressats pels neutròfils, limfòcits i monòcits circulants. VCAM-1 juga un paper important en l'aterogènesi¹⁹⁴. Promou selectivament l'adhesió de cèl·lules mononuclears en l'endoteli vascular que constitutivament expressen VLA-4. VCAM-1 està present en les lesions ateroscleròtiques coronàries avançades, però s'expressa principalment i és més prevalent en l'íntima i en els microvasos¹⁹⁵. Les citocines juguen també un paper important en la inducció de quimiocines per les cèl·lules vasculares, en particular, IL-8 i MCP-1, que estan implicades en l'adhesió de monòcits i la migració a la paret del vas inflammat en l'aterosclerosi. Aquestes quimiocines s'expressen en les plaques ateroscleròtiques i poden tenir un paper important en la infiltració de limfòcits T i l'activació en l'aterosclerosi.

9.4.3. Modulació de l'expressió del receptor scavenger(RS) i el metabolisme dels lípids

Les citocines proinflamatòries tenen efectes sobre l'expressió dels diferents receptors scavenger (RS). El receptor de Lectina oxidada LDL (LOX)-1, expressat

en CE, macròfags de l'íntima i les SMC de plaques ateroscleròtiques avançades, pot ser induït per estímuls proinflamatoris (com ara TNF-) per LDL oxidada i per altres estímuls. TNF- i IFN- augmenten l'expressió del RS¹⁹⁶. El receptor scavenger de fosfatidilserina i LDLox està implicat en l'absorció de Ox-LDL¹⁹⁷

A més dels seus efectes sobre l'expressió del RS i el transport de lípids en els macròfags, les citocines modulen la capacitat dels monòcits/macròfags per oxidar LDL. IFN- inhibeix l'oxidació de LDL induïda per macròfags¹⁹⁸, mentre que TNF- , IL-4 i IL-13 augmenten la capacitat d'oxidació mediada per cèl·lules.

9.4.4. Efecte de la migració de les cèl·lules del múscul llis (SMC) i la proliferació

A més dels factors de creixement com PDGF, les citocines també estan implicades amb la migració de les SMC i la seva proliferació. IL-1 és una potent mitogen per a les SMC. l'IFN- provoca la proliferació de SMC i la hiperplàsia de l'íntima. IFN- no és directament mitogènic, però potencia l'efecte proliferatiu de PDGF-BB en condicions baixes en sèrum¹⁹⁹.

9.4.5. Modulació de la remodelació de la matriu extracel·lular

Citocines pro- i antiinflamatòries produïdes durant l'aterosclerosi afecten de manera significativa l'expressió dels inhibidors de les metaloproteïnases de matriu (MMPs) i TIMPs que actuen de forma sinèrgica amb altres citocines, factors de creixement o lípids oxidats per induir la remodelació de molts components de la matriu extracel·lular. La producció de col·lagen tipus I i III per les SMC s'incrementa lleugerament per l'efecte d'IL-1 i TNF- , mentre que TGF- és un potent inductor de la síntesi de col·lagen. Per contra, IFN- inhibeix la síntesi de col·lagen²⁰⁰. Les citocines antiinflamatòries inhibeixen l'expressió de MMP. L'IL-10 i TGF- , les citocines antiinflamatoris més rellevants en l'aterosclerosi, inhibeixen determinades MMPs, incloses MMP-9 i MMP-12.

Per tant, a les zones de la placa en què l'expressió de citocines proinflamatòries preval sobre IL-10 i TGF- , un desequilibri entre la degradació de

la matriu i la síntesi podria comprometre l'estructura de la coberta fibrosa i precipitar la seva ruptura.

9.4.6. Mobilització de les cèl·lules progenitores vasculars

Les citocines juguen un paper crític en la mobilització de cèl·lules mare²⁰¹. Una de les molècules més importants i clínicament rellevants per a la mobilització de les cèl·lules CD34⁺T és G-CSF perquè indueix la producció de proteinasa pels leucòcits, el que permet el desacoblament de les cèl·lules mare de la medul·la òssia a l'estroma. D'altra banda, SDF-1 s'allibera a la circulació que condueix a l'atracció i la sortida de cèl·lules CXCR4+ de la medul·la òssia²⁰². VEGF, SDF-1, i el factor de creixement de placenta (PIGF) induïts per la mobilització de cèl·lules mare són dependents de MMP-9, que es requereix per a l'escissió de lligant Kit unida a la membrana²⁰³. La manca de la sintetasa de l'òxid nítric endotelial (eNOS) en el microambient de l'estroma de la medul·la òssia condueix a la mobilització deficitària.

9.4.7. Regulació de la formació de neovasos. Promoció de la neovascularització intraplaca

La CE, les SMC, així com les cèl·lules inflammatòries (monòcits / macròfags i limfòcits T) participen en el procés angiogènic expressant o induint la producció de citocines, quimiocines i molècules d'adhesió que pot afectar a la capa endotelial, en la proliferació, la migració i l'activació. L'aterosclerosi, els reguladors positius i negatius de la resposta inflammatòria afecten en gran mesura la neovascularització. Els mediadors més proinflamatoris i proaterogènics milloren la formació dels neovasos, i viceversa, en un entorn postisquèmic. D'altra banda, la majoria de mediadors antiinflamatoris i antiaterogènics inhibeixen el procés de neovascularització. Aquest equilibri s'ha denominat fenomen de Janus²⁰⁴ i pot tenir importants implicacions clíniques donat el risc de comprometre la reparació tissular post-isquèmica, mentre que la inducció d'estabilització de la placa (mitjançant la inhibició dels mediadors de la inflamació / angiogènics), o el risc d'afavorir el desenvolupament de la placa / desestabilització, mentre que la promoció del teixit funcional es recupera després de la isquèmia (per la promoció de vies proaterogèniques proangiogèniques). Això podria ser el cas dels factors de

creixement VEGF, PIGF, FGF-2, les citocines IL-1 i TNF- α , la CCL2 quimiocina i CXCL8, o fins i tot la leptina, que tots tenen proinflamatòries, proaterogèniques i les propietats proangiogèniques. D'altra banda, IL-10, CXCL9 (Mig), CXCL10 (IP-10), o l'adiponectina són anti-inflamatòries, antiaterogèniques i mediadores antiangiogèniques. No obstant això, CXCL9 i CXCL10 també poden reclutar un nombre elevat de limfòcits al teixit isquèmic per promoure la neovascularització²⁰⁵.

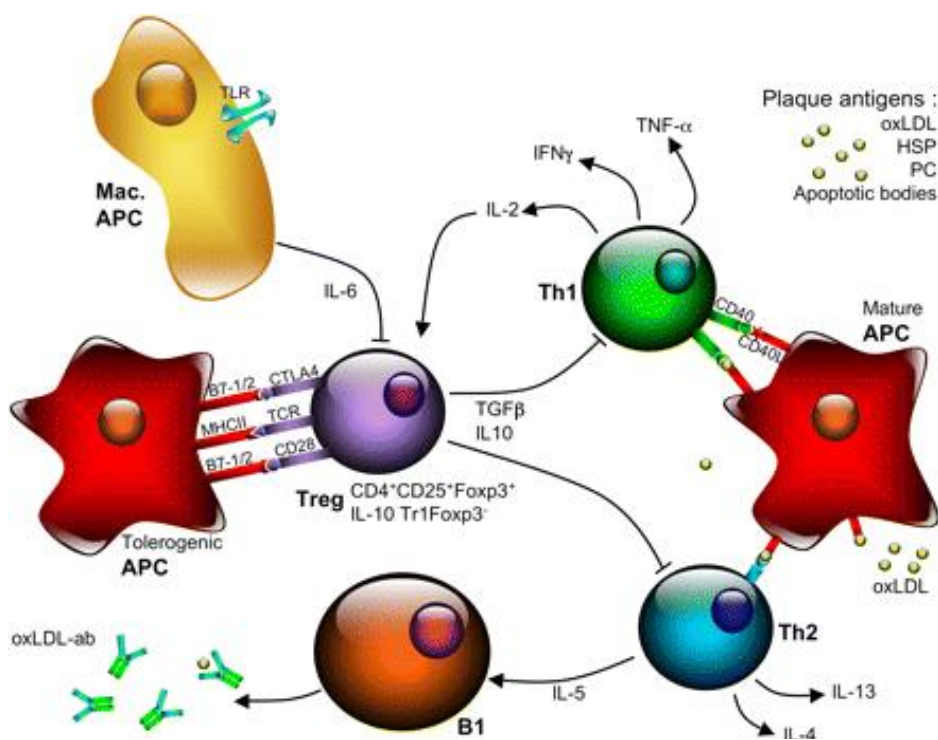
L'examen patològic de les lesions coronàries a revelat que l'hemorràgia intraplaca és un procés important en l'evolució de les plaques d'un fenotip estable a un fenotip inestable d'alt risc. Les àrees de neovascularització intraplaca s'infiltra amb els limfòcits T, el que suggereix un paper important per les citocines derivades de cèl·lules T en l'angiogènesi.

9.4.8. Inducció de l'apoptosi

La mort cel·lular apoptòtica es produeix durant el desenvolupament i la progressió de la placa ateroscleròtica. Tots els tipus de cèl·lules hi estan implicades amb un clar predomini de macròfags apoptòtics en el nucli lipídic. L'apoptosi dels macròfags pot contribuir a l'ampliació del nucli de lípids, mentre que la placa SMC pot induir a un aprimament de la capa fibrosa, el que afavoreix la seva ruptura²⁰⁶. La distribució de l'apoptosi dins de la placa és heterogènia, sent més freqüent a les regions riques en cèl·lules inflammatòries i citocines proinflamatòries, i menys abundant en regions caracteritzades per una producció significativa de citocines antiinflamatòries. És important destacar que, si bé l'apoptosi programada és essencialment un procés no inflamatori, l'apoptosi induïda durant condicions patològiques podria contribuir a la progressió de la malaltia a través del seu potencial inflamatori.

9.4.9. Regulació de la resposta immune

La immunitat adaptativa es desenvolupa quan els epítops moleculars específics d'antígens són reconeguts pels receptors d'antígens amb alta especificitat i afinitat, com ara receptors de cèl·lules T (TCR) i els receptors de cèl·lules B (BCR). El sistema immune adaptatiu afecta al desenvolupament de l'aterosclerosi.



9.5. LES CITOCINES I ELS RISCS CARDIOVASCULARS

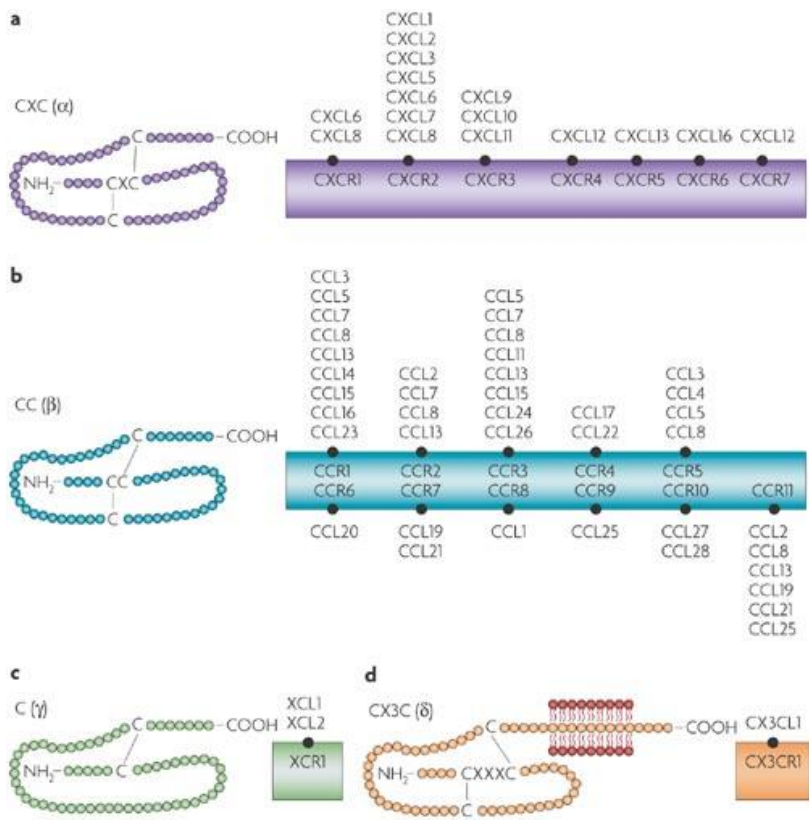
Les citocines produïdes queden atrapades per les cèl·lules veïnes a través dels seus receptors d'alta afinitat. En conseqüència, la concentració de citocines circulants no és un valor final que reflecteixi l'activitat real de la citocina. No obstant això, una varietat de marcadors inflamatoris en plasma prediuen el RCV. Els FRCV, incloent el colesterol LDL, la HTA, el tabaquisme i la DM poden instigar l'alliberament de citocines proinflamatòries vasculares i la posterior promoció de la inflamació. Aquestes citocines proinflamatòries augmenten els nivells sèrics de PCR, donant suport al concepte que la PCR com un integrador per a molts estímuls inflamatoris, que en associació amb la concentració de colesterol LDL en plasma poden predir el RCV²⁰⁷.

10. LES QUIMIOCINES

Les quimiocines són petits polipèptids, compostos d'aproximadament 70-125 aminoàcids amb una massa molecular d'entre 8-14 kDa^{208,209}. Són un gran grup de citocines proinflamatòries²¹⁰ mediadores de la quimiotaxis, que regulen el trànsit i activació cel·lular.

S'han identificat aproximadament 40 quimiocines en els éssers humans. Es classifiquen en quatre subfamílies principals²¹¹, la seva estructura i el nombre d'aminoàcids que es troben entre els primers residus de cisteïna en el lloc N-terminal (Figura 22)^{209,212}. La família més gran es divideix en CXC (o quimiocines alfa) i CC (o quimiocines beta). Tots dos grups difereixen en la seva funció, la seqüència i la localització cromosòmica.

Les quimiocines CXC (alfa) tenen dues cisteïnes separades per un aminoàcid. Estan situats en el cromosoma 4q13 i la seva acció es porta a terme en els neutròfils, monòcits i cèl·lules T. Les quimiocines beta tenen vinculades dues cisteïnes juntes i es troben en els cromosomes 17q11 i 12. Per contra, hi ha poques famílies de quimiocines C (quimiocines) i CX3C (quimiocines delta), la funció de les quals és estimular la quimiotaxi i actuar sobre les cèl·lules endotelials^{209,213,214}.



quimiocines homeostàtiques podrien ser reclutades durant la inflamació patògena²¹⁷⁻²¹⁹

La funció de les quimiocines és dirigir la migració dels leucòcits circulants als llocs d'inflamació. Exerceixen els seus efectes cel·lulars mitjançant l'activació de receptors específics i iniciant una cascada de transducció de senyal que promou canvis en la forma i moviment de les cèl·lules²¹⁴.

Els efectes biològics de les quimiocines es produeixen mitjançant receptors de transmembrana de la superfamília de receptors acoblats a proteïna G (Figura 23). La via de senyalització convencional implica la mobilització de calci dels dipòsits intracel·lulars i les posteriors cascades de senyalització que desencadenen canvis conformacionals en les integrines i promouen l'adhesió cel·lular i l'extravasació de leucòcits²²⁰.

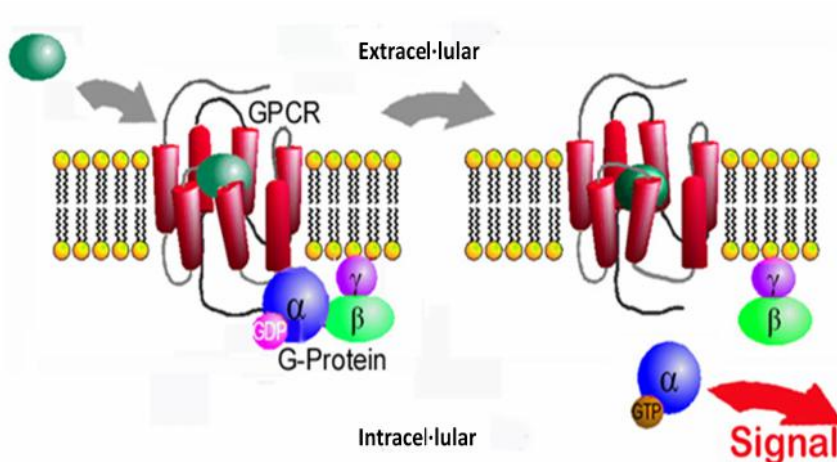


Fig. 23- Receptor de quimiocines. (Wie wir die Welt um uns herum wahrnehmen – Membran-Rezeptoren als biologische Sensoren. 05. Januar 2012)

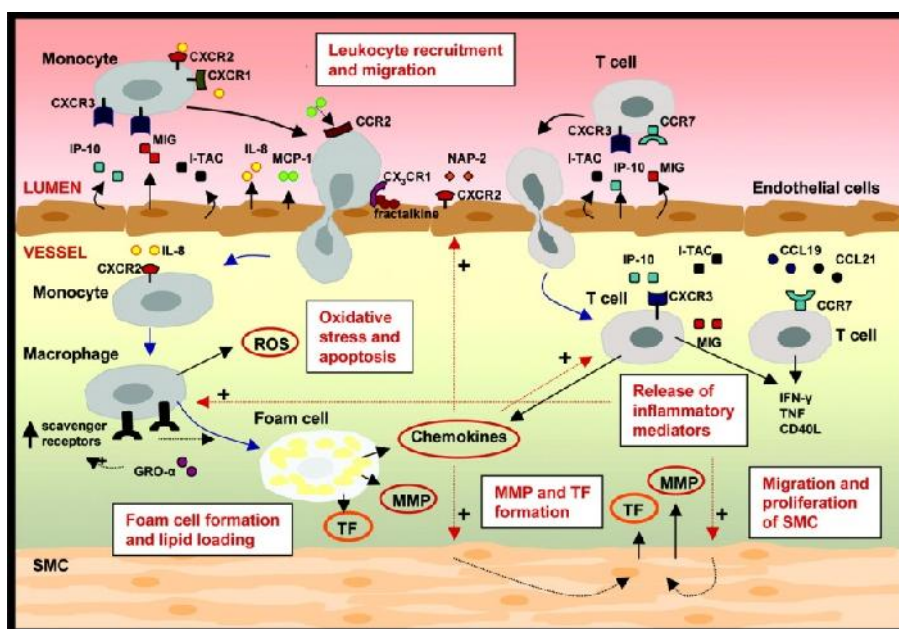
A més d'aquests receptors de quimiocines, hi ha receptors de quimiocines atípics com ara els receptors DARC, D6, CCX-CKR que s'uneixen al seu lligand amb alta afinitat i especificitat, però no transdueixen la senyal intracel·lular que condueix a la resposta quimiotàctica²²¹ (Figura 24).

Les quimiocines i els seus receptors tenen un paper important en la fisiopatologia de diverses malalties. Les proteïnes quimiotàctiques de monòcits, també conegudes com CCLs, són part de la subfamília *C-C*, i estan implicades en el reclutament de monòcits als diferents llocs de la inflamació²¹⁴. Es produeixen i secreten per diversos tipus de cèl·lules incloent els leucòcits i les cèl·lules tumorals. En general, els principals inductors de l'expressió de CCLs són citocines pro-inflamatòries com ara IL-1, TNF- α o IFN- γ . Hi ha quatre CCL identificades (CCL1 - CCL4)^{213,223}. La quimiocina CCL2 (de l'anglès *chemokine (C-C motif) ligand 2*) (Veure capítol 9.2.) és una proteïna quimioattractant de monòcits present en la progressió de la placa ateroscleròtica, ja que exerceix un paper fonamental en la migració de cèl·lules inflamatòries. La seva funció biològica és possible gràcies a la seva unió al receptor CCR2 (Veure capítol 9.3.), però la seva funció quimiotàctica pot ser atenuada pels receptors "silenciosos" o atípics (DARC i D6) (Veure capítols 9.4.1.-9.4.2.)

Per aquesta raó, les quimiocines i els seus receptors (CCL2 i CCR2), s'han convertit en un objectiu per a la recerca de nous biomarcadors i enfocaments terapèutics específics per a diverses malalties.

10.1. EL PAPER PATOGENÈIC DE LES QUIMIOCINES EN L'ATEROSCLEROSI

Les quimiocines promouen el reclutament i la migració de les cèl·lules T i monòcits en la lesió ateroscleròtica. Dins de la placa, les quimiocines indueixen a l'activació de cèl·lules endotelials i leucòcits de diferents subconjunts (per exemple, cèl·lules T) amb el subsegüent alliberament de citocines i quimiocines inflamatòries, que al seu torn promouen encara més el reclutament i l'activació dels leucòcits en la lesió. Per a l'activació de cèl·lules T, la interacció entre CXCR3 i els seus lligants (MIG, IP-10, i I-TAC) sembla ser de particular importància la promoció d'un fenotip de cèl·lules T inflamatòries, que a la vegada promouen l'activació dels macròfags. Les quimiocines són també potents activadors de macròfags en una forma més directa, induint no només un major alliberament de citocines inflamatòries, sinó també una major producció de factor tissular (TF),



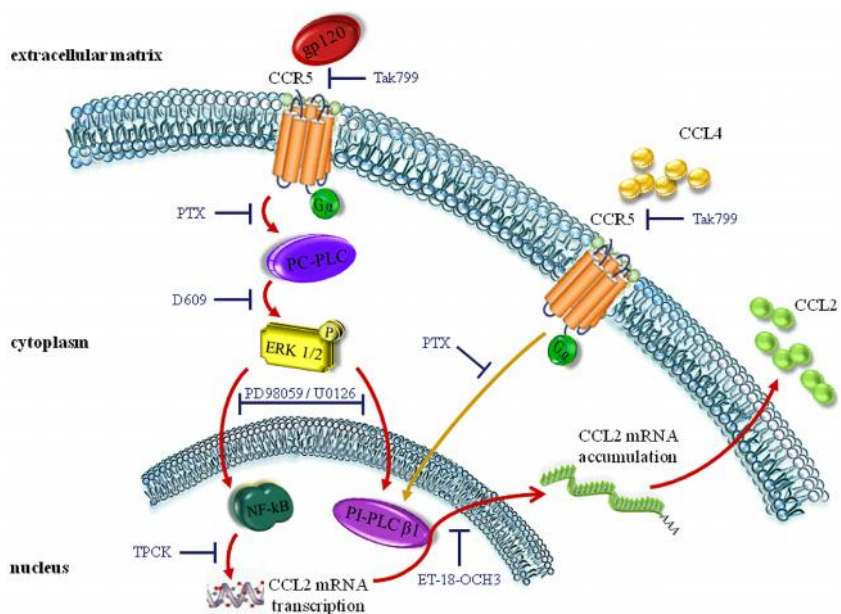
10.2. Quimiocina CCL2 (*chemokine (C-C motif) ligand 2*)

La quimiocina CCL2 (de l'angès (*chemokine (C-C motif) ligand 2*), també coneguda com a proteïna quimioattractant de monòcits 1 (MCP-1), és una molècula quimiotàctica que condueixen monòcits/macròfags als llocs inflamatoris i és una molècula clau en la iniciació dels processos inflamatoris²²⁴. CCL2 va ser descobert el 1989 a l'Institut Internacional del Càncer a Maryland (EUA) i identificada a partir de les vies de comunicació de la línia cel·lular mielomonocítica^{225,226}.

Aquesta proteïna es sintetitza en dues formes principals depenent del tipus de glicosilació i està codificada pel gen 8927bp situat al braç llarg del cromosoma 17q11 o depenent si conté o no glicosilació, presenta un pes molecular de 13 KDa o 9. Una de les isoformes conté la glicosilació galactosa-*-N*-acetil-galactosamina, mentre que l'altre no. La glicosilació afecta a l'estabilitat de la molècula, però no a la seva funció²²⁷.

CCL2 és secretada per totes les cèl·lules implicades en la lesió vascular (macròfags, cèl·lules del múscul llis i cèl·lules de l'endoteli)²²⁴. Això indueix l'adhesió dels monòcits a l'endoteli vascular i facilita i promou la diferenciació dels monòcits a macròfags²²⁸.

Quant a la regulació, nombrosos estudis demostren que la concentració sanguínia de CCL2 és modulada per diferents factors. CCL2 està regulada a nivell transcripcional per agents com el factor de necrosi tumoral alfa (TNF- α), interferó gamma (IFN- γ), factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF) i els factors d'estrès estimulant. En contrast, l'estrogen, l'àcid retinoic i els glucocorticoides han demostrat inhibir l'expressió de CCL2. El factor de transcripció nuclear kappa B (NF- κ B) pro-inflamatori és un mediador clau^{227,229} (Figura 26). CCL2 regula l'expressió de la integrina α 2 en les superfícies cel·lulars de monòcits i activa aquesta molècula d'adhesió dels monòcits a les proteïnes de la membrana. També està implicada en la inflamació al·lèrgica^{227,230}, ja que totes aquestes característiques de regulació estan connectades amb l'estructura i composició de la regió promotora del gen CCL2. La sobreexpressió de CCL2 està implicada en la patogènesi de molts processos, per exemple: l'aterosclerosi, l'angiogènesi i la progressió del càncer, malalties autoimmunes i isquèmia^{227,228}.



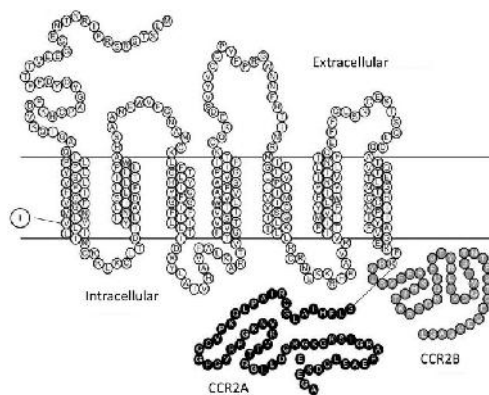
Un cop activat l'eix de senyalització de CCR2 es desencadena la síntesi de trifosfat d'inositol, causant l'alliberament de calci intracel·lular i l'activació de la proteïna C-quinasa. Aquesta última activa NF- κ B, factor de càrrega que estimula la transcripció de molts gens relacionats amb la mobilització de monòcits²²⁷.

Els factors que afecten la disponibilitat o funció sistèmica de CCL2 podrien ser mal interpretats en la clínica. Definim la CCL2 circulant com la diferència entre sèrum i plasma en les mateixes condicions de mesura (CCL2). Una possible explicació d'aquestes diferències que es troben en els anàlisis de laboratori rau en els vagaments coneguts com a receptors ACKRs i la disponibilitat funcional de CCL2 estaria regulada de forma coordinada per modular la resposta inflamatòria. Recentment, un anàlisi del genoma (GWA) ha identificat una forta associació entre la concentració de CCL2 sèrica i el cromosoma 1q22-q23, especialment al marcador rs12075 del gen de DARC, un dels receptors ARCK. Això encara no ha estat confirmat en plasma.

10.3. CCR2 (chemokine (C-C motif) receptor 2): Receptor Funcional de CCL2

El receptor cel·lular per CCL2 és CCR2²³¹. Aquest receptor es troba principalment en monòcits, cèl·lules T, cèl·lules B i basòfils. Es tracta d'un receptor acoblat a proteïna G (GPCRs) amb set dominis transmembrana. Està codificat per un gen localitzat en el braç curt del cromosoma 3, que té dues isoformes: 2a i 2b^{227,232}.

La diferència entre les isoformes rau en l'estructura primària de la proteïna. Cada isoforma conté una seqüència d'aminoàcids diferent a la regió citoplasmàtica originat pel procés de tall i entroncament alternatiu^{233,234}. El canvi en la seqüència altera la localització de la proteïna en la cèl·lula, és per això que la isoforma CCR2B es troba principalment en la superfície cel·lular, mentre que la isoforma CCR2A es troba principalment en el citoplasma (Figura 27)²³⁵.



Es creu que exercint el control sobre la quantitat de quimiocines presents en un lloc en particular, s'optimitza la pro-resposta antiinflamatòria. D'aquesta manera, aquests receptors poden regular les concentracions de les quimiocines inflammatòries i transport endotelial^{215,240}.

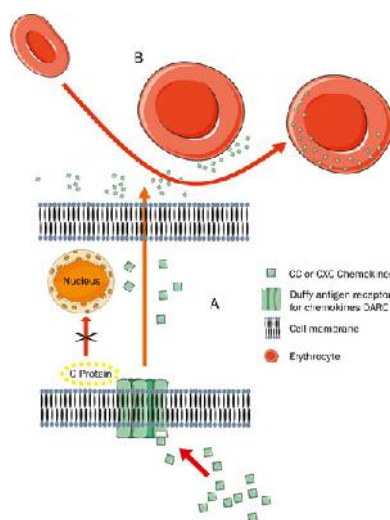
Dins d'aquest grup, els receptors més coneguts són el receptor DARC (Duffy antigen receptor for chemokines), la proteïna d'unió de quimiocines 2 (D6 o ACKR2), CCX CKR-(CCR11) i CXCR7 (ACKR3). Els dos primers són els més estudiats^{236,238}.

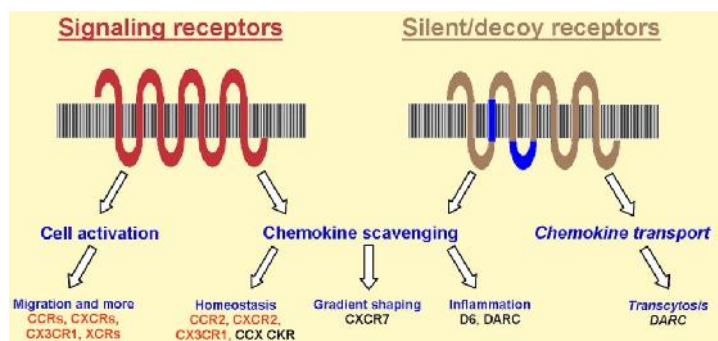
DARC i D6 són receptors de quimiocines amb alta afinitat d'unió però sense la funció de senyalització. Per tant, algunes quimiocines es sotmeten a la modulació de les seves concentracions per receptors als que s'uneixen sense cap tipus de senyalització²³⁶.

10.3.2. Receptor DARC (*Duffy antigen receptor for chemokines*)

El receptor DARC, també anomenat ACKR1 és un membre de la subfamília set tranmembrana del receptor atípic que s'uneix una àmplia gamma de CC inflammatòries i quimiocines CXC. DARC és una glicoproteïna transmembrana que s'expressa àmpliament en cèl·lules endotelials venulars postcapil·lars, que són el lloc principal de la transmigració de leucòcits en la majoria dels teixits. A més, també s'expressa en els eritròcits de la sang i en les cèl·lules neuronals. Aquest receptor actua com un receptor de citocines, especialment en CCL2, IL-8 i CCL5^{239,241}.

Poseeix major afinitat per les quimiocines motiu CXC, que són quimioatracients de neutròfils i proangiogèniques. A diferència de tots els altres receptors de quimiocines DARC no està acoblat a la proteïna G i no té cap mecanisme de senyalització alternatiu conegut. Actualment es creu que el receptor DARC actua com un regulador de l'activitat de quimiocines²⁴¹. Encara que la seva funció no està completament dexifrada, se sap que està involucrat en la captació de citocines que regulen el sistema circulatori i els nivells sanguinis d'aquestes citocines²³⁹.





HIPÒTESI I OBJECTIUS DE TREBALL

HIPÒTESI

D'entre les quimiocines, CCL2 pot tenir valor pronòstic en l'aterosclerosi. L'existència de receptors funcionals i no funcionals requereix valorar la seva expressió en els teixits afectats.

OBJECTIUS

Per testar la hipòtesi, es realitzen dos estudis amb pacients amb malaltia arterial perifèrica (estudi 1) i pacients amb malaltia arterial coronària (estudi 2).

Estudi 1: Malaltia arterial perifèrica

Identificar pacients amb aterosclerosi perifèrica d'entre els que són atesos pel servei de cirurgia vascular.

Recollir dades clíniques i mostres tant de sang com de teixits durant les intervencions quirúrgiques de revascularització.

Determinar la concentració de CCL2 en sèrum i plasma així com la concentració de CCL2 circulant (CCL2).

Comparar les variacions genètiques del receptor DARC amb CCL2.

Comparar el patró d'expressió de CCL2, el seu receptor funcional (CCR2) i els seus receptors atípics (DARC/ACKR1 i D6/ACR2) entre artèries afectes i artèries sanes.

Estudi 2: Malaltia arterial coronària

Identificar pacients de necròpsies amb mort per aterosclerosi coronària i pacients amb causa de decés no cardiovascular (controls).

Obtenir de dades clíniques i mostres d'artèries coronàries durant la necròpsia.

Realitzar tècniques immunohistoquímiques i quantificar l'expressió de CCL2, CCR2 i receptors ACKR en teixit arterial.

Comparar els diferents patrons d'expressió de CCL2 i els receptors entre artèries sanes i malaltes.

TREBALLS REALITZATS, MÈTODES I RESULTATS

La descripció dels pacients, la metodologia utilitzada així com els resultats de les diferents investigacions realitzades, es troben detalladament explicades en les seccions de “*Materosclerosirials and methods*” i “*Results*” de cadascun dels articles que constitueixen el cos de la present tesi doctoral.

Els dos articles s’inclouen a continuació, i en l’apartat de Materosclerosirial Suplementari estan tal i com es troben a la literatura científica.

Estudi 1

Understanding the role of circulating chemokine (C-C motif) ligand 2 in patients with chronic ischemia thearterosclerosing the lower extremities

*Anna Rull, PhD1, Anna Hernandez-Aguilera, MSc1, 2, Montserrat Fibla, MSc3, Julio Sepulveda, MD2, Esther Rodríguez-Gallego, MSc1, Marta Riera-Borrull, MSc1, Juan J. Sirvent, MD, PhD3, Vicente Martín-Paredero, MD, PhD2, Javier A. Menendez, PhD4, Jordi Camps, PhD1, *, Jorge Joven, MD, PhD1, **

Vascular Medicine (2014)

Factor d'impacte: 1.785

Ranking: 45/60 (Q4)

RESUM

La funció de la quimiocina CCL2 (de l'anglès, *chemokine (C-C motif) ligand 2*) en el procés de la malaltia arterial perifèrica no està clara del tot.

Els receptors atípics o silenciosos (ACKR) en sang i teixits poden evitar que CCL2 entri a la circulació, i conseqüentment, poden modular la seva funció d'atracció de monòcits al lloc de la lesió.

Es va mesurar la diferència de concentració de CCL2 entre sèrum i plasma en pacients amb isquèmia crònica de les extremitats inferiors (un dels estadis extrems de la malaltia arterial perifèrica, MAP), comparant-la amb valors obtinguts en individus control. Posteriorment, es va estudiar l'associació amb el polimorfisme de l'Asp42Gly (rs12075) del gen DARC, un dels receptors atípics de la quimiocina CCL2. Mitjançant artèries sanes i afectades per MAP obtingudes en processos quirúrgics es va avaluar la càrrega de calci, així com l'expressió de CCL2 i de receptors relacionats que indiquen l'estat inflamatori.

Les nostres troballes indiquen que la CCL2 circulant s'associa significativament amb la presència de la malaltia i la seva severitat. CCL2 circulant és dependent del genotip rs12075 (GG>AG>AA) del gen DARC el qual, probablement, indica una major expressió del receptor de quimiocina en les artèries dels subjectes AA.

Les associacions amb les variants genètiques i la sobreexpressió de receptors atípics de quimiocina a les artèries afectes pot tenir implicacions potencials i les nostres dades indiquen que la CCL2 pot representar un factor previ no reconegut que necessita ser considerat en els processos de *screening* dels pacients amb factors de risc per malaltia arterial perifèrica.

Understanding the role of circulating chemokine (C-C motif) ligand 2 in patients with chronic ischemia threaterosclerosing the lower extremities

Anna Rull, PhD1, Anna Hernandez-Aguilera, MSc1, 2, Montserrat Fibla, MSc3, Julio Sepulveda, MD2, Esther Rodríguez-Gallego, MSc1, Marta Riera-Borrull, MSc1, Juan J. Sirvent, MD, PhD3, Vicente Martín-Paredero, MD, PhD2, Javier A. Menendez, PhD4, Jordi Camps, PhD1,*, Jorge Joven, MD, PhD1,*

1Unitat de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari de Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

2Servei d'Angiologia, Cirurgia Vasculard i Endovascular, Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain

3Servei d'Anatomia Patològica, Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain

4Molecular Oncology Group, Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI), Girona, Spain

*Corresponding author(s):

Unitat de Recerca Biomèdica,

Universitat Rovira i Virgili,

c/ Sant Llorenç 21,

43201 Reus,

Spain

Tel.: +34 977310300; fax: +34 97759386.

E-mail: jorge.joven@urv.cat or jcamps@grupsagessa.cat

Abstract

The role of chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) in peripheral artery disease is unclear. We measured the difference between serum and plasma levels of CCL2 in patients with chronic ischemia threaterosclerosing the lower extremities following the observation that atypical chemokine receptors in blood and tissue cells may prevent CCL2 from entering the circulation and consequently modulaterosclerosi its function of attracting monocytes to the site of lesion. To identify the influence of CCL2, we compared the patients' values to those in bio-banked samples from a control population. Further, we explored the association with the Asp42Gly polymorphism (rs12075) in Duffy antigen chemokine receptor; one of these atypical chemokine receptors. When possible, we evaluaterosclerosid in surgically excised normal and affected arteries the calcium burden as well as the expression of CCL2 and relaterosclerosid receptors reflecting the inflammatory status. Our findings indicaterosclerosi that circulating CCL2 was significantly associaterosclerosid with the severity and presence of the disease (OR 0.966, 95%CI 0.944 to 0.988, P = 0.003). Circulating CCL2 was dependent on the rs12075 genotype (AA>AG>GG), which, probably, indicaterosclerosi a higher expression of chemokine receptor in the arteries of AA subjects. The associations with genetic variants and the over-expression of atypical chemokine receptors in diseased arteries may have potential implications and our data indicaterosclerosi that CCL2 may represent a previously unrecognized factor that needs to be considered in the screening of patients with risk factors for peripheral artery disease.

Keywords: atherosclerosis, biological markers, cytokines, genetics, metabolism, peripheral artery disease, risk factors.

Introduction

Lower extremity peripheral artery disease (PAD) is a major health concern that may be associaterosclerosid with catastrophic events in different arterial territories. The disease increases with age and, in people over the age of 55 years,

the prevalence of PAD in the legs is approximately 20%.¹⁻⁴ Paradoxically, although preventive measures are effective in early stages, PAD is under-diagnosed when asymptomatic and, consequently, prevention is either applied too late or not at all.¹⁻⁶ Therefore, the search for laboratory surrogates of atherosclerosis is a relevant pursuit. We aimed to increase our understanding of the chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) in the overall inflammatory response observed in patients who develop chronic limb ischemia in order to identify associated factors⁷⁻¹² and to test the hypothesis that the expression of this chemokine and its receptors is increased in diseased arteries. This is based on our previous findings indicating that CCL2 and CCR2 (its cell surface receptor) are widely distributed in mice.¹³ The effect in human tissues is unknown. We also hypothesized that factors affecting the availability and/or systemic function of CCL2 may result in misinterpretation of clinical measurements.

We propose a plausible clinical impact of CCL2 in PAD because: firstly, the biological function of the CCL2/CCR2 pathway is its ability to induce cell migration; secondly, arteries with moderate atherosclerosis accumulate CCL2 in response to a variety of pro-inflammatory stimuli; and thirdly, CCL2 may represent a potential therapeutic target.^{7, 14-18} We have already shown that serum CCL2 levels are consistently higher than plasma CCL2 levels and that analytical variability is significantly higher in serum.¹⁸ This finding may alter the relevance of the observed clinical associations.¹⁹ Consequently, we reasoned that measurement of CCL2 should be performed in both types of biological samples and we arbitrarily defined circulating CCL2 as the difference between serum and plasma under identical conditions (CCL2). A possible explanation for differences during laboratory analyses may lie in poorly understood chemokine receptors collectively known as “atypical”, “silent”, or “decoy”. These are G-protein coupled receptors that do not activate conventional signalling events (mainly, Duffy blood group chemokine receptor (DARC), D6, CCX-CKR1 and CXCR7).²⁰ Conversely, they may internalize, degrade or transport ligands (i.e. they have the potential to create clinically-relevant chemokine patterns in tissues). Their levels of expression have not been explored previously in diseased arteries.

A recent genome-wide-analysis study identified a strong association between serum CCL2 levels and chromosome 1q22-q23, especially at the rs12075 marker in DARC.¹⁷ This was not confirmed in plasma, and a recent study revealed

complex associations that may be relevant in the study of atherosclerosis.²¹ Here we present, for the first time in patients with PAD, the association between the Asp42Gly polymorphism (rs12075) in the DARC gene and circulating CCL2 levels, in relation to the relative expression of selected ligand and receptors in damaged arteries. Despite the apparent complexity in the interpretation, taken together, our data suggest that circulating chemokines may play an important role in the pathogenesis of PAD.

Methods

Study Population

This is an observational, cross-sectional study with a pre-set duration of 3 years (from January 2009 to December 2012). It involves data prospectively collected from selected patients referred to the vascular disease department of our hospital for the assessment of intermittent claudication. Diagnosis was with standard clinical assessments that included measurement of the ankle: brachial index (ABI), non-invasive imaging, and angiography when indicated. Our hospital's ethics committee and institutional review board approved the procedures of the study protocol, and written informed consent was obtained from the participants prior to entry into the study (10-04-29/4proj3; 11-10-27/10proj1). We recruited 174 patients aged between 55 and 85 years, in whom chronic limb ischemia was diagnosed (> 2 weeks of resting pain or ulcers attributed to arterial occlusion disease). Staging III or IV was according to Fontaine, but the patients were only included if ulcers healed through medical therapy, irrespective of whether revascularization was further indicated to improve quality-of-life and to increase survival. These criteria were to exclude other factors such as infection, repeated trauma or significant neuropathy, and to ensure that the inclusion of diabetic patients does not constitute bias.²² We did not find significant difficulties in recalling past events and main exclusion criteria were acute ischemia, signs of infection, renal failure, liver disease, cancer, or autoimmune diseases. The number of patients recruited within our fixed term of 3 years (n=174) was higher than the minimal sample size required to analyse

biological markers with this design, and taking into account the incidence and laboratory variability⁶⁻⁸ ($r = 0.02$; $r = 0.85$; $n = 125$). Diabetes, hypertension and dyslipidaemia were defined according to established criteria.²³⁻²⁵ The comparison group was composed of bio-banked samples ($n = 154$) representing the same general population from which the cohort of patients was selected. The controls were known to be unaffected (i.e., normal ABI values) and aged > 50 years. To preserve the characteristics of the general population and to avoid population stratification, no other matching procedure was performed²⁶ and, consequently, there was a difference in age and gender distribution. However, these did not affect genetic studies and, presumably, did not skew the results of other comparisons.⁷

Laboratory measurements

At the time of recruitment, fasting blood samples were drawn and serum and plasma obtained. Blood cell counts were performed immediately in an automatic cell counter (Coulter LH 750 Analyser, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Plasma concentrations of interleukin-8 (IL-8), soluble CD40 ligand (sCD40L) and soluble P-Selectin (sP-Selectin) were also measured immediately using a Bender MedSystems FlowCytomix detection on flow cytometry (Izasa, Barcelona, Spain). The remaining samples were frozen in aliquots at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ within 2h of collection and stored until batched analysed. Standard measurements were performed using enzymatic assays or chemiluminescent immunoassays.^{27, 28} The updated atherosclerosis homeostasis model assessment (HOMA2) estimate of atherosclerosis for insulin resistance were calculated.¹⁴ Plasma β 2-microglobulin and C-reactive protein were measured using turbidimetric reagents obtained from Biokit (Barcelona, Spain). Plasma and serum CCL2 were measured with an ELISA-based assay (PeproTech, London, UK) as described.¹⁹ The difference between serum and plasma was expressed as ΔCCL2 , or as percentage $[(\text{serum} - \text{plasma}) \times (100 / \text{serum})]$. The calculated ΔCCL2 value was considered a measurement of circulating CCL2, and used to investigate atherosclerosis cell-cell interactions during laboratory handling. DNA was extracted from EDTA blood using a column-based method from Qiagen (Izasa, Barcelona, Spain) and samples genotyped for rs12075 using the TaqMan 5'allelic discrimination genotyping assay

C_2493442_10 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations.¹⁸

Immunohistochemical analyses

Portions of femoral and/or popliteal arteries from patients were obtained during surgical procedures for infra-inguinal limb revascularisation (n = 30). The same approved procedures had been used to generate atherosclerosis non-affected donor tissue samples for banking (n=10) according to our Blood and Tissue Bank (http://www.bancsang.net/es/donants/donacio_teixits.html). After harvesting, the tissues were rinsed in phosphate buffered saline to remove residual blood and placed in at least 10 volumes of buffered formalin using a standard protocol for paraffin embedded tissue samples. Three sections per slide were obtained and immunohistochemical studies were performed in batches essentially as previously described.²⁹ Due to differing manufacturing characteristics, and to ensure specific immunoreactivity, it is usual to test different antibodies from different suppliers before making the choice based on results obtained. A pre-requisite for an antibody is that it can be used for Western blot (WB) as well as immunohistochemical analyses, in order that the antibody can be checked against commercially supplied antigens. The optimal dilution and exposure time for each antibody were optimised for all subsequent analyses. In this particular study we used: D6, Abcam 1656, 1/1000; DARC, Abcam 58965, 1/500; CD68, Dako KP1, ready to use; CCR2, Abcam 21667, 1/50, and CCL2, Abcam (c-17) sc 1304, 1/500. The appropriate secondary antibodies (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) were used at a dilution of 1:200. Detection was performed with the ABC peroxidase system (Vector Laboratories Inc.). For all the immunohistochemical measurements, negative controls were treated the same as test samples, but omitting the primary antibodies in the incubation. Also, arteries were routinely stained for calcium deposits with alizarin red S (Sigma, Madrid, Spain). Immunoreactivity was quantified automatically for each antibody using an image analysis system (AnaliSYS, Munster, Germany).²⁹

Statistical methods

Kolmogorov-Smirnov test was used to check for normality of distribution of the variables. Values are presented either as mean (SEM) or median (inter-quartile

range; the 1st quartile subtracted from the 3rd quartile). Comparisons between groups were made with Student's unpaired t test or Kruskal-Wallis one-way analysis. Allelic frequency description and Hardy-Weinberg equilibrium test were performed using SNPStats. The crude odds ratio (OR) and their 95% confidence intervals (95%CI) for genotype associations were calculated using the inheritance model selected by the Akaike Information Criterion.³⁰ Logarithmic transformations were used in some cases to model nonlinear relationships. Multiple regression models were used to analyse the association between variables and results are provided only when the model fits the data (i.e. relatively low residuals). We included all variables in multivariable analyses as on theoretical grounds all have shown to be either risk factors or potential confounders. The number of variables was reduced, however, according to the explanatory or predictive purpose of the model. We routinely used the forward stepwise selection as the variable selection method in each analysis and at an arbitrarily specified significance level of $p < 0.05$. Data were analysed with SPSS version 18.0 (SPSS Inc., Chicago III, USA).

Results

Study population

We evaluated 174 patients (348 limbs) and identified 195 limbs with the diagnosis of chronic limb ischemia, as described above. Decreased, or absent, pulse was recorded in all patients and, in most, dry skin and coolness to palpation. Ulcers (Fontaine stage IV) were found in 120 limbs (61.5%) and pain at rest (Fontaine stage III) in 75 limbs (38.5%). The ankle systolic pressure ranged between 27 and 58 mmHg (41 ± 9 mmHg) and the ABI values between 0.3 and 0.5 (0.39 ± 0.17). Among the remaining limbs, the ABI was < 0.9 in 143 and > 0.9 in 10. Overall, there was no difference between right and left limbs with respect to ABI values (0.59 ± 0.04 and 0.61 ± 0.04 , respectively). Other selected characteristics and descriptive variables of the patient cohort and population group are depicted in Table 1.

	Control N = 154	Patients N = 174	P value
Clinical characteristics			
Age, years	68.03 (0.56)	71.26 (0.76)	0.01
Male, %	44.8	85.1	< 0.001
Medication, %			
ACEIs or ARBs	13.2	35.0	< 0.001
Other anti-hypertensive agents	1.9	44.2	< 0.001
Beta-blockers	0.6	11.6	< 0.001
Statins	18.5	26.0	0.315
Fibraterosclerosis	-	12.4	-
Insulin	-	5.7	-
Metformin	2.1	36.2	< 0.001
Aspirin	11	50	< 0.001
Clopidogrel	-	18	-
Pentoxifylline or cilostazol	-	16.3	-
Complete blood count			
Red Blood Cells (x10 ¹² /L)	4.59 (0.02)	4.09 (0.07)	< 0.01
Hemoglobin (g/dL)	14.04 (0.08)	12.28 (0.20)	< 0.01
Leukocytes (x10 ⁹ /L)	6.64 (0.09)	8.83 (0.32)	< 0.001
Platerosclerosilets	213.06 (3.39)	280.97 (10.55)	< 0.01

(x10 ⁹ /L)			
Biochemical variables			
Total cholesterol, mmol/L	5.37 (0.06)	3.98 (0.09)	< 0.001
HDL-cholesterol, mmol/L	1.33 (0.02)	1.08 (0.03)	< 0.001
LDL-cholesterol, mmol/L	3.40 (0.05)	2.30 (0.08)	< 0.001
Triglycerides, mmol/L	1.42 (0.06)	2.94 (0.10)	< 0.001
Glucose, mmol/L	6.15 (0.13)	6.61 (0.25)	0.115
Insulin, pmol/L	79.34 (9.45)	144.48 (20.34) [§]	0.004
HOMA2 IR	1.69 (0.21)	2.68 (0.34) [§]	0.015
Inflammation-relaterosclerosid variables			
CCL2, %	38.8 (1.8)	18.1(2.2)	< 0.0001
₂ microglobulin, mg/L*	2.45 (0.71-2.96)	4.98 (1.9-5.2)	< 0.01
Fibrinogen, mg/dL*	285 (126-312)	676 (431-825)	< 0.01
Hs-CRP, mg/L*	2.7 (1.2-5.8)	19.6 (6.2-24.7) [§]	< 0.0001
IL-8, ng/L*	2.14 (0.81-2.52)	3.46 (1.12-5.12)	<0.05
Soluble CD40 ligand, pg/mL*	149 (84-198)	248 (107-310)	<0.05
Soluble P-Selectin, ng/mL*	40 (22-60)	208 (132-354)	< 0.001

* Median (interquartile range); ACEIs, Angiotensin converting enzyme inhibitors; ARBs: Angiotensin receptor blockers; Hs-CRP, high sensitivity C-reactive protein; IL, Interleukin, [§] n=164.

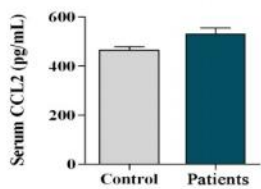
Table 1 Selected descriptive characteristics and laboratory variables in participants.

Prescriptions are commonly obtained from the attending general practitioners. Medication use was recalled from questionnaires applied to the patients, but these probably indicated adherence rather than actual prescriptions. There was clinical evidence of concomitant cerebrovascular or coronary artery disease in 82 patients (47.1%). Most patients (n =141, 81.0%) were current or former smokers (27.3% in the population control group) and other comorbidities were significantly higher ($p < 0.001$) in patients than in the population control, including hypertension (66% vs. 13.2%) and dyslipidaemia (31.6% vs. 10.0%). Of note, 15 patients were diabetic (n=1 in the population control) that were managed with either insulin (n=3) or metformin and, as mentioned above, the possibility of bias was considered negligible.

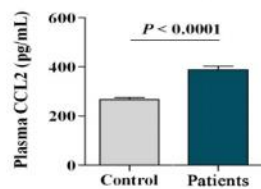
Biological significance of CCL2 in peripheral artery disease

Plasma and serum CCL2 concentrations were higher in patients than in controls and measurements in both samples were significantly correlated (Figure 1).

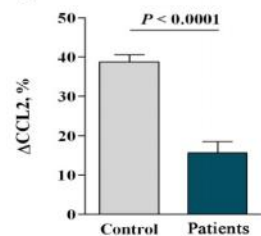
A



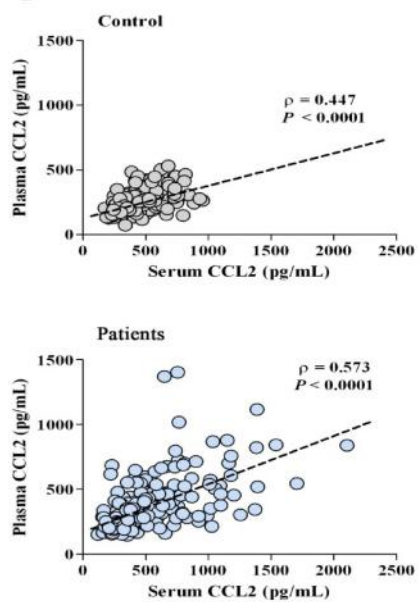
B



C

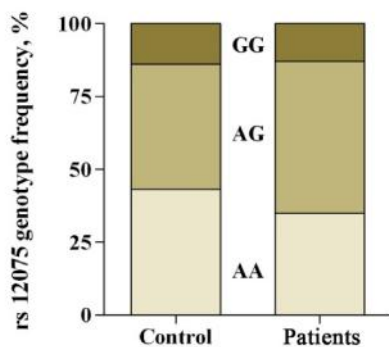


D

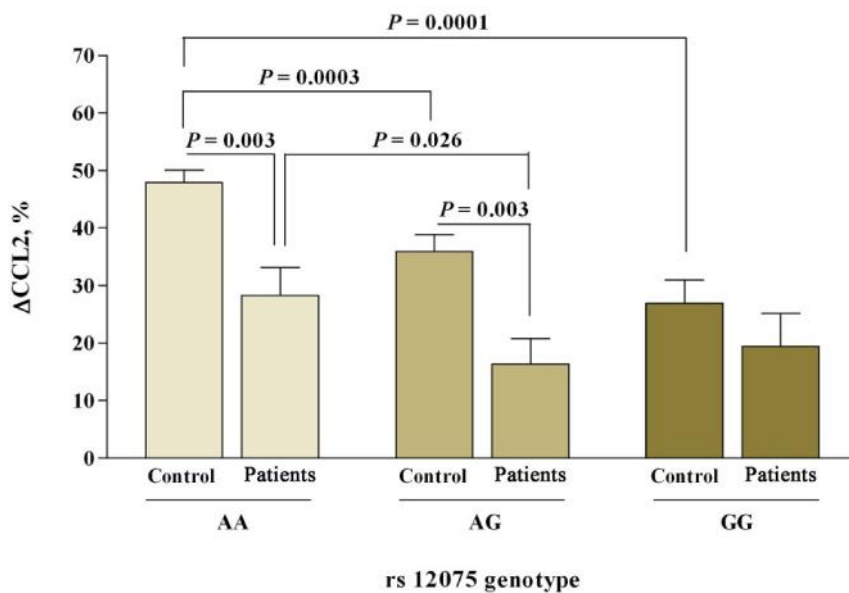


95%CI: 0.944 to 0.988; $P = 0.003$) were associated with the presence of the disease. This is probably a useful diagnostic and prognostic information. This association was not observed for any other inflammation-related variable. Exploration of associations with other biological determinants showed that there were no significant associations with monocyte count, age, and smoking. However, diabetes mellitus affected the interpretation of serum and plasma CCL2. These measurements were associated with plasma insulin concentration and insulin resistance (data not shown). Because our method detects exogenous insulin, the association was calculated excluding patients taking insulin. Intriguingly, serum CCL2 concentrations were significantly lower in patients with diabetes mellitus than in those without diabetes [550.51 (40.07) vs. 642.51 (69.31) pg/mL; $p < 0.001$] and this difference disappeared when CCL2 was measured in plasma [441.26 (26.27) vs. 435.46 (29.72) pg/mL]. These results reinforce the concept that CCL2 is considerably more informative in these patients. To explore the effect of genetic variants with a potential impact on CCL2 we determined the relationships between the Asp42Gly polymorphism (rs12075) in the DARC gene and the circulating CCL2 levels in patients with PAD. The success rate of successful genotyping was 96%. Genotype frequencies did not deviate from the Hardy-Weinberg equilibrium, either in patients or in controls. The A allele was more frequent (61%) than the G allele (35%) and there were no differences in distribution between patients and controls (Figure 2A). However, circulating CCL2 was clearly associated with the genotype (AA>AG>GG) in both in population controls and in patients (Figure 2B). Following adjustment for clinical, laboratory and genetic variables and using the over-dominant model of inheritance, CCL2 remained significantly associated with the presence of PAD (OR: 0.965; 95%CI: 0.942 to 0.989; $P = 0.004$). As such, these genotypes appear to play a role in CCL2 function in the tissue in PAD. A preliminary assessment of the expression of CCL2 and receptors in arteries is justified.

A



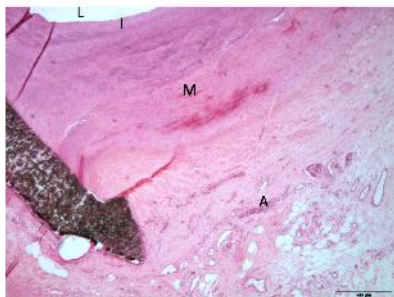
B



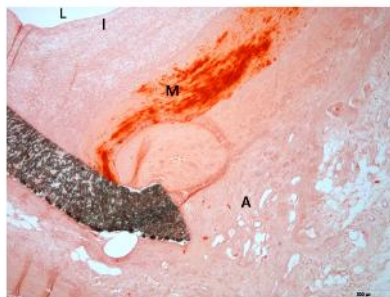
Histology observations

Representative results in affected arteries are summarised in Supplementary Figure 1 in which the same artery stained with each described marker is depicted. Calcium deposition, found exclusively in the media, was a distinct finding in affected arteries, compared to controls. The circumferential distribution of calcium as a dark stripe in haematoxylin and eosin stained samples was a relatively frequent observation (Figure 3A). There was no correlation between alizarin staining (Figure 3B) and the expression of other markers. The CD68-positive cells (macrophages) are not observed in normal or minimally affected arteries (Supplementary Figure 2A, 2B) but are predominant in newly formed intima and in the adventitia of diseased arteries (Supplementary Figure 2C, 2D). In non-diseased arteries, the CCL2-stained cells were observed only in the adventitia endothelium of the vessels (Figure 4A, B). In affected arteries, the expression of CCL2 was intense in the adventitia and the distribution was not homogeneous in the intima and media (Figure 4C, 4D). Although there were some trends regarding this expression and circulating CCL2 or DARC genotypes, the low number of specimens available for analysis precluded further inferences. The expression of CCR2-stained cells was strong and limited to the media in normal arteries. The expression in affected arteries was uniform throughout, including intima and adventitia (Figure 5). The increased presence of these functional receptors (i.e. CCR2) indicates atherosclerosis that, probably, most cells are receptive to the presence of circulating CCL2 and, consequently, may be more reactive in the case of disease progression. DARC-stained cells were not found in normal arteries. The expression in the intima of affected arteries appears related to atherosclerosis, albeit non-significantly, to the genotypes investigated; in most cases, staining was intense in media and adventitia. Curiously, the expression of DARC is more intense in atheroma, which is in contrast with the expression of other chemokine receptors. It was also evident that the expression of DARC in arteries with higher deposition of calcium is limited to endothelial cells in contact with the lumen (Supplementary Figure 3). The expression of D6-stained cells was practically absent in normal arteries, but intense and widely distributed throughout affected arteries. The expression of D6 in the intima was also limited, usually, to cells in contact with the lumen (Supplementary Figure 4).

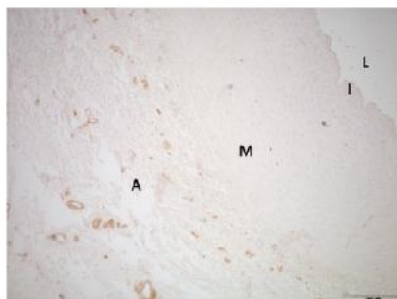
A



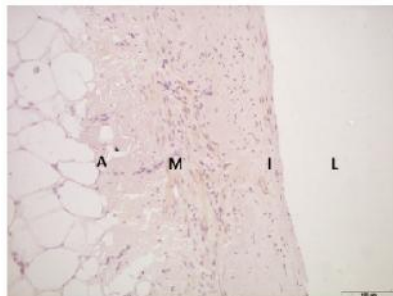
B



A



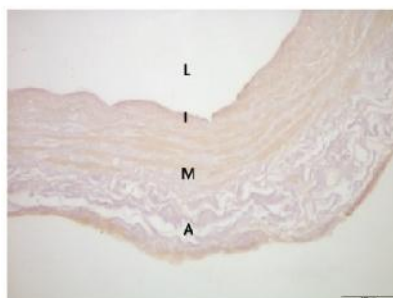
B



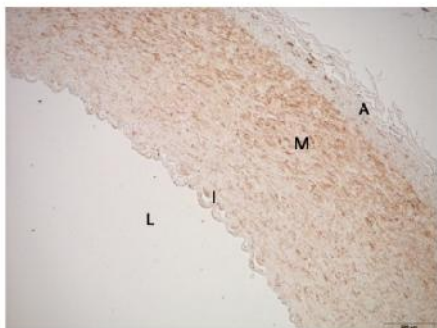
C



D



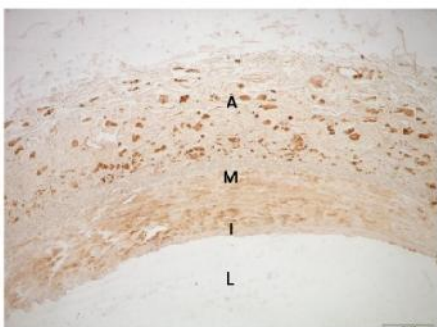
A



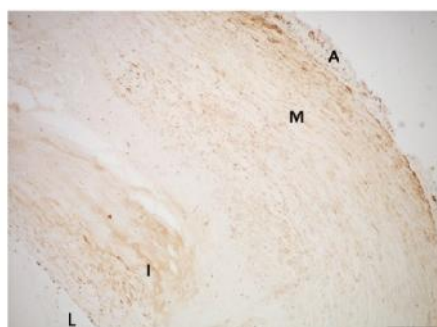
B



C



D



CCL2 increased the progression of atherosclerosis, deficiency of CCL2 reduced atherosclerosis, and plasma levels of CCL2 promote recruitment of monocytes and other immune cells to the vessel wall.³² The value of CCL2 as cardiovascular risk marker has been assessed, mainly, in coronary heart disease³³⁻³⁶. Although the findings are often contradictory, there is no reason to exclude the relevance of lower extremities in atherosclerosis since there are limited, but consistent and suggestive, data to the contrary.^{37, 38}

We identified a few factors limiting the interpretation of our findings. For example, CCL2 concentration in plasma is consistently lower than in serum, and interpretation differs depending on which measurement is used.¹⁷⁻¹⁹ Our data show that this is not an anecdotal finding. Interpretation is not simple, especially if there are other possible biological determinants (e.g. diabetes mellitus). Therefore, we propose the use of the difference between serum and plasma values (CCL2) as a classifier of severity. There are at least two advantages: 1) a decrease in the influence of laboratory mishandling; and 2) that chemokines bound to blood and endothelial cells are taken into account. Using this approach, the alternative measure of the total amount of circulating CCL2 (i.e. CCL2) is strongly associated with critical limb ischemia, and remains a powerful predictor when adjusted for other confounding factors. Of note is that we observed that severe and extensive lesions are consistently associated with significantly decreased CCL2 values. We interpret our data as being the result of a high burden of damaged tissue. Plasma CCL2 concentrations may vary but do not reflect CCL2 bound to blood cells such as platelet aggregates.³⁹ Serum CCL2 could represent a measurement of CCL2 post-coagulation. The combination of both measurements would indirectly represent the amount of CCL2 expressed, or transported, into the artery during protracted inflammatory stimuli (i.e. a measurement of chemokine availability and function in tissues).⁴⁰ More importantly, CCL2 was not, in our study, associated with other inflammation-related variables. Further, preliminary results in an on-going prospective study (data not shown) suggest that these measurements may be useful for the stratification of the extent of peripheral artery disease. The availability of CCL2 may be complicated by potential effects induced by differential expression of functional receptors (CCR2) and the presence of atypical chemokine

receptors of unknown function in the regulatory network which enables the organism to modulate leukocyte migration.⁴⁰ For the first time in the current literature, we observed that a genetic polymorphism of DARC may be a contributing factor. Genotype frequencies in patients and in unaffected members of the same population are similar, but CCL2 values are higher in genotype AA and lower in GG. Differences in CCL2 between cases and controls were significant, and suggest a higher expression of these receptors in patients with AA. It is consequently a candidate genetic marker that warrants further investigation. Our histologic observations failed to show significant associations, but we found that the expression of CCR2, DARC and D6 was increased in diseased arteries, and that the distributions in the arteries are not uniform. A pathogenic role is likely, and data suggest that atypical chemokine receptors modify chemokine availability in peripheral artery disease. Although these receptors have no involvement in cell migration, a modulation of the inflammatory response is likely. It should be mentioned that our finding of a significant calcium burden in the arterial tissue could be clinically **important since paterosclerosis with surgical interventions are low in cases of very calcified arteries**. This high calcium load may represent an unrecognized confounding factor.

A number of limitations should be recognized in this study. Firstly, despite our efforts to minimize the effect of diabetes mellitus (including neuropathy and difficulty in healing ulcers) it is not clear whether these patients should be included, according to the initial definition of critical limb ischemia.²² Secondly, results obtained in a cross-sectional study do not quantify any improvement in clinical performance that can be gained from the addition of a biomarker to data on risk factors. Thirdly, the genetic findings have, as yet, not been replicated in other studies and, as such, should be considered exploratory and requiring further validation. Fourthly, the effects of suboptimal medical treatment the patients may have been receiving at the time of study, and the specific mechanisms of action of several drugs being administered, cannot be discarded as possible confounding factors.

Finally, PAD should be considered a clear example of a condition in which metabolism confronts inflammation. Recently, we developed a mouse model that over-expresses CCL2 and highlights an intriguing relationship between mitochondrial dysfunction, energy intake, and inflammation.⁴¹ Patients with PAD appear to have abnormal mitochondrial function in diseased arteries, independent of tissue perfusion.⁴² This would imply that, in PAD and other diseases of aging, a regulatory role of metabolic reprogramming in affected cells might be pivotal in determining the relationship with inflammation.⁴³

In conclusion, CCL2 is involved in the progression of peripheral artery disease. Overall, our findings indicate that the availability of chemokines might represent a previously unrecognized factor in the development of chronic critical limb ischemia. To therapeutically influence CCL2 to improve patient care is attractive.

Conflict of interest statement:

The authors have nothing to disclose, and there is no conflict of interest.

Funding acknowledgments:

This study was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (PI08/1381, PI11/00130), [Carlos III Health Institute, Madrid, Spain], and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) [European Fund for Regional Development]. Underlying research materials related to this manuscript are available on request from the corresponding author.

References

1. Criqui MH. Peripheral arterial disease_epidemiological aspects. *Vasc Med.* 2001; 6(3 Suppl): 3-7.
2. Mehlsen J, Wiinberg N, Joergensen BS, Schultz-Larsen P. High prevalence of peripheral arterial disease in patients with previous cerebrovascular or coronary event. *Blood Press.* 2010; 19(5): 308-12.
3. Gornik HL, Creager MA. Contemporary management of peripheral arterial disease: Cardiovascular risk-factor modification. *Cleve Clin J Med.* 2006; 73 Suppl 4: S30-37.
4. Hirsch AT, Criqui MH, Treat-Jacobson D, et al. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA.* 2001; 286(11): 1317-1324.
5. Criqui MH, Langer RD, Fronek A, et al. Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease. *N Engl J Med.* 1992; 326(6): 381-386.
6. Murabito JM, Keyes MJ, Guo CY, et al. Cross-sectional relations of multiple inflammatory biomarkers to peripheral arterial disease: The Framingham Offspring Study. *Atherosclerosis.* 2009; 203(2): 509-514.
7. Rull A, García R, Fernández-Sender L, et al. The role of combined assessment of defense against oxidative stress and inflammation in the evaluation of peripheral arterial disease. *Curr Mol Med.* 2011; 11: 453-464.
8. Cooke JP, Wilson AM. Biomarkers of peripheral arterial disease. *J Am Coll Cardiol.* 2010; 55(19): 2017-2023.
9. Tous M, Ferré N, Rull A, et al. Dietary cholesterol and differential monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in aorta and liver of apo E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 340(4): 1078-1084.

10. Marsillach J, Camps J, Ferré N, et al. Paraoxonase-1 is related to atherosclerosis, inflammation, fibrosis and PPAR delta in experimental liver disease. *BMC Gastroenterol.* 2009; 9:3. doi: 10.1186/1471-230X-9-3.
11. McDermott MM, Lloyd-Jones DM. The role of biomarkers and genetics in peripheral arterial disease. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 54(14): 1228-1237.
12. Brevetti G, Giugliano G, Brevetti L, Hiatt WR. Inflammation in peripheral artery disease. *Circulation.* 2010; 122(18): 1862-1875.
13. Rodríguez-Sanabria F, Rull A, Beltrán-Debón R, et al. Tissue distribution and expression of paraoxonases and chemokines in mouse: the ubiquitous and joint localisation suggest a systemic and coordinative role. *J Mol Histol.* 2010; 41(6):379-386.
14. Rull A, Camps J, Alonso-Villaverde C, Joven J. Insulin resistance, inflammation, and obesity: role of monocyte chemoattractant protein-1 (or CCL2) in the regulation of metabolism. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010. pii: 326580.
15. Satiroglu O, Uydu HA, Demir A, Bostan M, Atak M, Bozkurt E. Association between plasma monocyte chemoattractant protein-1 levels and the extent of atherosclerotic peripheral artery disease. *Tohoku J Exp Med.* 2011; 224(4): 301-306.
16. Coll B, Alonso-Villaverde C, Joven J. Monocyte chemoattractant protein-1 and atherosclerosis: Is there room for an additional biomarker? *Clin Chim Acta.* 2007; 383(1-2): 21-29.
17. Schnabel RB, Baumert J, Barbalić M, et al. Duffy antigen receptor for chemokines (Darc) polymorphism regulates circulating concentrations of monocyte chemoattractant protein-1 and other inflammatory mediators. *Blood.* 2010; 115(26): 5289-5299.
18. Aragonès G, Ercilla A, Barreda M, et al. Human Duffy blood group alloantigen system influences the measurement of monocyte chemoattractant

protein-1 (MCP-1) in serum but not in plasma. *Clin Lab* 2012; 58 (1-2): 185-188.

19. Alonso-Villaverde C, Coll B, Parra S, et al. Atherosclerosis in patients infected with HIV is influenced by a mutant monocyte chemoattractant protein-1 allele. *Circulation*. 2004; 110(15): 2204-2209.

20. Graham GJ, Locati M, Mantovani A, Rot A, Thelen M. The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors. *Immunol Lett*. 2012; 145(1-2): 30-38.

21. Naitza S, Porcu E, Steri M, et al. A genome-wide association scan on the levels of markers of inflammation in Sardinians reveals associations that underpin its complex regulation. *PLoS Genet*. 2012;8(1):e1002480. doi: 10.1371/journal.pgen.100248.

22. Mills JL, Conte MS, Armstrong DG, et al. The Society for Vascular Surgery Lower Extremity Threatened Limb Classification System: risk stratification based on wound, ischemia, and foot infection (WIFI). *J Vasc Surg*. 2014; 59(1): 220-234.

23. Stergiou GS, Karpettas N, Atkins N, O'Brien E. European Society of Hypertension International Protocol for the validation of blood pressure monitors: a critical review of its application and rationale for revision. *Blood Press Monit*. 2010; 15(1): 39-48.

24. Bakker K, Schaper NC; International Working Group on Diabetic Foot Editorial Board. The development of global consensus guidelines on the management and prevention of the diabetic foot 2011. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012; 28(Suppl 1): 116-118.

25. Skilton MR, Moulin P, Sérusclat A, Nony P, Bonnet F. A comparison of the NCEP-ATPIII, IDF and AHA/NHLBI metabolic syndrome definitions with relation to early carotid atherosclerosis in subjects with hypercholesterolemia or at risk of CVD: evidence for sex-specific differences. *Atherosclerosis*. 2007; 190(2): 416-422.

26. Virgos C, Martorell L, Valero J, et al. Association study of schizophrenia with polymorphisms at six candidate genes. *Schizophr Res.* 2001; 49(1-2): 65-71.
27. Simó JM, Castellano I, Ferré N, Joven J, Camps J. Evaluation of a homogeneous assay for high-density lipoprotein cholesterol: limitations in patients with cardiovascular, renal, and hepatic disorders. *Clin Chem.* 1998; 44(6): 1233-1241.
28. Matas C, Cabré M, La Ville A, et al. Limitations of the Friedewald formula for estimating low-density lipoprotein cholesterol in alcoholics with liver disease. *Clin Chem.* 1994; 40(3): 404-406.
29. Marsillach J, Mackness B, Mackness M, et al. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45(2): 146-157.
30. Li Y, Wang N, Carroll RJ. Selecting the Number of Principal Components in Functional Data. *J Am Stat Assoc.* 2013; 108(504). doi: 10.1080/01621459.2013.788980.
31. Slovut DP, Sullivan TM. Critical limb ischemia: medical and surgical management. *Vasc Med.* 2008; 13: 281-91.
32. Reckless J, Rubin EM, Verstuyft JB, Metcalfe JC, Grainger DJ. Monocyte chemoattractant protein-1 but not tumor necrosis factor-alpha is correlated with monocyte infiltration in mouse lipid lesions. *Circulation.* 1999; 99: 2310-2316.
33. Papatheodorou K, Papanas N, Papazoglou D, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 is correlated with glycemic control and peripheral arterial disease in type 2 diabetic patients with metabolic syndrome. *Angiology.* 2013; 64(3): 223-229.
34. Lijmer G, Hunink MG, van den Dungen JJ, Loonstra J, Smit AJ. ROC analysis of noninvasive tests for peripheral arterial disease. *Ultrasound Med Biol.* 1996; 22(4): 391-398.

35. Deo R, Khera A, McGuire DK, et al. Association among plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1, traditional cardiovascular risk factors, and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 44(9): 1812-1819.
36. de Lemos JA, Morrow DA, Blazing MA, et al. Serial measurement of monocyte chemoattractant protein-1 after acute coronary syndromes: results from the A to Z trial. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50(22): 2117-2124.
37. Petrková J, Szotkowska J, Hermanova Z, Lukl J, Petrek M. Monocyte chemoattractant protein-1 in patients with peripheral arterial disease. *Mediators Inflamm.* 2004; 13:39-43.
38. Hoogeveen RC, Morrison A, Boerwinkle E, et al. Plasma MCP-1 level and risk for peripheral arterial disease and incident coronary heart disease: Atherosclerosis Risk in Communities study. *Atherosclerosis.* 2005; 183: 301-307.
39. Lee WJ, Sheu WH, Chen YT, et al. Circulating CD40 ligand is elevateroscleroid only in patients with more advanced symptomatic peripheral arterial diseases. *Thromb Res.* 2006; 118(5):619-626.
40. Mortier A, Van Damme J, Proost P. Overview of the mechanisms regulating chemokine activity and availability. *Immunol Lett.* 2012; 145(1-2): 2-9.
41. Rodríguez-Gallego E, Riera-Borrull M, Hernández-Aguilera A, et al. Ubiquitous transgenic overexpression of C-C chemokine ligand 2: a model to assess the combined effect of high energy intake and continuous low-grade inflammation. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:953841. doi: 10.1155/2013/953841.
42. Anderson JD, Epstein FH, Meyer CH, et al. Multifactorial determinants of functional capacity in peripheral arterial disease: uncoupling of calf muscle perfusion and metabolism. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 54(7): 628-635.

43. Menendez JA, Alarcón T, Joven J. Gerometabolites: The pseudohypoxic aging side of cancer oncometabolites. *Cell Cycle*. 2014; 13(5): 1-11.

Estudi 2

Connecting chemokine (C-C motif) ligand 2 to coronary artery disease

Anna Hernández-Aguilera¹, Montserrat Fibla², Noemí Cabré¹, Fedra Luciano¹, Jordi Camps¹, Salvador Fernández-Arroyo¹, Vicente Martín-Paredero³, Javier A. Menendez⁴, Juan J. Sirvent², Jorge Joven^{1*}.

¹Unitat de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain.

² Department of Pathology, Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain.

³ Department of Vascular Surgery, Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain.

⁴ Molecular Oncology Group, Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI), Girona, Spain

these authors contributed equally

RESUM

La quimiocina CCL2 (de l'anglès *chemokine (C-C motif) ligand 2*) controla la migració de leucòcits a la paret de l'artèria. La funció de CCL2 està mediada per la seva unió a receptors funcionals i una posterior senyalització però CCL2 també s'uneix a receptors atípics de quimiocines (ACKRs) que tenen la capacitat d'eliminar o segrestar a aquestes quimiocines.

La nostra pregunta era on i en quina mesura CCL2 i tots dos tipus de receptors s'expressen en les artèries coronàries humanes com a resultat de l'aterosclerosi. En un estudi de necròpsies, es va comparar l'expressió de CCL2 i dels receptors relacionats entre les artèries coronàries afectades i les artèries coronàries control. L'expressió immunohistoquímica de macròfags, CCL2 i els receptors associats va ser significativament major en les artèries afectades per aterosclerosi. Els majors augments relatius van ser els de CCL2 i ACKR1 (DARC). Malgrat algunes similituds en la distribució dels receptors associats, no hi va haver correlacions amb l'expressió de CCL2, que va ser l'única variable amb exactitud predictiva de l'aterosclerosi. L'expressió de CCL2 era marginal en les artèries normals i majoritàriament restringida a les cèl·lules musculars llises.

Alguns estudis suggereixen que l'associació entre la disponibilitat de CCL2 i la resposta cel·lular és complexa. Per entendre completament aquesta relació, haurem d'explorar l'activitat i especificitat dels receptors associats i el paper confluent d'altres quimiocines. Les nostres troballes indiquen que CCL2 és potencialment útil com a marcador de diagnòstic de l'aterosclerosi i proporcionen dades que indiquen que els receptors convencionals i atípics per aquestes quimiocines estan sobreexpressats en les artèries ateroscleròtiques.

Connecting chemokine (C-C motif) ligand 2 to coronary artery disease

Anna Hernández-Aguilera¹, Montserrat Fibla², Noemí Cabré¹, Fedra Luciano-Materosclerosio¹, Jordi Camps¹, Salvador Fernández-Arroyo¹, Vicente Martín-Paredero³, Javier A. Menendez⁴, Juan J. Sirvent², Jorge Joven^{1*}.

¹Unitat de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain.

² Department of Pathology, Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain.

³ Department of Vascular Surgery, Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain.

⁴ Molecular Oncology Group, Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI), Girona, Spain

these authors contributed equally

Word-character count: 2,638

*Correspondence: jorge.joven@urv.cat

Unitat de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain.
Carrer Sant Llorenç 21, 43201, Reus, Spain.

Abstract

Background: Chemokine (C-C- motif) ligand 2 (CCL2) controls leukocyte migration into the wall of the artery. The function of CCL2 in regulating the flow of cells is mediated by signaling through functional receptors (CCR2) but CCL2 is also bound to promiscuous atypical chemokine receptors (ACKRs) with the ability to scavenge, or sequester, this chemokine. Our question was where and to what extent CCL2 and both types of receptors are expressed in human coronary arteries as a result of atherosclerosis.

Materials and methods: In a necropsy study, we compared the detection of CCL2 and related receptors in occluded coronary arteries with that in unaffected arteries.

Results: The immunohistochemical expression of macrophages, CCL2 and the associated receptors was significantly higher in diseased arteries. The highest relative increases were those of CCL2 and ACKR1. Despite some similarities in the distribution of associated receptors, there were no correlations with the expression of CCL2, which was the only variable with predictive accuracy of atherosclerosis. CCL2 expression was marginal in normal arteries and mostly restricted to smooth muscle cells. Functional networks suggest that the association between the availability of CCL2 and the cellular response is complex. To fully understand this relationship, we will need to explore the activity and specificity of associated receptors and the confluent role of other chemokines.

Conclusions: Our findings point to CCL2 as a marker potentially useful in atherosclerosis diagnosis and provide data indicating that conventional and atypical receptors for this chemokine are overexpressed in atherosclerotic arteries.

Keywords: Atherosclerosis, ACKRs, CCR2, DARC, D6, Inflammation

INTRODUCTION

Inflammation in atherosclerosis entails numerous signals governing the passage of cells and blood molecules into the wall of the artery [1-4]. Chemokines transform monocytes into macrophages, promote the response of immune cells and maintain the continuous release of chemokines in a self-maintaining progressive cycle –apparently mediating in all stages of atherosclerosis [4-6]. In order to interfere with this vicious cycle and improve our current risk factor modification strategies, we need to fully understand the control of chemokine function in arteries. In particular, chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) has been shown to be critical for the development of atherosclerosis and its function is mediated by receptors [5]. Our question was where and to what extent the expression of CCL2 and associated receptors may change in diseased arteries that have been responsible for the death of patients with coronary artery disease (CAD) as compared to healthy arteries. We reasoned that analyzing data in this final stage of chronic, low-grade inflammation might support emergent therapies targeting the relationship between metabolic energy and the inflammatory process, reducing the plasticity of macrophages or facilitating immunotherapy [7-10].

The binding of CCL2 to its functional receptor (CCR2) is fostering seminal research but the lack of detail regarding what CCL2 controls and which is the underlying mechanism restricts the interpretation of results [9-16]. Evidence suggest that CCL2 regulates pleiotropic signaling pathways influencing numerous cellular processes. For example, the injection of mesenchymal stem cells in mice reduces atherosclerosis development and decreases CCL2 levels [10]; CCL2 also induces migration of adventitial fibroblasts and mesenchymal stem cells into the intima [13]. It is also important to consider atypical chemokine receptors (ACKRs) because they bind to CCL2 without eliciting a defined response but forming active chemokine gradients [17, 18]. The best-known ACKRs are ACKR1 (Duffy antigen receptor for chemokines; DARC) and ACKR2 (chemokine binding protein 2; CCBP2 or D6). Both are promiscuous and can bind to a range of C-C chemokines [19, 20]. In cells, CCL2 rapidly dissociates from

ACKR2, which is recycled back to the cell surface for further chemokine capture; ACKR1 does not mediate chemokine internalization [21, 22]. The role of ACKRs regulating acute inflammation seems supported [23]. The role of ACKRs in chronic, low-grade inflammatory diseases has been less studied but recent findings indicate that the genetic deletion of *Ackr1* in *ApoE*^{-/-} mice impairs atherosclerosis development following a marked reduction in *Ccl2* levels [24].

It may be argued that the expression of ACKRs and the availability of functional CCL2 could be coordinately regulated to modulate the inflammatory response. To study this relationship we have measured for the first time, the expression of CCL2 and related receptors in human coronary arteries and we found a higher expression in arteries with advanced atherosclerosis.

MATERIALS AND METHODS

Research design

We designed a pre-set duration, observational, cross-sectional study in consecutive male decedents who underwent autopsy between December 2012 and November 2014 at our settings and in which CAD was firmly established as the cause of death. The local Ethics Committee, which acts as the Institutional Review Board, approved the study protocol and procedures (EPINOLS/12-03-29/3proj6). Written informed consents were obtained from next of kin of the deceased for autopsy and access to clinical records and tissues. Accordingly, we excluded decedents with sudden, out of Hospital, death. Because CCL2 has been associated with complex diseases [5], we also excluded decedents with evidences of recent infection, diabetes, major metabolic disturbances, liver disturbances or neoplasms. In each corpse we obtained at least one major coronary artery narrowed >80% in cross sectional area by atherosclerotic plaque or associated thrombus. For comparisons, we obtained coronary arteries from 19 men dead as a result of road traffic accidents during the same period of time. For other associations, we arbitrarily selected specimens with mild (less than 20%),

moderaterosclerosi (between 21% and 50%) or severe (more than 50%) narrowing. We examined a total of 123 specimens from 87 donors.

Histological examination

The specimens were immediately fixed in 10% neutral-buffered formalin and embedded in paraffin. Serial sections of 4µm were placed on a 45°C waterosclerosir bath to expand to its original size before staining procedures with hematoxylin and eosin, Alizarin Red and Masson's Trichrome reagents in order to assess the structure and extent of fibrosis in the arteries and to visualize the localization of calcium phosphaterosclerosi. The intima and media thickness (IMT) was measured in these sections.

Slides were loaded in an automaterosclerosid slide stainer Autostainer Universal™ (Dako, Denmark) including sections (in triplicaterosclerosi) for immunohistochemical analyses after standard procedures for manual de-waxing and heat-induced epitope retrieval. We added a blocking step for 25 minutes at room temperature prior to incubation with the primary antibody. Macrophages were detected by the presence of the CD68 antigen with reagents provided by Dako. Primary antibodies, validaterosclerosid by the suppliers, against CCL2 (ab9669), CCR2 (ab21667) and ACKR2 (ab1658) were obtained from Abcam (Cambridge, UK) and used at dilutions of 1:200, 1:100, and 1:500 respectively. ACKR1 (PAB13254) antibody was from Abnova (Taipei, Taiwan) and used at a dilution of 1:200. Biotinylaterosclerosid secondary antibodies (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA) were used at a dilution of 1:200. Detection was performed with the ABC peroxidase system (Vector) and DAB peroxidase substraterosclerosi (Dako). The slides were counterstained with Mayer's hematoxylin. The choice of CCL2 and CCR2 antibodies was based on previous results [25]. The ACKR1 and ACKR2 antibodies required further comparison with other available antibodies (HPA013819 and HPA016421, from Sigma; PA1-21614, from Affinity Bioreagents; and NB100-2421 from Novus Biologicals). We then compared the pattern of immunostaining previously described for breast cancer tissue as described [26] and we found no significant differences among antibodies. Accordingly, selected sections from breast tissue were used as positive controls (Figure S1). Sections from

specimens not expressing ACKR1 or ACKR2 were used as negative tissue control to confirm the absence of background staining. Similarly, we used negative controls from study samples by omitting the primary antibodies from the incubations. The evaluation of staining with arbitrary scores based on proportion of stained cells and intensity correlaterosclerosid with automaterosclerosid calculations of stained area using the image analysis system (AnalySIS™, AnalySIS, Munster, Germany) and we used these values for analysis as described [27]. Since diseased arteries were greaterosclerosir than the histological field used for analyses, several pictures were combined to calculaterosclerosi the percentage of stained area with respect to the total area of the artery. Pictures include a size bar for assessment of magnification.

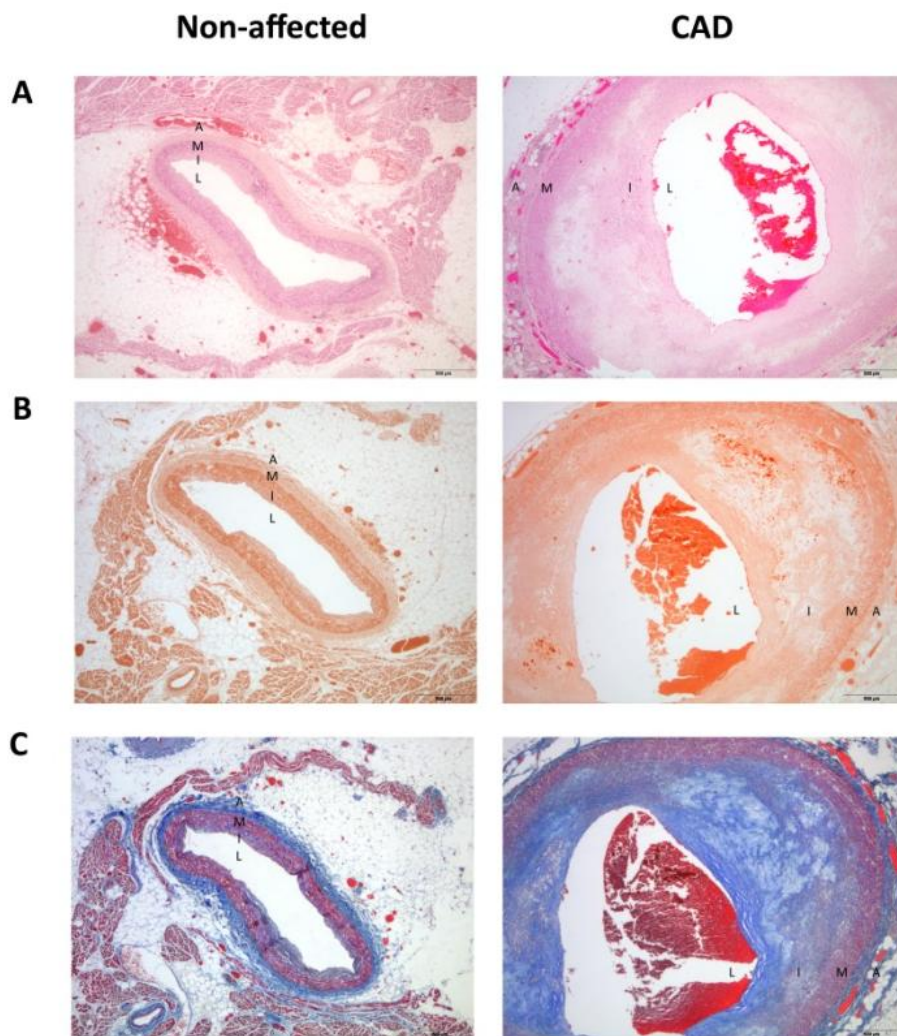
Statistical analyses

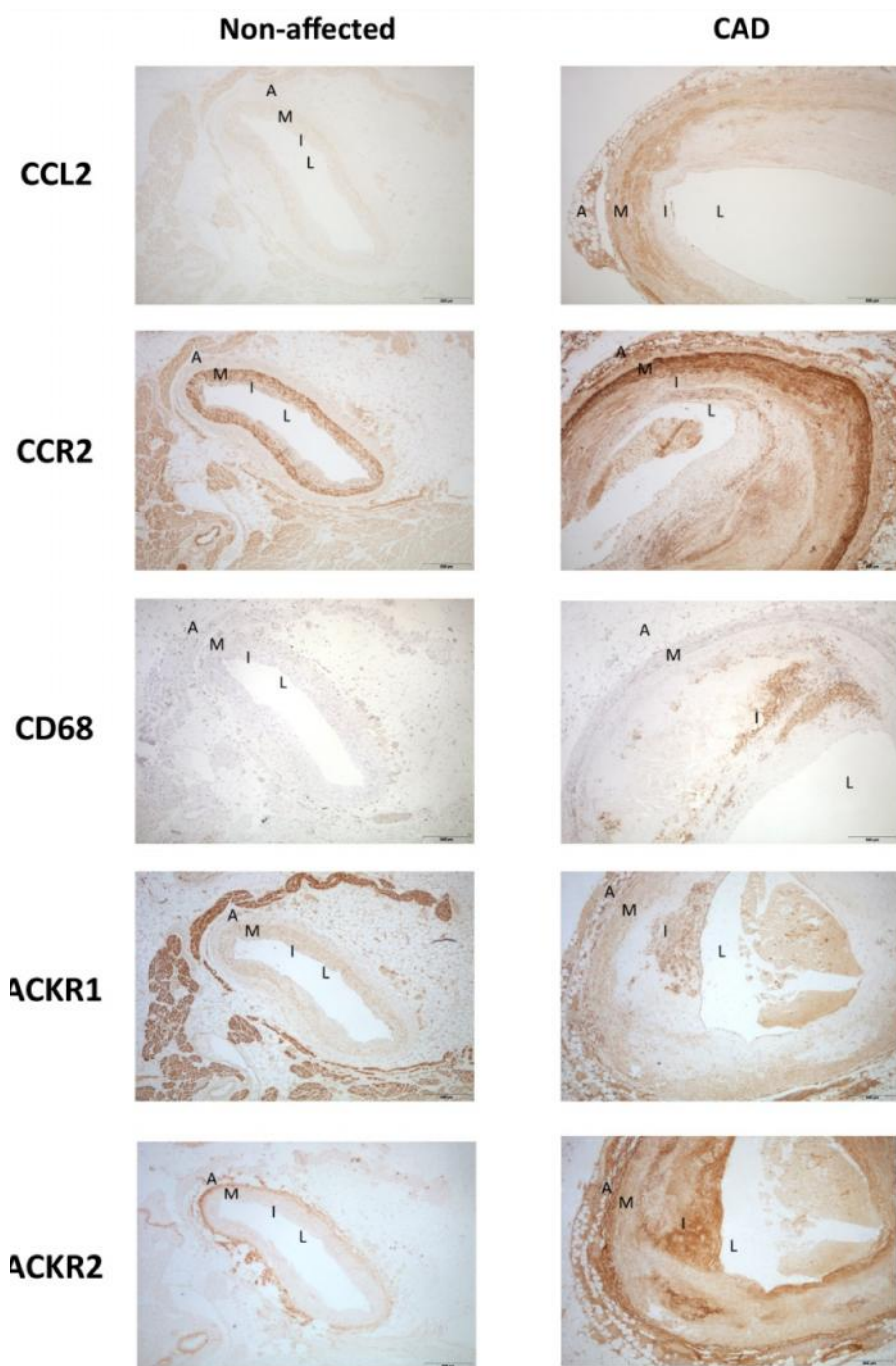
Inter-observer agreement was assessed and discrepancies (<5%) were resolved. The Student's t-test or Mann-Whitney's test were used to assess the difference between groups according to the distribution of variables and the chi-squared test to compare caterosclerosigorical variables. Spearman correlation coefficients were used to evaluaterosclerosi the degree of association between variables. To correct for multiple testing we used the False Discovery Raterosclerosi estimaterosclerosid using the Q-value. The true and false positive raterosclerosis at various threshold settings were used to plot receiver operating characteristic (ROC) curves to assess variables as predictors. The Statistical Package for the Social Sciences, version 19.0 (SPSS Inc, IBM Corp, Chicago, IL, USA) and MetaboAnalyst 3.0®, were used for analyses. STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) was used as a biological database and web resource of known and predicted protein-protein interactions (<http://string-db.org>).

RESULTS

In CAD patients, compared to controls, hypertension was more prevalent and the incidence of affected valves, age, serum triglyceride concentration, heart weight and ventricular thickness were significantly

increased (Table 1). The proportion of daily smokers was similar to that found in controls and there were no differences in body mass index relating weight to height – in mean (SD) kg/m^2 , 25.7 (4.1) for controls and 24.8 (4.0) for CAD patients. The modified tissue architecture of diseased arteries and the significantly higher ($p < 0.001$) IMT values, in median (IQR), of diseased arteries [586 μm (452.7-865.1)] as compared with controls [379 μm (265.8-467.8)] were confirmed by histologic examination. Macrophages (CD68 staining) were scarcely observed in most normal or minimally affected arteries but there were frequent in the newly formed intima and adventitia of affected arteries (Figures 1 and 2).



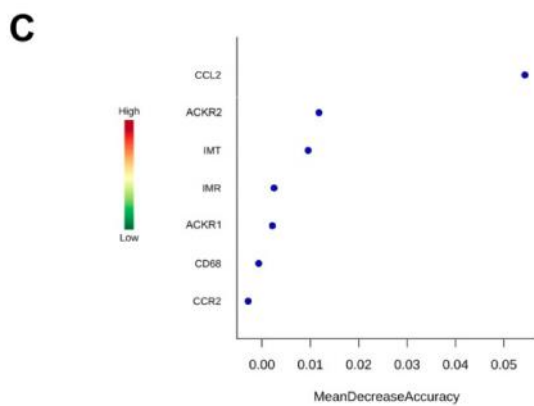
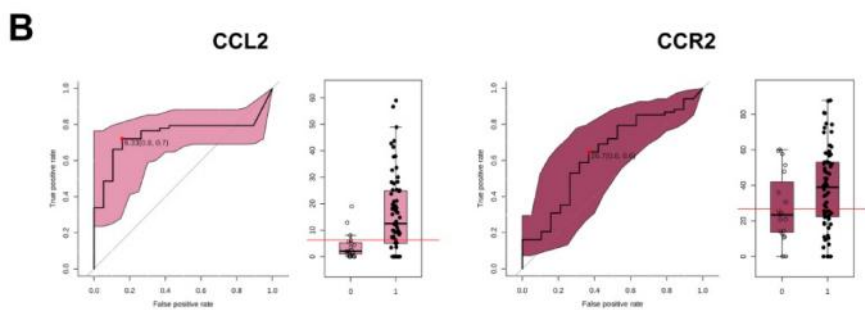
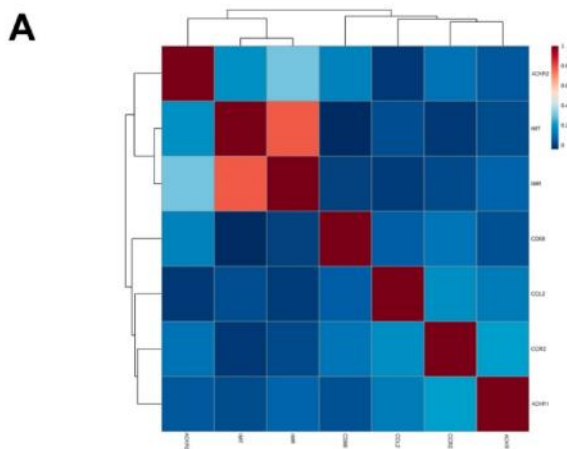


displayed significant differences (see Table 1 for quantitative analysis). Although there was not a quantitative correlation, CCL2 and CCR2 expressions were apparent in the same layers of the artery wall. Conversely, the expression of ACKR1 (DARC) and ACKR2 (D6) differed in intensity and distribution (L is Lumen, I is Intima, M is Media and A is Adventitia).

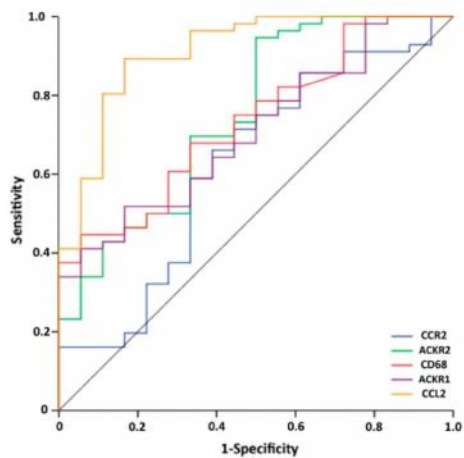
The immunohistochemical expression of the assayed proteins was significantly higher in diseased arteries than in controls. Quantitative measurements are summarized in Table 1 and illustrated in Figures 2, S2 and S3. The highest relative increases were those of CCL2 and ACKR1 (i.e., both were equally responsive to induction). CCL2 expression was marginally evident (26%) in normal arteries and mostly restricted to smooth muscle cells. In affected arteries, CCL2 expression was increased in all layers and all specimens, especially in macrophages and adventitial tissue, but remained more evident in the tunica media; the staining of endothelial cells was faint. Contrarily, CCR2 was expressed in all healthy and affected specimens. In controls, CCR2 was predominant in smooth muscle cells but widely distributed in all layers. In affected arteries, the relative expression was higher and included both endothelial cells and macrophages but the difference was only significant in the adventitial tissue indicating a likely higher response in this tunica. The expression of CCR2 was observed in more cells and with higher intensity but the distribution of both CCL2 and CCR2 was qualitatively similar in smooth muscle cells. The expression of ACKR1 was not detected in all specimens (63% in controls and 81% in affected arteries). It was also relatively weak in control arteries and more evident in smooth muscle cells. Of note, the expression was increased over 10-fold in those affected arteries that were positively stained. Similar to CCL2, there was a significant increase in the proportion of stained cells in all layers. Conversely, the expression of ACKR2 was more intense and widely distributed than that of ACKR1. The quantitative expression of ACKR2 was similar to that observed for CCR2 but undetectable in 16% of control arteries. It was detected in endothelial cells, smooth muscle cells and more importantly in the adventitia and cells surrounding adipocytes. In affected arteries, ACKR2 was present in all specimens but the expression was quantitatively not different in the intima

and the media with respect to controls. Interestingly, however, the increased expression in adventitia was statistically significant.

We also explored whether the expression of CCL2 and the associaterosclerosid receptors could represent a potential marker of both the presence and severity of atherosclerosis. We found no dependence between measured variables using a Spearman-based correlation matrix and the model of predictions was constructed using Random Forest – a non-parametric and bias-free method– that pointed CCL2 as the most important variable to indicaterosclerosi atherosclerosis (Figure 3). This finding was further confirmed via ROC curves using the combined variables (Figure 4). Collectively, the data suggest that the increased expression of CCL2 is likely the initial event and that the predictive value of CCL2 expression is not strictly associaterosclerosid with occlusion of the arteries. Values for the expression of the associaterosclerosid receptors showed no predictive value but CCR2 expression discriminaterosclerosid CAD samples from controls (Figure 4).

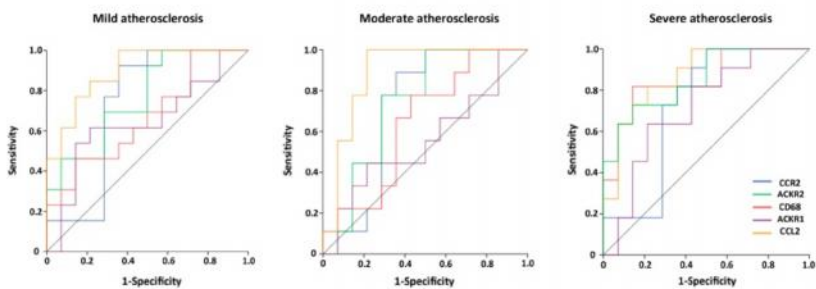


A



Variable	Area	Error	P-value	95% CI		Sensitivity (%)	Specificity (%)
				Lower	Upper		
CCR2	0.624	0.079	0.115	0.469	0.779	80.0	38.9
ACKR2	0.749	0.069	0.002	0.614	0.884	80.0	50.0
CD68	0.734	0.063	0.003	0.611	0.857	80.0	44.4
ACKR1	0.707	0.064	0.008	0.581	0.834	80.0	38.9
CCL2	0.911	0.041	<0.001	0.831	0.991	80.0	89.0

B



	CCL2	Area	Error	P-value	95% CI		Sensitivity (%)	Specificity (%)
					Lower	Upper		
Mild atherosclerosis	0.896	0.059	<0.001	0.780	1.000	80.0	78.6	
Control vs Moderate atherosclerosis	0.889	0.072	0.002	0.748	1.000	80.0	78.6	
Severe atherosclerosis	0.870	0.071	0.002	0.731	1.000	80.0	78.6	

We next explored the predicted protein-protein interactions and we found no evidence of associations between ACKR1 and ACKR2. Therefore, the interactions between each receptor and CCL2 were examined separately (Figure S4). The functional networks were similar for each receptor. Predicted partners were derived from analyzing information of sequenced genes and included additional chemokine receptors and ligands, suggesting a high level of complexity in interpreting data. There was no evidence in database of co-expression among these proteins in humans but the evidence for co-expression in other species, although weak, combined with our results, suggest that this possibility cannot be discarded.

DISCUSSION

The expression of CCL2 and associated receptors is increased in arteries with atherosclerosis. Our study uncovers complexities in the interpretation of chemokine function but favors CCL2 as a potentially useful marker in atherosclerosis diagnosis. We also provide prospects for further studies to clarify the causal roles of CCL2 signaling and upstream inflammation in atherosclerosis and to promote CCL2 as an attractive target since it exerts effects via cell surface receptors that are readily druggable.

The notion that CCL2 may represent an important cardiovascular risk factor is mostly based on its inflammatory function as chemo-attractant but the complexity of CCL2 biology suggests additional roles [5, 6, 21, 26, 28]. However, there are possible intricacies in the interpretation of data concerning the value of plasma CCL2 for risk stratification after acute coronary syndromes and to predict the risk of atherosclerosis [28-30]. The CCL2-CCR2 pairing appears to be the prevalent interaction but confirmation is challenging because CCL2 and CCR2 bind other receptors and ligands respectively, suggesting redundant effects [12]. Here we establish that a wide range of cells in the artery wall including endothelial and smooth muscle cells expresses CCL2 and CCR2. The expression is apparently constitutive and induced, although such induction is limited to adventitial tissue in the case of CCR2. Of note, we only detect CCR2B – one of the two isoforms of CCR2 due to alternative splicing. This is the predominant form (>90%) but it might

represent a limitation. The expression of ACKR2 is also mainly constitutive and induction is weak and limited to the adventitia. Contrarily, the induction in the expression of ACKR1 is quantitatively significant in a wide range of cells. The expression of ACKRs in the vessel wall with the ability to scavenge, or sequester, CCL2 is important because their different expression profiles in particular cell types and layers of the artery wall complicate the availability of circulating CCL2 for other cellular response [12, 31]. Interestingly, genome-wide association studies (www.genome.gov/gwastudies) have identified variants at loci 1q23.2 (rs 12075) of ACKR1 gene and 3p22.1 (rs 2228467) of ACKR2 gene associated with circulating CCL2 levels suggesting a possible connection between CCL2 and disease. It is possible that these variants alter the binding of CCL2 to these receptors but our results suggest that altered receptor expression is probably a more important factor than altered binding properties. Moreover, the imprecision of the CCL2 assay and differences in blood sample processing also contribute [12, 30].

Although the inherent limitations prevent potential speculations and some drugs targeting CCL2 or CCL2-associated receptors have reached the phase of clinical trials with contradictory success [32], our results support the key role of CCL2 in the pathogenesis of CAD. For example, a clinicopathologic correlation found at necropsy with those reported earlier – or elsewhere – is probably meaningless [33] but this selected sample shows associations between inflammation, vascular calcification and remodeling in atherosclerosis [34]. Specifically, CCL2 expression, despite the lack of correlation with the expression of associated receptors, was the only value with sufficient predictive accuracy of atherosclerosis and apparently independent of the degree of occlusion. The association between CCL2 and macrophages also support our previous findings indicating that the CCL2-CCR2 axis regulates atherosclerosis macrophage polarization by upregulating the additional production of CCL2 [35] and the high and combined expression of CCL2 and CCR2 in the media, associated with calcium deposits, may also suggest that their binding may contribute to modifications in smooth muscle cells [36]. Finally, the increased expression of ACKR1 and ACKR2 in

affected coronary arteries should not be considered coincidental but strongly suggestive of the perceived function of ACKRs in the regulation of inflammation. Namely, the higher complexity derived from considering simultaneously the formation of passive CCL2 gradients and active CCL2 gradients formed by ACKRs that scavenge chemokines locally [37-40]. The measurement of expression, however, does not provide insight into receptor specificity or activity. Human studies directed to understand mechanisms regulating chemokine activity and availability and to assess efficacious drugs would require novel assays to measure *in vivo* the functional properties of CCL2 and its associations with cellular receptors.

We conclude that our data reinforce a model in which the continuous production of CCL2 in chronic inflammation activates atherosclerosis through mechanisms with a potential predictive value of atherosclerosis. To fully understand the pathogenesis of CAD, further studies should consider how and to what extent the binding of CCL2 to atherosclerosis receptors transduce signals, and/or mediate atherosclerosis scavenging.

Acknowledgements

Supported by grants from the Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica, Carlos III Health Institute, Madrid, Spain and the European Fund for Regional Development (FEDER), No. PI11/00130 and PI15/00285.

Authors' contribution

J. Joven, V. Martín-Paredero and J.J. Sirvent designed the study. M. Fibla supervised the collection of data. J. Camps and J.A. Menendez contributed important reagents and valuable insights. A. Hernández-Aguilera, F. Luciano-Materosclerosio, N. Cabré and S. Fernández-Arroyo were active in laboratory tasks. A. Hernández-Aguilera, M. Fibla and J. Joven supervised the statistical analyses and interpreted the results. J. Joven wrote the manuscript, which was discussed, modified and finally approved by all co-authors.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest associated with this manuscript.

References

- 1 Viola J, Soehnlein O. Atherosclerosis – A matter of unresolved inflammation. *Semin Immunol* 2015;**27**:184–193.
- 2 Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;**352**:1685-1695.
- 3 Khan R, Spagnoli V, Tardif JC, L'Allier PL. Novel anti-inflammatory therapies for the treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2015;**240**:497-509.
- 4 Schultze JJ, Schmieder A, Goerdts S. Macrophage activation in human diseases. *Semin Immunol* 2015;**27**(4):249-256.
- 5 Coll B, Alonso-Villaverde, Joven J. Monocyte chemoattractant protein-1 and atherosclerosis: is there room for an additional biomarker?. *Clin Chim Acta* 2007;**383**:21-29.
- 6 Ramji DP, Davies TS. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015;**26**(6):673-685.
- 7 Menendez JA, Cufí S, Oliveras-Ferraros C, Vellon L, Joven J, Vazquez-Martin A. Gerosuppressant metformin: less is more. *Aging (Albany NY)* 2011;**3**:348-362.
- 8 Schultze JL. Reprogramming of macrophages-new opportunities for therapeutic targeting. *Curr Opin Pharmacol* 2015;**26**:10-15.
- 9 Izquierdo E, Cuevas VD, Fernández-Arroyo S, Riera-Borrull M, Orta-Zavalza E, Joven J, *et al.* Reshaping of human macrophage polarization

through modulation of glucose catabolic pathways. *J Immunol* 2015;**195**:2442-2451.

10 Frodermann V, van Duijn J, van Pel M, van Santbrink PJ, Bot I, Kuiper J, *et al.* Mesenchymal Stem Cells Reduce Murine Atherosclerosis Development. *Sci Rep* 2015;**5**:15559.

11 Kim SM, Kim BY, Son Y, Jung YS, Eo SK, Park YC, *et al.* 7 - Hydroxycholesterol induces inflammation by enhancing production of chemokine (C-C motif) ligand 2. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;**467**:879-84.

12 Schnabel RB, Baumert J, Barbalic M, Dupuis J, Ellinor PT, Durda P, *et al.* Duffy antigen receptor for chemokines (Darc) polymorphism regulaterosclerosis circulating concentrations of monocyte chemoattractant protein-1 and other inflammatory mediators. *Blood* 2010;**115**:5289-5299.

13 Manka D, Chatterjee TK, Stoll LL, Basford JE, Konanah ES, Srinivasan R, *et al.* Transplanted perivascular adipose tissue acceleraterosclerosis injury-induced neointimal hyperplasia: role of monocyte chemoattractant protein-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;**34**:1723–1730.

14 Alegret JM, Aragonès G, Elosua R, Beltrán-Debón R, Hernández-Aguilera A, Romero-Menor C, *et al.* The relevance of the association between inflammation and atrial fibrillation. *Eur J Clin Invest* 2013;**43**:324-31.

15 Auvynet C, Baudesson de Chanville C, Hermand P, Dorgham K, Piesse C, Pouchy C, *et al.* ECL1i, d(LGTFLKC), a novel, small peptide that specifically inhibits CCL2-dependent migration. *FASEB J.* 2016 Mar 15. pii: fj.201500116.

16 Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006;**354**:610-621.

17 Tabata T, Mine S, Kawahara C, Okada Y, Tanaka Y. Monocyte chemoattractant protein-1 induces scavenger receptor expression and

monocyte differentiation into foam cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;**305**:380-385.

18 Ford LB, Cerovic V, Milling SW, Graham GJ, Hansell CA, Nibbs RJ. Characterization of conventional and atypical receptors for the chemokine CCL2 on mouse leukocytes. *J Immunol* 2014;**193**:400-411.

19 Tomasdottir V, Vikingsson A, Hardardottir I, Freysdottir J. Murine antigen-induced inflammation –a model for studying induction, resolution and the adaptive phase of inflammation. *J Immunol Methods* 2014;**415**:36-45.

20 Hansell CA, Hurson CE, Nibbs RJ. DARC and D6: silent partners in chemokine regulation? *Immunol Cell Biol* 2011;**89**:197-206.

21 Novitzky-Basso I, Rot A. Duffy antigen receptor for chemokines and its involvement in patterning and control of inflammatory chemokines, *Front Immunol* 2012;**3**:266.

22 Locati M, Torre YM, Galliera E, Bonecchi R, Bodduluri H, Vago G, *et al.* Silent chemoattractant receptors: D6 as a decoy and scavenger receptor for inflammatory CC chemokines. *Cytokine Growth Factors Rev* 2005;**16**:679-686.

23 Nibbs RJ, Graham GJ. Immune regulation by atypical chemokine receptors. *Nat Rev Immunol* 2013;**13**:815-829.

24 Wan W, Liu Q, Lionakis MS, Marino AP, Anderson SA, Swamydas M, *et al.* Atypical chemokine receptor 1 deficiency reduces atherogenesis in ApoE-knockout mice. *Cardiovasc Res* 2015;**106**(3):478-487

25 Hernández-Aguilera A, Sepúlveda J, Rodríguez-Gallego E, Guirro M, García-Heredia A, Cabré N, *et al.* Immunohistochemical analysis of paraoxonases and chemokines in arteries of patients with peripheral artery disease. *Int J Mol Sci* 2015;**16**:11323-11338.

26 Yu KD, Wang X, Yang C, Zeng XH and Shao ZM. Host genotype and tumor phenotype of chemokine decoy receptors integrally affect breast cancer relapse. *Oncotarget* 2015; **6**(28): 26519-26527.

- 27 Aukrust P, Halvorsen B, Yndestad A, Ueland T, Oie E, Otterdal K, *et al.* Chemokines and cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;**28**:1909-1919.
- 28 de Lemos JA, Morrow DA, Blazing MA, Jarolim P, Wiviott SD, Sabatine MS, *et al.* Serial measurement of monocyte chemoattractant protein-1 after acute coronary syndromes: results from the A to Z trial. *J Am Col Cardiol* 2007;**50**:2117-2124.
- 29 van Wijk DF, van Leuven SI, Sandhu MS, Tanck MW, Hutten BA, Wareham NJ, *et al.* Chemokine ligand 2 genetic variants, serum monocyte chemoattractant protein-1 levels, and the risk of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;**30**:1460-1466.
- 30 Rull A, Hernández-Aguilera A, Fibla M, Sepúlveda J, Rodríguez-Gallego E, Riera-Borrull M, *et al.* Understanding the role of circulating chemokine (C-C motif) ligand 2 in patients with chronic ischemia threarterosclerosing the lower extremities. *Vasc Med* 2014;**19**:442-451.
- 31 Zweemer AJM, Toraskar J, Heitman LH and Ijzerman AP. Bias in chemokine receptor signaling. *Trends Immunol* 2014;**35**:243–252.
- 32 Schall TJ, Proudfoot EI. Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors. *Nat. Rev. Immunol* 2011;**11**:355–363.
- 33 Roberts WC, Potkin BN, Solus DE and Reddy SG. Mode of death, frequency of healed and acute myocardial infarction, number of major epicardial coronary arteries severely narrowed by atherosclerotic plaque, and heart weight in fatal atherosclerotic coronary artery disease: analysis of 889 patients studied at necropsy. *J Am Col Cardiol* 1990;**15**:196-203.
- 34 Bessueille L, Magne D. Inflammation: a culprit for vascular calcification in atherosclerosis and diabetes. *Cell Mol Life Sci* 2015;**72**:2475–2489.
- 35 Sierra-Filardi E, Nieto C, Domínguez-Soto A, Barroso R, Sánchez-Materosclerosios P, Puig-Kroger A, *et al.* CCL2 shapes macrophage

polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. *J Immunol* 2014;**192**:3858-3867.

36 Lin HL, Ueng KC, Hsieh YS, Chiang WL, Yang SF, Chu SC. Impact of MCP-1 and CCR-2 gene polymorphisms on coronary artery disease susceptibility. *Mol Biol Rep* 2012;**39**:9023-9030.

37 Fra AM, Locati M, Otero K, Sironi M, Signorelli P, Massardi ML, *et al.* Cutting edge: scavenging of inflammatory CC chemokines by the promiscuous putatively silent chemokine receptor D6. *J Immunol* 2003;**170**:2279-2282.

38 Fukuma N, Akimitsu N, Hamamoto H, Kusuhara H, Sugiyama Y, Sekimizu K. A role of the Duffy antigen for the maintenance of plasma chemokine concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;**303**:137-139.

39 Cancellieri C, Caronni N, Vacchini A, Savino B, Borroni EM, Locati M, *et al.* Structure-function and biological properties of the atypical chemokine receptor D6. *Mol Immunol* 2013;**55**:87-93.

40 Dona E, Barry JD, Valentin G, Quirin C, Khmelinskii A, Kunze A, *et al.* Directional tissue migration through a self-generated chemokine gradient. *Nature* 2013;**503**:285–289

DISCUSSIÓ

En els últims anys, els canvis en l'estil de vida i les modificacions dels hàbits alimentaris han provocat un augment de malalties com l'obesitat, la dislipèmia, la hipertensió i la diabetis *mellitus*. Entre elles, destaca també l'aterosclerosi, una malaltia crònica amb una alta morbiditat i mortalitat a tot el món, segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS). Es tracta d'una malaltia amb fases asimptomàtiques, i per tant, la recerca de biomarcadors per millorar la seva detecció és essencial. En ambdós estudis realitzats en aquesta tesi, la població afectada presentava un o diversos factors de riscs cardiovasculars^{242,243}. L'aterosclerosi sol afectar majoritàriament a la població masculina amb tendència a ser fumadora i patir hipertensió, factors característics de persones que desenvolupen l'aterosclerosi, i en conseqüència persones amb un alt risc cardiovascular²⁴³. Com que es tracta d'una malaltia relacionada amb l'envelliment, a major edat, pitjor pronòstic. Els pacients amb malaltia arterial coronària (MAC) moren principalment a causa de la pròpia malaltia, aproximadament a la sexta dècada de la vida.

La formació de la placa ateroscleròtica i la seva progressió es caracteritza per una disfunció de les cèl·lules endotelials, l'acumulació d'agregats de les lipoproteïnes en la capa íntima del vas i la migració de monòcits a través de l'endoteli i la seva diferenciació a macròfags. La peroxidació dels lípids està relacionada amb la progressió de la malaltia de l'estria grassa a la placa ateroscleròtica avançada. Els pacients amb malaltia arterial perifèrica (MAP) simptomàtica representen una condició en la qual l'extensió dels vasos afectats (vasos de gran calibre) podria garantir una alta càrrega d'aterosclerosi comparada amb els pacients amb MAC, on l'afectació es produeix en vasos de petit calibre. Per això era probable esperar que hi hagués diferències qualitatives i quantitatives en els factors moleculars implicats en la progressió de la malaltia.

En l'aterosclerosi, la inflamació i l'estrès oxidatiu hi juguen un paper clau. La inflamació crònica de la paret del vas és contínua degut a la migració constant de cèl·lules a dins de la lesió ateroscleròtica. Les quimiocines i els receptors de quimiocines, juntament amb altres molècules quimioattractants i d'adhesió, són els principals mediadors per facilitar aquest procés. Moltes quimiocines i receptors (CC, CX3C i CXC) així com altres factors

quimiotàctics (per exemple els leucotriens) han estat implicats en l'aterogènesi, però només uns pocs s'han validat com patògens. No obstant això, degut al coneixement limitat del sistema de les quimiocines i l'eix quimiocina/receptor, la translació de la investigació a la població humana és complexa, i les limitacions de les tècniques actuals dificulten l'explotació terapèutica del sistema de les quimiocines a l'aterosclerosi.

Una de les quimiocines més estudiades és la CCL2 (de l'anglès *chemokine (C-C motif) ligand 2*), també coneguda com a proteïna quimioattractant de monòcits 1, que està fortament relacionada amb l'aterosclerosi en diversos estudis en animals i humans²⁴⁴. En animals modificats genèticament, s'ha vist que com més s'expressa CCL2 o el seu receptor funcional CCR2, més gran és la probabilitat de desenvolupar aterosclerosi^{242,245}. Per contra, la disminució de CCL2 o CCR2 s'ha relacionat amb una disminució significativa en el desenvolupament de plaques ateroscleròtiques²⁴⁶. Els estudis en éssers humans tenen resultats controvertits. En l'actualitat, no existeixen eines analítiques adequades per arribar a conclusions fermes respecte al valor de la concentració de CCL2 en plasma com un biomarcador de l'aterosclerosi, però l'evidència experimental suggereix que CCL2/CCR2 s'ha d'estudiar com un objectiu de diagnòstic, pronòstic i terapèutic.

En realitzar el **primer estudi**, ens vam adonar que la prevalença de malaltia arterial perifèrica, una condició complexa, multifactorial i parcialment incompresa, probablement augmentarà en els pròxims anys. Aquesta malaltia comporta importants despeses al sistema de salut, especialment en el cas dels pacients que desenvolupen isquèmia crítica de les extremitats. Aquesta malaltia es manifesta en forma d'ulceracions persistents, dolor i amputacions en individus diabètics^{247,248}. En el nostre estudi, vam observar que la modificació dels factors de risc té una mínima aplicació en aquesta condició i la gestió clínica disponible per a aquests pacients és pobre i amb un pronòstic pessimista²⁴⁹⁻²⁵¹. Actualment, la millor prova diagnòstica és l'arteriografia, que pot realitzar-se mitjançant el TAC o ressonància magnètica²⁵². En ser una tècnica invasiva, cada vegada està

més en desús per al diagnòstic, i per això se sol utilitzar l'índex turmell-braç, que amb uns resultats inferiors a 0.90 ofereix una sensibilitat del 95% i una especificitat del 99.9%²⁵³.

L'aterosclerosi es considera una malaltia inflamatòria i en l'actualitat s'accepta que CCL2 està implicada en la seva patogènesi, ja que està present en les plaques ateroscleròtiques juntament amb els macròfags²⁵⁴. En models animals en els quals CCL2 s'ha eliminat genèticament, s'evidencia que aquesta deficiència redueix l'aterosclerosi, mentre que la sobreexpressió n'augmenta la seva progressió^{255,256}. D'altra banda, la supressió de CCL2 en ratolins deficients també en apolipoproteïna E (ApoE) i alimentats amb una dieta de rica en greix impedia l'acumulació de macròfags i la formació de lesions ateroscleròtiques²⁵⁷.

Els nivells plasmàtics de CCL2 promouen el reclutament de monòcits i altres cèl·lules immunitàries cap a la paret arterial²⁵⁸. Només tres estudis proporcionen dades per avaluar CCL2 en plasma com a biomarcador per l'aterosclerosi. McDermott *et al.*²⁵⁹ van mesurar la concentració sèrica de CCL2 en la cohort de Framingham, hi va haver una correlació significativa amb l'edat, el tabaquisme, triglicèrids, índex de massa corporal i la relació cintura-maluc. No obstant això, aquestes covariables expliquen només el 6% de la variabilitat de CCL2 en sèrum, que a la vegada, no es van associar amb la prevalença d'infart de miocardi en models multivariants. De la mateixa manera, Iwai *et al.*²⁶⁰ va informar que la concentració CCL2 està altament correlacionada amb la malaltia ateroscleròtica de la caròtida, però aquesta associació no tenia importància en el model multivariant. En aquest estudi, però, no hi havia dades sobre la concentració de CCL2 en plasma en pacients amb infart de miocardi. Finalment, Mosedale *et al.*²⁶¹ van avaluar el paper de la concentració de CCL2 en plasma en la predicció de la càrrega ateroscleròtica i la correlació amb la puntuació de risc de Framingham però no van trobar cap relació significativa.

Actualment, el valor de CCL2 com a marcador de risc cardiovascular s'ha avaluat sobretot en la malaltia coronària²⁶²⁻²⁶⁵. Encara

que no hi ha cap raó per excloure la seva rellevància en l'aterosclerosi de les extremitats inferiors^{266,267}, els resultats són sovint contradictoris²¹⁴.

En el nostre estudi, els pacients amb malaltia arterial perifèrica mostraven concentració de CCL2 tant sèrica com plasmàtica més elevada que els individus control. Tot i això, es van identificar alguns factors que limiten la interpretació dels nostres resultats. Per exemple, la concentració de CCL2 en plasma és considerablement més baixa que en el sèrum i la interpretació varia en funció de la mesura utilitzada^{228,268,269}. Les nostres dades mostren que això no és una troballa anecdòtica, ja que la interpretació no és senzilla, sobretot si hi ha altres possibles determinants biològics (per exemple, la diabetis mellitus). A més, també s'ha de tenir en compte l'efecte del tractament mèdic que reben els pacients en el moment de l'estudi, ja que la interacció amb aquests fàrmacs i la mitjana de vida d'aquesta molècula ens dóna variacions en la implicació d'aquesta quimiocina en les lesions ateroscleròtiques. Hi ha diversos fàrmacs que poden modular tant l'expressió com la concentració de CCL2, com les estatines, que mitjançant la inhibició de la HMGCoA reductasa, actuen com a potents inhibidores de l'expressió de CCL2²⁷⁰. Estudis en humans han confirmat una influència beneficiosa de la teràpia hipolipemiant, amb estatines i/o fibrats, en la reducció de la concentració de CCL2 en plasma²⁷¹⁻²⁷⁶. Aquesta reducció s'incrementa encara més quan els pacients amb hipercolesterolèmia i hipertensió van ser tractats amb una combinació d'estatines i un antagonista del receptor de l'angiotensina II^{277,278}. També ha estat estudiada la resposta de CCL2 a les tiazolidinediones en diferents grups de pacients. En pacients diabètics amb malaltia de l'artèria coronària, el tractament amb rosiglitazona va ser efectiu reduint la concentració plasmàtica de CCL2²⁷⁹. Altres fàrmacs àmpliament utilitzats en pacients afectats per l'aterosclerosi també influeixen en la concentració de CCL2. L'aspirina, per exemple, redueix l'expressió de CCL2 en les cèl·lules endotelials humanes²⁸⁰, encara que aquestes dades no han estat confirmades en estudis clínics.

Tenint tot això en compte, vam proposar l'ús de la diferència entre els valors de sèrum i plasma (CCL2) com un classificador de gravetat.

Existeixen almenys dos avantatges: 1) una disminució de la influència de mal maneig de laboratori; i 2) que les quimiocines unides a les cèl·lules sanguínies i endotelials es tenen en compte. Amb aquest enfocament, la mesura alternativa de la quantitat total de CCL2 circulant (és a dir, CCL2) està fortament associada amb la isquèmia crítica de les extremitats, i segueix sent un poderós predictor davant altres factors de confusió. Vam observar que les lesions greus i extenses s'associen considerablement a la disminució significativa dels valors de CCL2. Interpretem les nostres dades com el resultat d'una alta càrrega de teixit danyat. Les concentracions plasmàtiques de CCL2 poden variar, però no reflecteixen la CCL2 unida a les cèl·lules de la sang com ara a les plaquetes²⁸¹. La combinació d'ambdues mesures representaria indirectament la quantitat de CCL2 expressada, o transportada a l'artèria durant estímuls inflamatoris perllongats (és a dir, una mesura de la disponibilitat de quimiocines i la funció en els teixits)²⁸². Més important encara, en aquest estudi CCL2 no estava associada a altres variables relacionades amb la inflamació. A més, els resultats preliminars en un estudi prospectiu en curs (dades no mostrades) suggereixen que aquestes mesures poden ser útils per a l'estratificació de la malaltia arterial perifèrica per fases.

Per primera vegada en el literatura actual, es va observar que un polimorfisme genètic de DARC (rs12075) pot ser un factor important. Les freqüències genotípiques en els pacients i en els individus no afectats de la mateixa població són similars, però els valors de CCL2 són majors en genotip AA i menors en GG. Les diferències en CCL2 entre els casos i els controls van ser significatives, i suggereixen una major expressió d'aquest receptor en població AA. Es tractaria d'un marcador genètic candidat mereixedor d'investigació addicional. Altres polimorfismes promotors de CCL2 (la substitució de G per A en la posició -2518) ja han estat investigats i s'han associat amb l'augment de la transcripció del gen CCL2²⁸³. Pacients que eren homozigots per al polimorfisme tenien major risc de patir malaltia de l'artèria coronària que els pacients que eren heterozigots²⁸⁴. També s'ha relacionat CXCR271 amb la malaltia de l'artèria coronària^{285,286} i s'ha implicat CX3CR172 en la formació primerenca d'ateroma²⁸⁷. També s'ha estudiat el polimorfisme en CX3CR1, receptor de CX3CL1, que confereix protecció

contra la lesió ateroscleròtica calcificada²⁸⁵²⁸⁸. Les nostres observacions histològiques no van mostrar associacions significatives però es va trobar que l'expressió de CCR2, DARC i D6 estava incrementada en les artèries malaltes, i que les seves distribucions en les artèries no són uniformes.

La disponibilitat de la CCL2 pot ser complicada pels efectes potencials induïts per l'expressió diferencial de receptors funcionals (CCR2) i la presència de receptors atípics de quimiocines (ACKRs) de funció desconeguda a la xarxa de regulació que permet a l'organisme modular la migració de leucòcits. Probablement tenen un paper patogènic i les dades suggereixen que els receptors atípics de quimiocines poden modificar la disponibilitat de quimiocines en la malaltia arterial perifèrica: tot i que aquests receptors no tenen cap participació en la migració de les cèl·lules, es creu que modularien la resposta inflamatòria.

S'ha d'esmentar també la troballa d'una càrrega de calci significativa en el teixit arterial que podria ser clínicament important, ja que les taxes d'èxit en les intervencions quirúrgiques són baixes si les artèries estan molt calcificades. La quantificació del calci coronari permet una valoració del risc d'esdeveniments cardiovasculars adversos. L'any 1990 es va aconseguir obtenir un score a través de la tomografia computada. Tanmateix, hi ha pocs treballs que evidencien el nexa entre la quantitat d'aquest mineral a les artèries coronàries i la presència d'estenosi significativa. En un estudi clínic, la correlació entre la puntuació de calci total i el tant per cent d'estenosi va ser considerable²⁸⁹.

Finalment, la malaltia arterial perifèrica s'ha de considerar com un clar exemple d'una condició en la qual el metabolisme s'enfronta a la inflamació. Recentment, hem desenvolupat un model de ratolí que sobreexpressa CCL2 i posa de relleu una relació interessant entre la disfunció mitocondrial, el consum d'energia i la inflamació²⁹⁰. Els pacients amb MAP semblen tenir la funció mitocondrial anormal en les artèries malaltes, independentment de la perfusió tissular²⁹¹. Això implicaria que tant a la MAP com a les altres malalties de l'envelliment, la reprogramació metabòlica en

cèl·lules afectades podria ser crucial en la determinació de la relació amb la inflamació²⁹².

Per tal de demostrar que, tot i les complexitats que existeixen en la interpretació de la funció de les quimiocines, CCL2 pot resultar un marcador potencialment útil en el diagnòstic de l'aterosclerosi vam realitzar un **segon estudi** en pacients amb malaltia arterial coronària. CCL2 resulta una molècula potencialment atractiva, ja que exerceix efectes a través de receptors de superfície cel·lular que són fàcilment modulables.

La idea que CCL2 pot representar un important factor de risc cardiovascular es basa principalment en la seva funció inflamatòria quimioattractant, però la complexitat que envolta aquesta molècula suggereix funcions addicionals^{214,239,265,293,294}. La manipulació de la inflamació, ja sigui a nivell cel·lular o mitjançant l'ús de molècules que estan implicades en la regulació dels processos, representa una altra via en particular per a factors d'alt risc^{295,296}. No obstant això, hi ha algunes dificultats en la interpretació de les dades relatives al valor de CCL2 en plasma per a l'estratificació del risc de les síndromes coronàries agudes i per predir el risc d'aterosclerosi^{297,298}.

L'eix CCL2-CCR2 sembla ser la interacció més freqüent però confirmar-ho és un repte important, ja que CCL2 i CCR2 s'uneixen a altres receptors i lligands respectivament, fet que suggereix efectes redundants²²⁸. En aquest estudi s'estableix que una àmplia gamma de cèl·lules de la paret de l'artèria, incloent cèl·lules musculars llises i endotelials, expressa CCL2 i CCR2. L'expressió és aparentment constitutiva i induïda, encara que, en el cas de CCR2, aquesta inducció es limita histològicament a la capa adventícia del vas.

L'expressió d'ACKR2 (D6) també és principalment constitutiva, feble i limitada a la capa adventícia de l'artèria. Per contra, la inducció de l'expressió d'ACKR1 (DARC) és quantitativament significativa en una àmplia gamma de cèl·lules. L'existència dels ACKRs és important pel fet que els seus diferents perfils d'expressió en cèl·lules i en les diferents capes de la

paret arterial compliquen la disponibilitat de la CCL2 circulant per a la resposta cel·lular²⁹⁹. L'augment d'expressió d'ACKR1 i d'ACKR2 en les artèries coronàries afectades podria suggerir una funció coordinada en la regulació de la inflamació. És a dir, podríem considerar que es produeixen gradients de CCL2 pels ACKRs, que netegen les quimiocines localment³⁰⁰⁻³⁰³. La mesura de l'expressió, però, no proporciona una idea de l'especificitat o l'activitat del receptor, i això implicaria que els estudis futurs requeririen mesurar *in vivo* les propietats funcionals de CCL2 i les seves associacions amb els receptors cel·lulars.

Curiosament, els estudis d'associació GWAS (de l'anglès, *genome-wide association studies*) han identificat associacions entre en loci 1q23.2 (rs12075) del gen d'ACKR1 i el loci 3p22.1 (rs 2.228.467) del gen d'ACKR2 amb els nivells circulants de CCL2. És possible que aquestes variants alterin la unió de CCL2 a aquests receptors, però els nostres resultats suggereixen que l'expressió del receptor alterat és probablement un factor més important que les pròpies unions alterades. A més, la imprecisió de l'assaig de CCL2 i les diferències en el processament de mostres de sang també hi contribueixen²⁹⁸.

Tot i que les limitacions inherents impedeixen especulacions potencials, alguns fàrmacs dirigits a CCL2 o als seus receptors han assolit la fase d'assajos clínics amb èxits contradictoris³⁰⁴. De fet, alguns d'ells, com els fàrmacs antiinflamatoris (per exemple, el metotrexat) i teràpies anti-citocines (anticossos anti-IL-1), van progressant en la fase d'assajos clínics²⁹⁶. També s'ha de tenir en compte que moltes teràpies hipolipemiantes com ara estatines també tenen efectes pleiotròpics i actuen d'una manera antiinflamatoria³⁰⁵. A més, els agonistes de PPAR i LXRs no només modulen els lípids i l'homeòstasi de la glucosa, sinó que també atenuen la resposta inflamatòria³⁰⁶⁻³⁰⁸. Els reguladors de l'aterosclerosi no es limiten només a les proteïnes; les molècules d'ARN, en particular els microRNAs, estan emergint com a moduladors clau de la inflamació i l'homeòstasi dels lípids en aquesta malaltia i representen objectius futurs prometedors³⁰⁹.

Els nostres resultats donen suport al paper clau de CCL2 en la patogènesi de malaltia arterial coronària, ja que en la població seleccionada es mostren associacions entre inflamació, calcificació vascular i remodelació a l'aterosclerosi³¹⁰. Tot i la manca de correlació entre l'expressió de receptors, l'expressió de CCL2 era l'únic valor amb suficient precisió per a predir l'aterosclerosi i era aparentment independent del grau d'oclusió de l'artèria. L'associació entre CCL2 i macròfags també dona suport a troballes prèvies que indiquen que l'eix CCL2-CCR2 regula la polarització dels macròfags i la producció addicional de més CCL2³¹¹. L'increment en l'expressió combinada de CCL2-CCR2 en la capa *medial* de l'artèria a nivell histològic, juntament amb els dipòsits de calci, podria suggerir que la seva unió pot contribuir a modificacions en les cèl·lules musculars llises³¹² i per tant, la investigació d'alguns medicaments destinats a bloquejar CCL2 o CCR2 està justificada. Després de realitzar aquests dos estudis compremem que les nostres dades reforcen un model en el qual la producció contínua de CCL2 en la inflamació crònica activa mecanismes promiscus amb un valor predictiu potencial de l'aterosclerosi. Sabem que CCL2 està implicat en la progressió de la malaltia arterial perifèrica i també amb la malaltia arterial coronària. En general, els nostres resultats indiquen que la disponibilitat de quimiocines podria representar un factor no reconegut prèviament en el desenvolupament de la isquèmia crítica de les extremitats, de manera que CCL2 resulta atractiu per a possibles millores terapèutiques. Quant a la patogènesi de la MAC, s'ha de considerar com i en quina mesura la unió dels receptors associats a CCL2 intervenen en la transducció de senyals.

El paper de la inflamació en l'aterosclerosi té implicacions significatives per als enfocaments terapèutics actuals i futurs per a la prevenció primària i secundària d'esdeveniments ateroscleròtics. La resposta inflamatòria en l'aterosclerosi està regulada tant pel sistema immune innat com per l'adaptatiu a través de l'acció de les citocines. La nostra comprensió de les funcions d'aquestes citocines ha avançat considerablement principalment pels estudis que utilitzen models animals. Atenuar la inflamació induïda per citocines i la promoció de les accions de citocines antiinflamatòries representen possibles vies terapèutiques³¹³⁻³¹⁵. De fet, les

estatinas i els agonistes atero-protectors dels receptors nuclears atenuen l'expressió gènica i la senyalització mediada per certes citocines^{316,317,315}. A més, aquests efectes atero-protectors s'han atribuït a TGF-³¹⁸. Dosis baixes de metotrexat han demostrat ser beneficioses per a la prevenció secundària de l'infart de miocardi³¹⁹. A més, un assaig clínic de fase II de canakinumab, un anticòs neutralitzant d'IL-1, va reportar la reducció dels marcadors inflamatoris, podent aplicar així una prevenció secundària^{315, 320,321}. A escala més petita, s'ha testat un anticòs monoclonal (MLN1202) dirigit a la interacció de CCL2 amb el seu receptor i s'ha obtingut una reducció en la concentració de la proteïna C-reactiva, reactant de fase aguda³²².

Els enfocaments terapèutics no necessiten estar restringits a les citocines mateixes. Molts estudis estan investigant el potencial dels enfocaments que augmenten el nivell i/o l'acció de les cèl·lules T reguladores o catalitzadores de la tolerància immunològica als antígens associats amb l'aterosclerosi³²³. La manipulació de la senyalització de citocines representa un altre enfocament i podria incloure inhibidors de molècules petites que atenuen l'acció dels components proinflamatoris o milloren les que estan presents de forma natural per esmorteir la inflamació (per exemple, supressors de senyalització de citocines (SOCS)³¹³.

En conclusió, per determinar si la concentració de CCL2 es pot utilitzar com a biomarcador de l'aterosclerosi, caldria un anàlisi detallat. El valor actual d'aquesta molècula com a marcador de la inflamació vascular afegeix informació a l'entorn clínic i es pot considerar una evidència important en la fisiopatologia de l'aterosclerosi, fet que justifica futurs estudis.

CONCLUSIONS

Les nostres dades confirmen un model en el qual hi hauria una producció contínua de CCL2 que activaria mecanismes promiscus com ara els receptors atípics (ACKRs).

La disponibilitat de la CCL2 és un factor a tenir en compte en el desenvolupament de l'aterosclerosi. Els receptors convencionals (CCR2) i atípics (ACKR1 i ACKR2) de CCL2 es troben sobreexpressats en artèries afectades per aterosclerosi i podrien modular la concentració de CCL2 circulant (CCL2).

Els nostres estudis indiquen que, d'entre les quimiocines, CCL2 té valor com a potencial biomarcador d'aterosclerosi. Aquesta quimiocina està involucrada en la progressió de la malaltia arterial perifèrica (MAP) i també pot usar-se com a valor predictiu per distingir entre aterosclerosi coronària lleu, moderada i severa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Palastanga N., Field D. and RS. Anatomy and human movement: structure and function. *Elsevier Heal Sci.* 2006;20056.
2. A. RHD. "Anatomia Humana, Descriptiva, Topogràfica y Funcional." 1971;2:120-124.
3. J A. *Grant Anatomía.*; 19886.
4. CV. R. A manual of Pathologic Anatomy. *Londres Sydenham Soc.* 1852:256-275.
5. Gallil E. Coraxón. *Editor López Buenos Aires.* 1933.
6. Duprez D. Coronary artery calcification, an improvement in risk classification: need for reappraisal? *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(17):1415-1417. doi:10.1016/j.jacc.2010.06.027.
7. Evans J. Crash Course Cardiovascular System. *D horton-Szar.* 2012;165.
8. Pawlina W and m. R. *Histología. Texto Y Atlas Color Con Biología Celular Y Molecular.*; 2007.
9. Criqui MH, Fronek A, Barrett-Connor E, Klauber MR, Gabriel S, Goodman D. The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population. *Circulation.* 1985;71(3):510-515. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3156006>. Accessed February 16, 2016.
10. Selvin E, Erlinger TP. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Circulation.* 2004;110(6):738-743. doi:10.1161/01.CIR.0000137913.26087.F0.
11. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FGR. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg.* 2007;45 Suppl S:S5-S67. doi:10.1016/j.jvs.2006.12.037.
12. Marín F et al. Actualización en cardiopatía isquémica y cuidados críticos cardiológicos. *Rev española Cardiol.* 2014;67(2):120-126.
13. Little PJ, Chait A, Bobik A. Cellular and cytokine-based inflammatory processes as novel therapeutic targets for the prevention and treatment of atherosclerosis. *Pharmacol Ther.* 2011;131(3):255-268. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.04.001.
14. Hozawa A, Folsom AR, Sharrett AR, Chambless LE. Absolute and attributable risks of cardiovascular disease incidence in relation to optimal and borderline risk factors: comparison of African American with white subjects--Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Arch Intern Med.* 2007;167(6):573-579.

- doi:10.1001/archinte.167.6.573.
15. Haverkate F, Thompson SG, Duckert F. Haemostasis factors in angina pectoris; relation to gender, age and acute-phase reaction. Results of the ECAT Angina Pectoris Study Group. *Thromb Haemost.* 1995;73(4):561-567. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7495059>. Accessed February 17, 2016.
 16. Schwartzman RA, Cox ID, Poloniecki J, Crook R, Seymour CA, Kaski JC. Elevated plasma lipoprotein(a) is associated with coronary artery disease in patients with chronic stable angina pectoris. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31(6):1260-1266. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9581718>. Accessed February 17, 2016.
 17. Neumann FJ, Katus HA, Hoberg E, et al. Increased plasma viscosity and erythrocyte aggregation: indicators of an unfavourable clinical outcome in patients with unstable angina pectoris. *Br Heart J.* 1991;66(6):425-430. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1024815&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed February 17, 2016.
 18. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet (London, England).* 1997;349(9050):462-466. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9040576>. Accessed February 17, 2016.
 19. Friedman GD, Klatsky AL, Siegelau AB. The leukocyte count as a predictor of myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1974;290(23):1275-1278. doi:10.1056/NEJM197406062902302.
 20. KANNEL WB, DAWBER TR, KAGAN A, REVOTSKIE N, STOKES J. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med.* 1961;55:33-50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13751193>. Accessed February 16, 2016.
 21. Laakso M, Lehto S. Epidemiology of risk factors for cardiovascular disease in diabetes and impaired glucose tolerance. *Atherosclerosis.* 1998;137 Suppl:S65-S73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9694544>. Accessed February 16, 2016.

22. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998;97(18):1837-1847. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9603539>. Accessed February 10, 2015.
23. Tomàs Abadal L. [Evolution of ischemic cardiomyopathy and risk factors in Spain]. *Rev española Cardiol*. 1998;51 Suppl 6:3-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10050138>. Accessed February 16, 2016.
24. Strong JP, Malcom GT, McMahan CA, et al. Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults: implications for prevention from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Study. *JAMA*. 1999;281(8):727-735. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10052443>. Accessed February 10, 2016.
25. Zieske AW, Malcom GT, Strong JP. Natural history and risk factors of atherosclerosis in children and youth: the PDAY study. *Pediatr Pathol Mol Med*. 21(2):213-237. doi:10.1080/15227950252852104.
26. Viña J, Borrás C, Gambini J, Sastre J, Pallardó F V. Why females live longer than males: control of longevity by sex hormones. *Sci Aging Knowledge Environ*. 2005;2005(23):pe17. doi:10.1126/sageke.2005.23.pe17.
27. Farley TM, Collins J, Schlesselman JJ. Hormonal contraception and risk of cardiovascular disease. An international perspective. *Contraception*. 1998;57(3):211-230. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9617537>. Accessed February 16, 2016.
28. Serrano Aísa PJ, Casanovas Lenguas JA FMI. Impacto de las distintas estrategias en prevención cardiovascular. *Cardiovasc Risk Factors*. 2000;9:250-258.
29. Superko HR. Did grandma give you heart disease? The new battle against coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1998;82(9A):34Q - 46Q. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9819102>. Accessed February 16, 2016.
30. Gensini GF, Comeglio M, Colella A. Classical risk factors and emerging elements in the risk profile for coronary artery disease. *Eur Heart J*. 1998;19 Suppl A:A53-A61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9519344>. Accessed February 16, 2016.

- January 26, 2016.
31. Windler E, Schöffauer M, Zyriax B-C. The significance of low HDL-cholesterol levels in an ageing society at increased risk for cardiovascular disease. *Diabetes Vasc Dis Res.* 2007;4(2):136-142. doi:10.3132/dvdr.2007.032.
 32. Stamler J WD& NJ. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356, 222 primary screenees of the Multiple risk factor Intervention. *JAMA.* 1986;256:2823-2828.
 33. Playford DA, Watts GF. Management of lipid disorders in the elderly. *Drugs Aging.* 1997;10(6):444-462. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9205850>. Accessed January 26, 2016.
 34. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med.* 1997;337(6):408-416. doi:10.1056/NEJM199708073370607.
 35. Kannel WB, Castelli WP, Gordon T. Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham study. *Ann Intern Med.* 1979;90(1):85-91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/217290>. Accessed February 16, 2016.
 36. Ballantyne CM. Low-density lipoproteins and risk for coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1998;82(9A):3Q - 12Q. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9819098>. Accessed February 16, 2016.
 37. . Joint British Societes' guidelines on prevention of cardiovascular disease in clinical practice. British Cardiac Society, British Hypertension Society, Diabetes UK, Heart UK, Primary Care Caqrdiovascular Society,. *Stroke Assoc Hear.* 2005;91:52.
 38. Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, et al. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Québec Cardiovascular Study. *Circulation.* 1997;95(1):69-75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8994419>. Accessed February 14, 2016.
 39. Gardner CD, Fortmann SP, Krauss RM. Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *JAMA.* 1996;276(11):875-881. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8782636>. Accessed

- February 16, 2016.
40. Assmann, G, Gullen P et al. Results of follow-up at 8 years. *Eur Hear J*. 1998;19:2-11.
 41. Downs JR, Clearfield M, Weis S, et al. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA*. 1998;279(20):1615-1622.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9613910>. Accessed November 25, 2015.
 42. Linsel-Nitschke P, Samani NJ, Schunkert H. Sorting out cholesterol and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2010;363(25):2462-2463. doi:10.1056/NEJMcibr1010765.
 43. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet (London, England)*. 1994;344(8934):1383-1389. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7968073>. Accessed November 10, 2015.
 44. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med*. 1995;333(20):1301-1307. doi:10.1056/NEJM199511163332001.
 45. The effect of aggressive lowering of low-density lipoprotein cholesterol levels and low-dose anticoagulation on obstructive changes in saphenous-vein coronary-artery bypass grafts. *N Engl J Med*. 1997;336(3):153-162. doi:10.1056/NEJM199701163360301.
 46. Pitt B, Waters D, Brown W V, et al. Aggressive lipid-lowering therapy compared with angioplasty in stable coronary artery disease. Atorvastatin versus Revascularization Treatment Investigators. *N Engl J Med*. 1999;341(2):70-76. doi:10.1056/NEJM199907083410202.
 47. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A. Hypertriglyceridemia and elevated lipoprotein(a) are risk factors for major coronary events in middle-aged men. *Am J Cardiol*. 1996;77(14):1179-1184.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8651092>. Accessed February 16, 2016.
 48. Falcó C, Estellés A AJ. Lipoproteína/a/a, trombogénesis y fibronolisis. *Clín Carrdiovas*. 2000;18:27-32.

49. Gotto AM. Triglyceride as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1998;82(9A):22Q - 25Q. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9819100>. Accessed February 16, 2016.
50. Stehbens WE. Coronary heart disease, hypercholesterolemia, and atherosclerosis. II. Misrepresented data. *Exp Mol Pathol.* 2001;70(2):120-139. doi:10.1006/exmp.2000.2339.
51. Birjmohun RS, Hutten BA, Kastelein JJP, Stroes ESG. Efficacy and safety of high-density lipoprotein cholesterol-increasing compounds: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(2):185-197. doi:10.1016/j.jacc.2004.10.031.
52. Staessen JA, Fagard R, Thijs L, et al. Randomised double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. The Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial Investigators. *Lancet (London, England).* 1997;350(9080):757-764. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9297994>. Accessed December 19, 2015.
53. Ebrahim S. Detection, adherence and control of hypertension for the prevention of stroke: a systematic review. *Health Technol Assess.* 1998;2(11):i - iv, 1-78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9789758>. Accessed February 16, 2016.
54. Messerli FH, Williams B, Ritz E. Essential hypertension. *Lancet (London, England).* 2007;370(9587):591-603. doi:10.1016/S0140-6736(07)61299-9.
55. Iglesias Cubero G, Rodríguez Reguero J, Barriales Alvarez V. [Coronary risk factors]. *Med clínica.* 1995;104(4):142-147. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7898159>. Accessed February 16, 2016.
56. Gil Extremera B, Maldonado Martín A, Soto Más JA GJF. Pautas terapéuticas de la hipertensión en el siglo XXI. *Rev Clin Esp.* 2002:46-52.
57. Sytkowski PA, D'Agostino RB, Belanger AJ, Kannel WB. Secular trends in long-term sustained hypertension, long-term treatment, and cardiovascular mortality. The Framingham Heart Study 1950 to 1990. *Circulation.* 1996;93(4):697-703. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8640998>. Accessed February 16, 2016.
58. G G. Medicina basada en la evidencia como soporte de la terapia

- antihipertensiva farmacològica. *Cardiovasc Risk Factors*. 2001;10:219-275.
59. Psaty BM, Lumley T, Furberg CD, et al. Health outcomes associated with various antihypertensive therapies used as first-line agents: a network meta-analysis. *JAMA*. 2003;289(19):2534-2544. doi:10.1001/jama.289.19.2534.
60. Cohen JD. Managing hypertension: state of the science. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2006;8(10 Suppl 3):5-11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17028478>. Accessed February 17, 2016.
61. Gil Extremera B, Maldonado Martín A, Soto Mas J.A. GJF. La presión de pulso como factor de riesgo vascular. *Rev Clin Esp*. 2002;202:53-56.
62. Cicconetti P, Thau F M V. Hipertensión y factores de riesgo en ancianos: tratamiento clínico. *Cardiovasc Risk Factors*. 2000;9:205-216.
63. Hansson L, Lindholm LH, Ekblom T, et al. Randomised trial of old and new antihypertensive drugs in elderly patients: cardiovascular mortality and morbidity the Swedish Trial in Old Patients with Hypertension-2 study. *Lancet (London, England)*. 1999;354(9192):1751-1756. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10577635>. Accessed February 17, 2016.
64. Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol*. 1974;34(1):29-34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4835750>. Accessed January 20, 2016.
65. N. L. Coronary heart disease and diabetes type II. *Med Pregl*. 1999:12-15.
66. Haffner SM, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1998;339(4):229-234. doi:10.1056/NEJM199807233390404.
67. Haffner SM. Epidemiology of insulin resistance and its relation to coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1999;84(1A):11J - 14J. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10418852>. Accessed February 17, 2016.
68. Howard B V. Insulin resistance and lipid metabolism. *Am J Cardiol*. 1999;84(1A):28J - 32J.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10418856>. Accessed February 17, 2016.
69. García-Puig J, Ruilope LM, Luque M, Fernández J, Ortega R, Dal-Ré R. Glucose metabolism in patients with essential hypertension. *Am J Med.* 2006;119(4):318-326. doi:10.1016/j.amjmed.2005.09.010.
 70. Pérez A, Wagner A CR. Resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular. *Cardiovasc Risk Factors*,. 2001;10:271-276.
 71. Bauer T, Möllmann H, Weidinger F, et al. Impact of diabetes mellitus status on coronary pathoanatomy and interventional treatment: insights from the Euro heart survey PCI registry. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2011;78(5):702-709. doi:10.1002/ccd.22939.
 72. Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation.* 1998;98(8):731-733. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9727541>. Accessed February 17, 2016.
 73. van Baal WM, Kenemans P, van der Mooren MJ, Kessel H, Emeis JJ, Stehouwer CD. Increased C-reactive protein levels during short-term hormone replacement therapy in healthy postmenopausal women. *Thromb Haemost.* 1999;81(6):925-928. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10404769>. Accessed February 17, 2016.
 74. Garcia-Moll X, Zouridakis E, Cole D, Kaski JC. C-reactive protein in patients with chronic stable angina: differences in baseline serum concentration between women and men. *Eur Heart J.* 2000;21(19):1598-1606. doi:10.1053/euhj.2000.2128.
 75. Macy EM, Hayes TE, Tracy RP. Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implications for reference intervals and epidemiological applications. *Clin Chem.* 1997;43(1):52-58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8990222>. Accessed January 12, 2016.
 76. Rattazzi M, Puato M, Faggini E, Bertipaglia B, Zambon A, Pautetto P. C-reactive protein and interleukin-6 in vascular disease: culprits or passive bystanders? *J Hypertens.* 2003;21(10):1787-1803. doi:10.1097/01.hjh.0000084735.53355.44.
 77. Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein-

- mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation*. 2001;103(9):1194-1197. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238260>. Accessed February 17, 2016.
78. Blackburn R, Giral P, Bruckert E, et al. Elevated C-reactive protein constitutes an independent predictor of advanced carotid plaques in dyslipidemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(12):1962-1968. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742871>. Accessed February 17, 2016.
79. Torzewski M, Rist C, Mortensen RF, et al. C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(9):2094-2099. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10978254>. Accessed February 17, 2016.
80. Tzoulaki I, Murray GD, Lee AJ, Rumley A, Lowe GDO, Fowkes FGR. C-reactive protein, interleukin-6, and soluble adhesion molecules as predictors of progressive peripheral atherosclerosis in the general population: Edinburgh Artery Study. *Circulation*. 2005;112(7):976-983. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.513085.
81. Morrow DA, Rifai N, Antman EM, et al. C-reactive protein is a potent predictor of mortality independently of and in combination with troponin T in acute coronary syndromes: a TIMI 11A substudy. Thrombolysis in Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31(7):1460-1465. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9626820>. Accessed February 17, 2016.
82. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-Reactive Protein and Other Markers of Inflammation in the Prediction of Cardiovascular Disease in Women. *N Engl J Med*. 2000;342(12):836-843. doi:10.1056/NEJM200003233421202.
83. Paul A, Ko KWS, Li L, et al. C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2004;109(5):647-655. doi:10.1161/01.CIR.0000114526.50618.24.
84. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med*. 1994;331(7):417-424. doi:10.1056/NEJM199408183310701.

85. Otter W, Kleybrink S, Doering W, Standl E, Schnell O. Hospital outcome of acute myocardial infarction in patients with and without diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2004;21(2):183-187. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14984455>. Accessed February 16, 2016.
86. Norhammar A, Malmberg K, Diderholm E, et al. Diabetes mellitus: the major risk factor in unstable coronary artery disease even after consideration of the extent of coronary artery disease and benefits of revascularization. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(4):585-591. doi:10.1016/j.jacc.2003.08.050.
87. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993;329:977-986.
88. Turner RC, Millns H, Neil HA, et al. Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23). *BMJ.* 1998;316(7134):823-828. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=28484&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed February 15, 2016.
89. Hancu N DLA. La hiperglucemia como factor de riesgo cardiovascular. *Cardiovasc Risk Factors.* 2001;10:263-268.
90. Py rälä K, Pedersen TR, Kjekshus J, Faergeman O, Olsson AG, Thorgeirsson G. Cholesterol lowering with simvastatin improves prognosis of diabetic patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Diabetes Care.* 1997;20(4):614-620. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9096989>. Accessed February 17, 2016.
91. Colhoun H, Betteridge D DP et al. O behalf of the C investigators. On behalf of the CARDS investigators. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the collaborative atorvastatin diabetes study (CARDS), multicentre randomized placebo-controlled trial. *Lancet (London, England).* 2004:685-696.
92. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ.* 1998;317(7160):703-713. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=28659&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed February 28,

- 2015.
93. Beulens JWJ, Algra A, Soedamah-Muthu SS, Visseren FLJ, Grobbee DE, van der Graaf Y. Alcohol consumption and risk of recurrent cardiovascular events and mortality in patients with clinically manifest vascular disease and diabetes mellitus: the Second Manifestations of ARterial (SMART) disease study. *Atherosclerosis*. 2010;212(1):281-286. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.04.034.
 94. López García-Aranda V, Fernández JM, García Rubira JC, Castro Fernández A, García Sosa R, Gonzalez-Valdayo López M, Trujillo Berraquero F VJ. El tabaco como factor de riesgo cardiovascular. Importancia de la actuación desde la especialidad de cardiología. *Clin Cardiovasc*. 2000;18:11-18.
 95. Yue W-S, Wang M, Yan G-H, et al. Smoking is associated with depletion of circulating endothelial progenitor cells and elevated pulmonary artery systolic pressure in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2010;106(9):1248-1254. doi:10.1016/j.amjcard.2010.06.045.
 96. He J, Vupputuri S, Allen K, Prerost MR, Hughes J, Whelton PK. Passive smoking and the risk of coronary heart disease--a meta-analysis of epidemiologic studies. *N Engl J Med*. 1999;340(12):920-926. doi:10.1056/NEJM199903253401204.
 97. Craig WY, Palomaki GE, Haddow JE. Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data. *BMJ*. 1989;298(6676):784-788. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1836079&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed February 16, 2016.
 98. Michnovicz JJ, Hershcopf RJ, Haley NJ, Bradlow HL, Fishman J. Cigarette smoking alters hepatic estrogen metabolism in men: implications for atherosclerosis. *Metabolism*. 1989;38(6):537-541. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2725292>. Accessed February 16, 2016.
 99. Herrington DM, Reboussin DM, Klein KP, et al. The estrogen replacement and atherosclerosis (ERA) study: study design and baseline characteristics of the cohort. *Control Clin Trials*. 2000;21(3):257-285. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10822123>. Accessed February 16, 2016.
 100. René M GR. Comportamiento de los factores de riesgo cardiovascular en niños y adolescentes con hipertensión arterial

- esencial. *Rev Cuba Pediatr* v78 n1. 2006.
101. Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(10):1731-1737. doi:10.1016/j.jacc.2003.12.047.
 102. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87(10):840-844. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11073878>. Accessed February 3, 2016.
 103. Guajardo Gomez R. Riesgo dietetico de aterosclerosis en alumnos fumadores y no fumadores de la Universidad del Valle de Atemajac Campus Guadalajara. *vol17 num46.* 2003:70-75.
 104. Escobedo LG, Zack MM. Comparison of sudden and nonsudden coronary deaths in the United States. *Circulation.* 1996;93(11):2033-2036. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8640979>. Accessed February 17, 2016.
 105. Stevens J, Cai J, Pamuk ER, Williamson DF, Thun MJ, Wood JL. The effect of age on the association between body-mass index and mortality. *N Engl J Med.* 1998;338(1):1-7. doi:10.1056/NEJM199801013380101.
 106. Paffenbarger RS, Hyde RT, Wing AL, Lee IM, Jung DL, Kampert JB. The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. *N Engl J Med.* 1993;328(8):538-545. doi:10.1056/NEJM199302253280804.
 107. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med.* 1995;332(10):635-641. doi:10.1056/NEJM199503093321003.
 108. Hackam DG, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *JAMA.* 2003;290(7):932-940. doi:10.1001/jama.290.7.932.
 109. González Gomez L, García Pérez F, Maldonado Martín A, Gil Extremera B CLJ. Factor VII y riesgo cardiovascular. *Clin Cardiovasc.* 2000;3(supl 1):38-40.
 110. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted

- Action Project. *JAMA*. 1997;277(22):1775-1781.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9178790>. Accessed
February 17, 2016.
111. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A
quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor
for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid
intakes. *JAMA*. 1995;274(13):1049-1057.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7563456>. Accessed
February 17, 2016.
112. D'Angelo A, Selhub J. Homocysteine and thrombotic disease.
Blood. 1997;90(1):1-11.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9207431>. Accessed
December 28, 2015.
113. Córdoba Porras A, Blanco Vaca F GSF. Hiperohomocisteiemia
un nuevo marcador de riesgo vascular: territorios vasculares
afectados, papel en la patogénesis de la arterioesclerosis y la
trombosis y tratamiento. *Med Clin*. 1997;109:715-725.
114. Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, et al. Albuminuria and risk of
cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and
nondiabetic individuals. *JAMA*. 2001;286(4):421-426.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11466120>. Accessed
February 17, 2016.
115. Feig DI, Soletsky B, Johnson RJ. Effect of allopurinol on blood
pressure of adolescents with newly diagnosed essential
hypertension: a randomized trial. *JAMA*. 2008;300(8):924-932.
doi:10.1001/jama.300.8.924.
116. Bos MJ, Koudstaal PJ, Hofman A, Witteman JCM, Breteler
MMB. Uric acid is a risk factor for myocardial infarction and
stroke: the Rotterdam study. *Stroke*. 2006;37(6):1503-1507.
doi:10.1161/01.STR.0000221716.55088.d4.
117. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J
Med*. 1999;340(2):115-126.
doi:10.1056/NEJM199901143400207.
118. Gurfenkel EP BG. Marcadores séricos de la actividad
inflamatoria como factores predictivos de los episodios
cardiovasculares. *Cardiovasc risk factors*. 2000;9:141-149.
119. Koenig W, Sund M, Fröhlich M, et al. C-Reactive protein, a
sensitive marker of inflammation, predicts future risk of
coronary heart disease in initially healthy middle-aged men:
results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants
in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984.

- Circulation*. 1999;99(2):237-242.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9892589>. Accessed
February 17, 2016.
120. Piñon P KJ. Inflamación, aterosclerosis y riesgo cardiovascular: PAPP-A, Lp-PLA2 y cistina C ¿Nuevas aportaciones o información redundante? *Rev Esp Cardiol*. 2006;247-258.
121. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, et al. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*. 1995;91(9):2488-2496.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7729036>. Accessed
January 15, 2016.
122. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15(9):1512-1531.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7670967>. Accessed
January 13, 2016.
123. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis. *Am Hear Assoc Circ*. 1995;92:1355-1374.
124. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233-241.
doi:10.1038/35025203.
125. Fernández-Britto JE, Carlevaro P V. Atherometric system: morphometric standardized methodology to study atherosclerosis and its consequences. *Gegenbaurs Morphol Jahrb*. 1989;135(1):2-12.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2737419>. Accessed
February 16, 2016.
126. Plutzky J. Atherosclerotic plaque rupture: emerging insights and opportunities. *Am J Cardiol*. 1999;84(1A):15J - 20J.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10418853>. Accessed
February 16, 2016.
127. Kunjathoor V V, Chiu DS, O'Brien KD, LeBoeuf RC. Accumulation of biglycan and perlecan, but not versican, in lesions of murine models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(3):462-468.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884291>. Accessed

- February 17, 2016.
128. Hurt-Camejo E, Camejo G, Rosengren B, et al. Effect of arterial proteoglycans and glycosaminoglycans on low density lipoprotein oxidation and its uptake by human macrophages and arterial smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 1992;12(5):569-583.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1576119>. Accessed February 17, 2016.
 129. White CR, Brock TA, Chang LY, et al. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(3):1044-1048.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=521450&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed February 17, 2016.
 130. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med.* 1992;326(4):242-250.
doi:10.1056/NEJM199201233260406.
 131. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362(6423):801-809.
doi:10.1038/362801a0.
 132. Worthley SG, Osende JI, Helft G, Badimon JJ, Fuster V. Coronary artery disease: pathogenesis and acute coronary syndromes. *Mt Sinai J Med.* 2001;68(3):167-181.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11373689>. Accessed February 16, 2016.
 133. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1994;89(5):2462-2478.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8181179>. Accessed February 13, 2016.
 134. Nakashima Y, Fujii H, Sumiyoshi S, Wight TN, Sueishi K. Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(5):1159-1165.
doi:10.1161/ATVBAHA.106.134080.
 135. Khalil MF, Wagner WD, Goldberg IJ. Molecular interactions leading to lipoprotein retention and the initiation of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*

- 2004;24(12):2211-2218.
doi:10.1161/01.ATV.0000147163.54024.70.
136. Emeis JJ, Kooistra T. Interleukin 1 and lipopolysaccharide induce an inhibitor of tissue-type plasminogen activator in vivo and in cultured endothelial cells. *J Exp Med*. 1986;163(5):1260-1266.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2188089&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed February 17, 2016.
 137. Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L. Coronary atherosclerosis. A multifactorial disease. *Circulation*. 1993;87(3 Suppl):II3-II16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8443920>. Accessed February 16, 2016.
 138. Van Hinsbergh VW. Arteriosclerosis. Impairment of cellular interactions in the arterial wall. *Ann N Y Acad Sci*. 1992;673:321-330.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1485729>. Accessed February 16, 2016.
 139. Tamminen M, Mottino G, Qiao JH, Breslow JL, Frank JS. Ultrastructure of early lipid accumulation in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(4):847-853.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10195908>. Accessed February 17, 2016.
 140. Talusan P, Bedri S, Yang S, et al. Analysis of intimal proteoglycans in atherosclerosis-prone and atherosclerosis-resistant human arteries by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2005;4(9):1350-1357. doi:10.1074/mcp.M500088-MCP200.
 141. Nievelstein-Post P, Mottino G, Fogelman A, Frank J. An ultrastructural study of lipoprotein accumulation in cardiac valves of the rabbit. *Arterioscler Thromb*. 1994;14(7):1151-1161. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8018672>. Accessed February 17, 2016.
 142. Vijayagopal P, Srinivasan SR, Radhakrishnamurthy B, Berenson GS. Lipoprotein-proteoglycan complexes from atherosclerotic lesions promote cholesteryl ester accumulation in human monocytes/macrophages. *Arterioscler Thromb*. 1992;12(2):237-249. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1543697>. Accessed February 17, 2016.
 143. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(9):1135-1143.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11877368>. Accessed September 14, 2015.
144. Packard RRS, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem*. 2008;54(1):24-38. doi:10.1373/clinchem.2007.097360.
 145. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352(16):1685-1695. doi:10.1056/NEJMra043430.
 146. Anogeianaki A, Angelucci D, Cianchetti E, et al. Atherosclerosis: a classic inflammatory disease. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 24(4):817-825. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22230389>. Accessed February 16, 2016.
 147. Mallat Z, Tedgui A. The role of transforming growth factor beta in atherosclerosis: novel insights and future perspectives. *Curr Opin Lipidol*. 2002;13(5):523-529. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12352016>. Accessed February 17, 2016.
 148. Osterud B, Bjorklid E. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev*. 2003;83(4):1069-1112. doi:10.1152/physrev.00005.2003.
 149. Kohchi K, Takebayashi S, Hiroki T, Nobuyoshi M. Significance of adventitial inflammation of the coronary artery in patients with unstable angina: results at autopsy. *Circulation*. 1985;71(4):709-716. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3971540>. Accessed January 14, 2016.
 150. Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(25):2379-2393. doi:10.1016/j.jacc.2007.02.059.
 151. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest*. 1991;21(4):361-374. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1718757>. Accessed February 17, 2016.
 152. Wagenknecht LE, Zaccaro D, Espeland MA, Karter AJ, O'Leary DH, Haffner SM. Diabetes and progression of carotid atherosclerosis: the insulin resistance atherosclerosis study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(6):1035-1041.

- doi:10.1161/01.ATV.0000072273.67342.6D.
153. Rask-Madsen C, King GL. Proatherosclerotic mechanisms involving protein kinase C in diabetes and insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(3):487-496. doi:10.1161/01.ATV.0000155325.41507.e0.
 154. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation.* 1994;90(2):775-778. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8044947>. Accessed February 13, 2016.
 155. Hansson GK, Holm J, Jonasson L. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol.* 1989;135(1):169-175. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1880219&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed February 17, 2016.
 156. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation.* 1995;91(11):2844-2850. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7758192>. Accessed February 17, 2016.
 157. Hansson GK, Jonasson L, Holm J, Clowes MM, Clowes AW. Gamma-interferon regulates vascular smooth muscle proliferation and Ia antigen expression in vivo and in vitro. *Circ Res.* 1988;63(4):712-719. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3139321>. Accessed February 17, 2016.
 158. Leon MLA, Zuckerman SH. Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis. *Inflamm Res.* 2005;54(10):395-411. doi:10.1007/s00011-005-1377-2.
 159. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation.* 1994;89(1):36-44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8281670>. Accessed February 13, 2016.
 160. Kuller LH, Eichner JE, Orchard TJ, Grandits GA, McCallum L, Tracy RP. The relation between serum albumin levels and risk of coronary heart disease in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiol.* 1991;134(11):1266-1277. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1755441>. Accessed

- February 17, 2016.
161. Hamsten A, de Faire U, Walldius G, et al. Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet (London, England)*. 1987;2(8549):3-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2885513>. Accessed February 17, 2016.
 162. HAUST MD, WYLLIE JC, MORE RH. ATHEROGENESIS AND PLASMA CONSTITUENTS. I. DEMONSTRATION OF FIBRIN IN THE WHITE PLAQUE BY THE FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUE. *Am J Pathol*. 1964;44:255-267. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1907002&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed February 17, 2016.
 163. Kadish JL, Butterfield CE, Folkman J. The effect of fibrin on cultured vascular endothelial cells. *Tissue Cell*. 1979;11(1):99-108. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/452000>. Accessed February 17, 2016.
 164. Ishida T, Tanaka K. Effects of fibrin and fibrinogen-degradation products on the growth of rabbit aortic smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis*. 1982;44(2):161-174. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7138618>. Accessed February 17, 2016.
 165. Krobot K, Hense HW, Cremer P, Eberle E, Keil U. Determinants of plasma fibrinogen: relation to body weight, waist-to-hip ratio, smoking, alcohol, age, and sex. Results from the second MONICA Augsburg survey 1989-1990. *Arterioscler Thromb*. 1992;12(7):780-788. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1616903>. Accessed February 17, 2016.
 166. Meade TW, Chakrabarti R, Haines AP, North WR, Stirling Y. Characteristics affecting fibrinolytic activity and plasma fibrinogen concentrations. *Br Med J*. 1979;1(6157):153-156. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1597599&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed February 17, 2016.
 167. Toss H, Lindahl B, Siegbahn A, Wallentin L. Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *Circulation*. 1997;96(12):4204-4210. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9416883>. Accessed February 17, 2016.

- February 17, 2016.
168. Matsushima K, Oppenheim JJ. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine*. 1989;1(1):2-13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2491503>. Accessed February 17, 2016.
 169. Puren AJ, Fantuzzi G, Gu Y, Su MS, Dinarello CA. Interleukin-18 (IFN γ -inducing factor) induces IL-8 and IL-1 β via TNF α production from non-CD14 $^{+}$ human blood mononuclear cells. *J Clin Invest*. 1998;101(3):711-721. doi:10.1172/JCI1379.
 170. Rollins BJ, Pober JS. Interleukin-4 induces the synthesis and secretion of MCP-1/JE by human endothelial cells. *Am J Pathol*. 1991;138(6):1315-1319. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1886397&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed February 17, 2016.
 171. Hart PH, Burgess DR, Vitti GF, Hamilton JA. Interleukin-4 stimulates human monocytes to produce tissue-type plasminogen activator. *Blood*. 1989;74(4):1222-1225. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2504304>. Accessed February 17, 2016.
 172. Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(10):2364-2367. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10521365>. Accessed February 17, 2016.
 173. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol*. 1993;54:1-78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8379461>. Accessed January 4, 2016.
 174. Boulay J-L, O'Shea JJ, Paul WE. Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors. *Immunity*. 2003;19(2):159-163. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12932349>. Accessed May 19, 2016.
 175. Langer JA, Cutrone EC, Kotenko S. The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(1):33-48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14746812>. Accessed May 19, 2016.
 176. Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P. Specificity, diversity, and

- regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J.* 1999;13(15):2105-2124.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10593858>. Accessed May 19, 2016.
177. Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *J Biol Chem.* 2005;280(9):7409-7412. doi:10.1074/jbc.R400029200.
178. De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA. The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(11):E83-E88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11073859>. Accessed May 19, 2016.
179. Yamashita H, Shimada K, Seki E, Mokuno H, Daida H. Concentrations of interleukins, interferon, and C-reactive protein in stable and unstable angina pectoris. *Am J Cardiol.* 2003;91(2):133-136.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12521622>. Accessed May 19, 2016.
180. Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(9):1317-1327.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924851>. Accessed May 6, 2016.
181. Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med.* 2001;7(12):1291-1297. doi:10.1038/nm1201-1291.
182. Mallat Z, Heymes C, Ohan J, Faggini E, Lesèche G, Tedgui A. Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(3):611-616. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10073964>. Accessed May 19, 2016.
183. Nikol S, Isner JM, Pickering JG, Kearney M, Leclerc G, Weir L. Expression of transforming growth factor-beta 1 is increased in human vascular restenosis lesions. *J Clin Invest.* 1992;90(4):1582-1592. doi:10.1172/JCI116027.
184. Mallat Z, Besnard S, Duriez M, et al. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res.* 1999;85(8):e17-e24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10521249>. Accessed May

- 19, 2016.
185. Robertson A-KL, Rudling M, Zhou X, Gorelik L, Flavell RA, Hansson GK. Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2003;112(9):1342-1350. doi:10.1172/JCI18607.
 186. Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med.* 1998;187(12):2103-2108.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2212367&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed May 19, 2016.
 187. Campbell JJ, Butcher EC. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(3):336-341.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10781407>. Accessed May 19, 2016.
 188. Freeman CM, Chiu B-C, Stolberg VR, et al. CCR8 is expressed by antigen-elicited, IL-10-producing CD4+CD25+ T cells, which regulate Th2-mediated granuloma formation in mice. *J Immunol.* 2005;174(4):1962-1970.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1599789&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed May 19, 2016.
 189. Schober A, Manka D, von Hundelshausen P, et al. Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury. *Circulation.* 2002;106(12):1523-1529.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12234959>. Accessed May 19, 2016.
 190. Kaartinen M, Penttilä A, Kovanen PT. Accumulation of activated mast cells in the shoulder region of human coronary atheroma, the predilection site of atheromatous rupture. *Circulation.* 1994;90(4):1669-1678.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7923651>. Accessed May 19, 2016.
 191. Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature.* 1990;346(6281):274-276. doi:10.1038/346274a0.
 192. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions:

- molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev.* 2004;84(3):869-901. doi:10.1152/physrev.00035.2003.
193. Edens HA, Parkos CA. Modulation of epithelial and endothelial paracellular permeability by leukocytes. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000;41(3):315-328.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10854689>. Accessed May 19, 2016.
194. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2001;107(10):1255-1262. doi:10.1172/JCI11871.
195. O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation.* 1996;93(4):672-682.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8640995>. Accessed May 19, 2016.
196. Li H, Freeman MW, Libby P. Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression in vivo by atherogenic diets and in vitro by cytokines. *J Clin Invest.* 1995;95(1):122-133. doi:10.1172/JCI117628.
197. Minami M, Kume N, Shimaoka T, et al. Expression of SR-PSOX, a novel cell-surface scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized LDL in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(11):1796-1800.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11701468>. Accessed May 19, 2016.
198. Christen S, Thomas SR, Garner B, Stocker R. Inhibition by interferon-gamma of human mononuclear cell-mediated low density lipoprotein oxidation. Participation of tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *J Clin Invest.* 1994;93(5):2149-2158. doi:10.1172/JCI117211.
199. Tellides G, Tereb DA, Kirkiles-Smith NC, et al. Interferon-gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes. *Nature.* 2000;403(6766):207-211. doi:10.1038/35003221.
200. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 11(5):1223-1230.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1911708>. Accessed April 30, 2016.

201. Uyemura K, Demer LL, Castle SC, et al. Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1996;97(9):2130-2138. doi:10.1172/JCI118650.
202. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, et al. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*. 2001;97(11):3354-3360.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369624>. Accessed May 10, 2016.
203. Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002;109(5):625-637.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2826110&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed February 22, 2016.
204. Epstein SE, Stabile E, Kinnaird T, Lee CW, Clavijo L, Burnett MS. Janus phenomenon: the interrelated tradeoffs inherent in therapies designed to enhance collateral formation and those designed to inhibit atherogenesis. *Circulation*. 2004;109(23):2826-2831.
doi:10.1161/01.CIR.0000132468.82942.F5.
205. Luttun A, Tjwa M, Moons L, et al. Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med*. 2002;8(8):831-840. doi:10.1038/nm731.
206. Littlewood TD, Bennett MR. Apoptotic cell death in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2003;14(5):469-475.
doi:10.1097/01.mol.0000092618.86399.71.
207. Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, et al. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med*. 2005;352(1):20-28. doi:10.1056/NEJMoa042378.
208. Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;283(1):R7-R28. doi:10.1152/ajpregu.00738.2001.
209. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*. 1998;338(7):436-445.
doi:10.1056/NEJM199802123380706.
210. Taub DD, Oppenheim JJ. Review of the chemokine meeting the Third International Symposium of Chemotactic Cytokines. *Cytokine*. 1993;5(3):175-179.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8218927>. Accessed

- February 17, 2016.
211. Miller MD, Krangel MS. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol.* 1992;12(1-2):17-46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1418604>. Accessed February 17, 2016.
 212. Rostène W, Kitabgi P, Parsadaniantz SM. Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(11):895-903. doi:10.1038/nrn2255.
 213. Gosling J, Slaymaker S, Gu L, et al. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest.* 1999;103(6):773-778. doi:10.1172/JCI5624.
 214. Coll B, Alonso-Villaverde C, Joven J. Monocyte chemoattractant protein-1 and atherosclerosis: is there room for an additional biomarker? *Clin Chim Acta.* 2007;383(1-2):21-29. doi:10.1016/j.cca.2007.04.019.
 215. Galzi J-L, Hachet-Haas M, Bonnet D, et al. Neutralizing endogenous chemokines with small molecules. Principles and potential therapeutic applications. *Pharmacol Ther.* 2010;126(1):39-55. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.12.003.
 216. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006;354(6):610-621. doi:10.1056/NEJMra052723.
 217. Wang J, Knaut H. Chemokine signaling in development and disease. *Development.* 2014;141(22):4199-4205. doi:10.1242/dev.101071.
 218. Roy I, Evans DB, Dwinell MB. Chemokines and chemokine receptors: update on utility and challenges for the clinician. *Surgery.* 2014;155(6):961-973. doi:10.1016/j.surg.2014.02.006.
 219. Cardona SM, Garcia JA, Cardona AE. The fine balance of chemokines during disease: trafficking, inflammation, and homeostasis. *Methods Mol Biol.* 2013;1013:1-16. doi:10.1007/978-1-62703-426-5_1.
 220. Camps J, Rodríguez-Gallego E, García-Heredia A, et al. Paraoxonases and chemokine (C-C motif) ligand-2 in noncommunicable diseases. *Adv Clin Chem.* 2014;63:247-308. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24783356>. Accessed May 23, 2016.
 221. Graham GJ, Locati M, Mantovani A, Rot A, Thelen M. The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors.

- Immunol Lett.* 2012;145(1-2):30-38.
doi:10.1016/j.imlet.2012.04.004.
222. Le Y, Zhou Y, Iribarren P, Wang J. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell Mol Immunol.* 2004;1(2):95-104.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212895>. Accessed May 23, 2016.
223. Van Coillie E, Van Damme J, Opdenakker G. The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1999;10(1):61-86.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10379912>. Accessed February 17, 2016.
224. Tabata T, Mine S, Kawahara C, Okada Y, Tanaka Y. Monocyte chemoattractant protein-1 induces scavenger receptor expression and monocyte differentiation into foam cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;305(2):380-385.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12745086>. Accessed February 17, 2016.
225. Matsushima K, Larsen CG, DuBois GC OJ. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J Exp Med.* 1989;169:1485-1490.
226. Panee J. Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. *Cytokine.* 2012;60(1):1-12.
doi:10.1016/j.cyto.2012.06.018.
227. Melgarejo E, Medina MA, Sánchez-Jiménez F, Urdiales JL. Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(5):998-1001. doi:10.1016/j.biocel.2008.07.018.
228. Schnabel RB, Baumert J, Barbalic M, et al. Duffy antigen receptor for chemokines (Darc) polymorphism regulates circulating concentrations of monocyte chemoattractant protein-1 and other inflammatory mediators. *Blood.* 2010;115(26):5289-5299. doi:10.1182/blood-2009-05-221382.
229. Sung FL, Zhu TY, Au-Yeung KKW, Siow YL, O K. Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF-kappaB. *Kidney Int.* 2002;62(4):1160-1170. doi:10.1111/j.1523-1755.2002.kid577.x.
230. Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta.* 2010;411(21-22):1570-1579. doi:10.1016/j.cca.2010.07.006.

231. Wong BWC, Wong D, McManus BM. Characterization of fractalkine (CX3CL1) and CX3CR1 in human coronary arteries with native atherosclerosis, diabetes mellitus, and transplant vascular disease. *Cardiovasc Pathol.* 11(6):332-338. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12459434>. Accessed February 17, 2016.
232. Bartoli C, Civatte M, Pellissier JF, Figarella-Branger D. CCR2A and CCR2B, the two isoforms of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor are up-regulated and expressed by different cell subsets in idiopathic inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol.* 2001;102(4):385-392. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11603815>. Accessed February 17, 2016.
233. Struthers M, Pasternak A. CCR2 antagonists. *Curr Top Med Chem.* 2010;10(13):1278-1298. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20536421>. Accessed February 17, 2016.
234. Singh R, Sobhia ME. Structure prediction and molecular dynamics simulations of a G-protein coupled receptor: human CCR2 receptor. *J Biomol Struct Dyn.* 2013;31(7):694-715. doi:10.1080/07391102.2012.707460.
235. Nakayama EE, Tanaka Y, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T. A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. *AIDS.* 2004;18(5):729-738. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15075507>. Accessed February 17, 2016.
236. Hansell CAH, Hurson CE, Nibbs RJB. DARC and D6: silent partners in chemokine regulation? *Immunol Cell Biol.* 2011;89(2):197-206. doi:10.1038/icb.2010.147.
237. Graham IM. The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors. 2012;145:30-38.
238. Borroni EM, Buracchi C, de la Torre YM, et al. The chemoattractant decoy receptor D6 as a negative regulator of inflammatory responses. *Biochem Soc Trans.* 2006;34(Pt 6):1014-1017. doi:10.1042/BST0341014.
239. Novitzky-Basso I, Rot A. Duffy antigen receptor for chemokines and its involvement in patterning and control of inflammatory chemokines. *Front Immunol.* 2012;3:266. doi:10.3389/fimmu.2012.00266.
240. Locati M, Torre YM de la, Galliera E, et al. Silent chemoattractant receptors: D6 as a decoy and scavenger receptor

- for inflammatory CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(6):679-686. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.05.003.
241. Apostolakis S, Chalikias GK, Tziakas DN, Konstantinides S. Erythrocyte Duffy antigen receptor for chemokines (DARC): diagnostic and therapeutic implications in atherosclerotic cardiovascular disease. *Acta Pharmacol Sin.* 2011;32(4):417-424. doi:10.1038/aps.2011.13.
242. Harmon BT, Orkunoglu-Suer EF, Adham K, et al. CCL2 and CCR2 variants are associated with skeletal muscle strength and change in strength with resistance training. *J Appl Physiol.* 2010;109(6):1779-1785. doi:10.1152/jappphysiol.00633.2010.
243. Zhang Z-M, Rautaharju PM, Prineas RJ, et al. Race and Sex Differences in the Incidence and Prognostic Significance of Silent Myocardial Infarction in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation.* 2016;133(22):2141-2148. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.021177.
244. Zhou J-H, Pan Z-Y, Zhang Y-F, Cui W-Y, Long C-L, Wang H. Stimulation of endothelial non-neuronal muscarinic receptor attenuates the progression of atherosclerosis via inhibiting endothelial cells activation. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.* 2014;30(6):549-559. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26016366>. Accessed June 13, 2016.
245. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest.* 2006;116(1):115-124. doi:10.1172/JCI24335.
246. Cheung Y-F, O K, Tam SCF, Siow YL. Induction of MCP1, CCR2, and iNOS expression in THP-1 macrophages by serum of children late after Kawasaki disease. *Pediatr Res.* 2005;58(6):1306-1310. doi:10.1203/01.pdr.0000183360.79872.1c.
247. Margeta C, Giurgea A, Hammer A, et al. Impact of international guidelines on the management of cardiovascular risk factors in diabetic patients with peripheral arterial disease. *Int Angiol.* 2009;28(3):175-180. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19506537>. Accessed June 10, 2016.
248. Slovut DP, Sullivan TM. Critical limb ischemia: medical and surgical management. *Vasc Med.* 2008;13(3):281-291. doi:10.1177/1358863X08091485.
249. Criqui MH. Peripheral arterial disease--epidemiological aspects.

- Vasc Med.* 2001;6(3 Suppl):3-7.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11789963>. Accessed May 2, 2016.
250. Mehlsen J, Wiinberg N, Joergensen BS, Schultz-Larsen P. High prevalence of peripheral arterial disease in patients with previous cerebrovascular or coronary event. *Blood Press.* 2010;19(5):308-312. doi:10.3109/08037051.2010.491178.
251. Gornik HL, Creager MA. Contemporary management of peripheral arterial disease: I. Cardiovascular risk-factor modification. *Cleve Clin J Med.* 2006;73 Suppl 4:S30-S37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17385389>. Accessed May 28, 2016.
252. Dolmatch BL. Imaging peripheral arterial disease: a randomized controlled trial comparing contrast-enhanced MR angiography and multi-detector row CT angiography. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther.* 2006;18(2):191-193. doi:10.1177/1531003506290889.
253. Fowkes FG. The measurement of atherosclerotic peripheral arterial disease in epidemiological surveys. *Int J Epidemiol.* 1988;17(2):248-254. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3042648>. Accessed June 10, 2016.
254. Lee T, Ul Haq N. New Developments in Our Understanding of Neointimal Hyperplasia. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2015;22(6):431-437. doi:10.1053/j.ackd.2015.06.010.
255. Taguwa S, Maringer K, Li X, et al. Defining Hsp70 Subnetworks in Dengue Virus Replication Reveals Key Vulnerability in Flavivirus Infection. *Cell.* 2015;163(5):1108-1123. doi:10.1016/j.cell.2015.10.046.
256. Julian A, Dugast E, Ragot S, et al. There is no correlation between peripheral inflammation and cognitive status at diagnosis in Alzheimer's disease. *Aging Clin Exp Res.* 2015;27(5):589-594. doi:10.1007/s40520-015-0332-5.
257. Karin N, Wildbaum G. The role of chemokines in adjusting the balance between CD4+ effector T cell subsets and FOXP3-negative regulatory T cells. *Int Immunopharmacol.* 2015;28(2):829-835. doi:10.1016/j.intimp.2015.03.037.
258. Reckless J, Rubin EM, Verstuyft JB, Metcalfe JC, Grainger DJ. Monocyte chemoattractant protein-1 but not tumor necrosis factor-alpha is correlated with monocyte infiltration in mouse lipid lesions. *Circulation.* 1999;99(17):2310-2316.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10226098>. Accessed February 17, 2016.
259. McDermott DH, Yang Q, Kathiresan S, et al. CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2005;112(8):1113-1120. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.543579.
260. Iwai N, Kajimoto K, Kokubo Y, et al. Assessment of genetic effects of polymorphisms in the MCP-1 gene on serum MCP-1 levels and myocardial infarction in Japanese. *Circ J*. 2006;70(7):805-809. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16799229>. Accessed June 11, 2016.
261. Mosedale DE, Smith DJ, Aitken S, et al. Circulating levels of MCP-1 and eotaxin are not associated with presence of atherosclerosis or previous myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2005;183(2):268-274. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.11.028.
262. Papatheodorou K, Papanas N, Papazoglou D, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 is correlated with glycemic control and peripheral arterial disease in type 2 diabetic patients with metabolic syndrome. *Angiology*. 2013;64(3):223-229. doi:10.1177/0003319712440143.
263. Lijmer JG, Hunink MG, van den Dungen JJ, Loonstra J, Smit AJ. ROC analysis of noninvasive tests for peripheral arterial disease. *Ultrasound Med Biol*. 1996;22(4):391-398. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8795165>. Accessed May 28, 2016.
264. Deo R, Khera A, McGuire DK, et al. Association among plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1, traditional cardiovascular risk factors, and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(9):1812-1818. doi:10.1016/j.jacc.2004.07.047.
265. de Lemos JA, Morrow DA, Blazing MA, et al. Serial measurement of monocyte chemoattractant protein-1 after acute coronary syndromes: results from the A to Z trial. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(22):2117-2124. doi:10.1016/j.jacc.2007.06.057.
266. Petrakova J, Szotkowska J, Hermanova Z, Lukl J, Petrek M. Monocyte chemoattractant protein-1 in patients with peripheral arterial disease. *Mediators Inflamm*. 2004;13(1):39-43.

- doi:10.1080/09629350410001664752.
267. Hoogeveen RC, Morrison A, Boerwinkle E, et al. Plasma MCP-1 level and risk for peripheral arterial disease and incident coronary heart disease: Atherosclerosis Risk in Communities study. *Atherosclerosis*. 2005;183(2):301-307. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.03.007.
268. Aragonès G, Ercilla A, Barreda M, et al. Human Duffy blood group alloantigen system influences the measurement of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in serum but not in plasma. *Clin Lab*. 2012;58(1-2):185-188. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22372364>. Accessed May 28, 2016.
269. Alonso-Villaverde C, Coll B, Parra S, et al. Atherosclerosis in patients infected with HIV is influenced by a mutant monocyte chemoattractant protein-1 allele. *Circulation*. 2004;110(15):2204-2209. doi:10.1161/01.CIR.0000143835.95029.7D.
270. Zineh I, Luo X, Welder GJ, et al. Modulatory effects of atorvastatin on endothelial cell-derived chemokines, cytokines, and angiogenic factors. *Pharmacotherapy*. 2006;26(3):333-340. doi:10.1592/phco.26.3.333.
271. Han KH, Ryu J, Hong KH, et al. HMG-CoA reductase inhibition reduces monocyte CC chemokine receptor 2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated monocyte recruitment in vivo. *Circulation*. 2005;111(11):1439-1447. doi:10.1161/01.CIR.0000158484.18024.1F.
272. Xu Z, Zhao S, Li Q, Nie S, Zhou H. Atorvastatin reduces plasma MCP-1 in patients with acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta*. 2003;338(1-2):17-24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14637261>. Accessed June 11, 2016.
273. Kowalski J, Okopie B, Madej A, et al. Effects of atorvastatin, simvastatin, and fenofibrate therapy on monocyte chemoattractant protein-1 secretion in patients with hyperlipidemia. *Eur J Clin Pharmacol*. 2003;59(3):189-193. doi:10.1007/s00228-003-0581-7.
274. Takebayashi K, Matsumoto S, Wakabayashi S, et al. The effect of low-dose atorvastatin on circulating monocyte chemoattractant protein-1 in patients with type 2 diabetes complicated by hyperlipidemia. *Metabolism*. 2005;54(9):1225-1229. doi:10.1016/j.metabol.2005.04.008.

275. Okopien B, Krysiak R, Haberka M, Herman ZS. Effect of monthly atorvastatin and fenofibrate treatment on monocyte chemoattractant protein-1 release in patients with primary mixed dyslipidemia. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;45(4):314-320. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15772519>. Accessed June 11, 2016.
276. Trøseid M, Lappegård KT, Claudi T, et al. Exercise reduces plasma levels of the chemokines MCP-1 and IL-8 in subjects with the metabolic syndrome. *Eur Heart J.* 2004;25(4):349-355. doi:10.1016/j.ehj.2003.12.006.
277. Koh KK, Quon MJ, Han SH, et al. Additive beneficial effects of losartan combined with simvastatin in the treatment of hypercholesterolemic, hypertensive patients. *Circulation.* 2004;110(24):3687-3692. doi:10.1161/01.CIR.0000143085.86697.13.
278. Koh KK, Son JW, Ahn JY, et al. Simvastatin combined with ramipril treatment in hypercholesterolemic patients. *Hypertension.* 2004;44(2):180-185. doi:10.1161/01.HYP.0000133310.42762.25.
279. Wang G, Wei J, Guan Y, Jin N, Mao J, Wang X. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone reduces clinical inflammatory responses in type 2 diabetes with coronary artery disease after coronary angioplasty. *Metabolism.* 2005;54(5):590-597. doi:10.1016/j.metabol.2004.11.017.
280. Dragomir E, Tircol M, Manduteanu I, Voinea M, Simionescu M. Aspirin and PPAR-alpha activators inhibit monocyte chemoattractant protein-1 expression induced by high glucose concentration in human endothelial cells. *Vascul Pharmacol.* 2006;44(6):440-449. doi:10.1016/j.vph.2006.02.006.
281. Lee W-J, Sheu WH-H, Chen Y-T, et al. Circulating CD40 ligand is elevated only in patients with more advanced symptomatic peripheral arterial diseases. *Thromb Res.* 2006;118(5):619-626. doi:10.1016/j.thromres.2005.10.012.
282. Mortier A, Van Damme J, Proost P. Overview of the mechanisms regulating chemokine activity and availability. *Immunol Lett.* 2012;145(1-2):2-9. doi:10.1016/j.imlet.2012.04.015.
283. Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;259(2):344-348. doi:10.1006/bbrc.1999.0796.

284. Szalai C, Duba J, Prohászka Z, et al. Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 -2518 G/G genotype in CAD patients. *Atherosclerosis*. 2001;158(1):233-239. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11500196>. Accessed June 11, 2016.
285. Valdes AM, Wolfe ML, O'Brien EJ, et al. Val64Ile polymorphism in the C-C chemokine receptor 2 is associated with reduced coronary artery calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(11):1924-1928. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12426226>. Accessed June 11, 2016.
286. González P, Alvarez R, Batalla A, et al. Genetic variation at the chemokine receptors CCR5/CCR2 in myocardial infarction. *Genes Immun*. 2001;2(4):191-195. doi:10.1038/sj.gene.6363760.
287. Combadière C, Potteaux S, Gao J-L, et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation*. 2003;107(7):1009-1016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600915>. Accessed June 11, 2016.
288. McDermott DH, Fong AM, Yang Q, et al. Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. *J Clin Invest*. 2003;111(8):1241-1250. doi:10.1172/JCI16790.
289. Urbonaviciene G, Isaksen C, Urbonavicius S, et al. Coronary computed tomography angiography and calcium scoring in routine clinical practice for identification of patients who require revascularization. *Arch Cardiovasc Dis*. May 2016. doi:10.1016/j.acvd.2016.01.013.
290. Rodríguez-Gallego E, Riera-Borrull M, Hernández-Aguilera A, et al. Ubiquitous transgenic overexpression of C-C chemokine ligand 2: a model to assess the combined effect of high energy intake and continuous low-grade inflammation. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:953841. doi:10.1155/2013/953841.
291. Anderson JD, Epstein FH, Meyer CH, et al. Multifactorial determinants of functional capacity in peripheral arterial disease: uncoupling of calf muscle perfusion and metabolism. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(7):628-635. doi:10.1016/j.jacc.2009.01.080.
292. Menendez JA, Alarcón T, Joven J. Gerometabolites: the

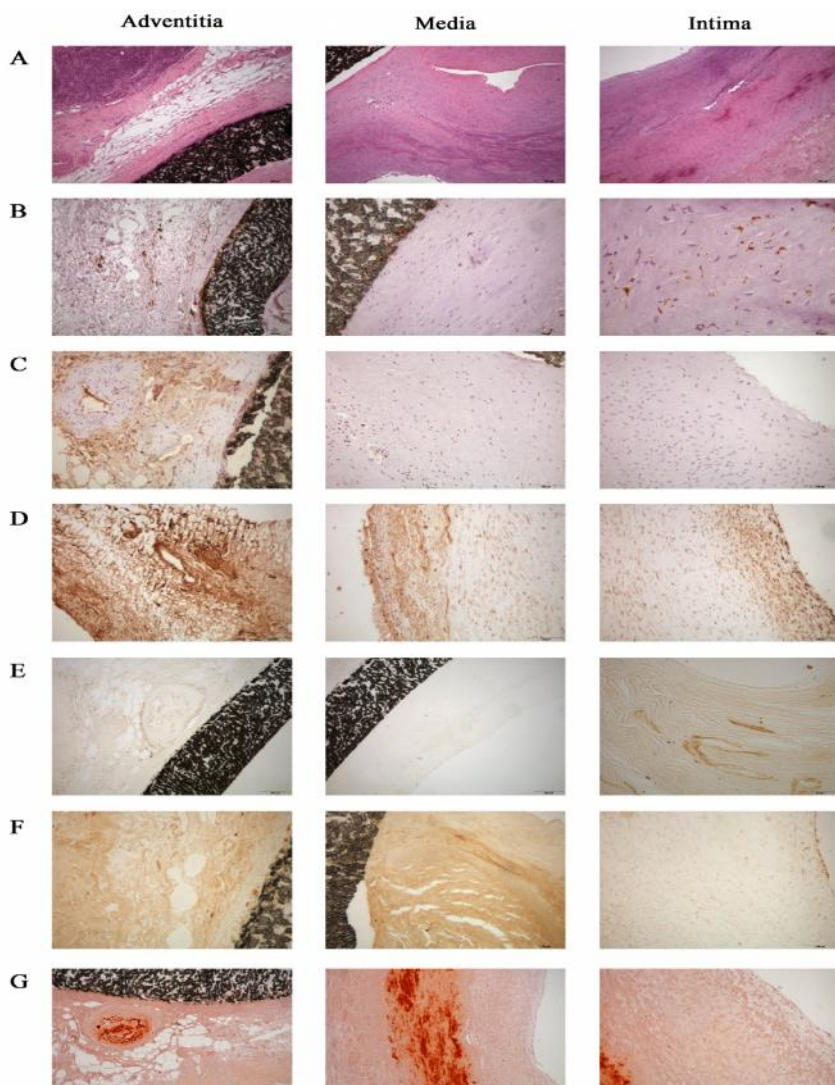
- pseudohypoxic aging side of cancer oncometabolites. *Cell Cycle*. 2014;13(5):699-709. doi:10.4161/cc.28079.
293. Ramji DP, Davies TS. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(6):673-685. doi:10.1016/j.cytogfr.2015.04.003.
294. Yu K-D, Wang X, Yang C, Zeng X-H, Shao Z-M. Host genotype and tumor phenotype of chemokine decoy receptors integrally affect breast cancer relapse. *Oncotarget*. 2015;6(28):26519-26527. doi:10.18632/oncotarget.4470.
295. Witztum JL, Lichtman AH. The influence of innate and adaptive immune responses on atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:73-102. doi:10.1146/annurev-pathol-020712-163936.
296. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473(7347):317-325. doi:10.1038/nature10146.
297. van Wijk DF, van Leuven SI, Sandhu MS, et al. Chemokine ligand 2 genetic variants, serum monocyte chemoattractant protein-1 levels, and the risk of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(7):1460-1466. doi:10.1161/ATVBAHA.110.205526.
298. Rull A, Hernandez-Aguilera A, Fibla M, et al. Understanding the role of circulating chemokine (C-C motif) ligand 2 in patients with chronic ischemia threatening the lower extremities. *Vasc Med*. 2014;19(6):442-451. <http://vmj.sagepub.com/archive/><http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed12&NEWS=N&AN=2014949230><http://vmj.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1358863X14554034>.
299. Zweemer AJM, Toraskar J, Heitman LH, IJzerman AP. Bias in chemokine receptor signalling. *Trends Immunol*. 2014;35(6):243-252. doi:10.1016/j.it.2014.02.004.
300. Fra AM, Locati M, Otero K, et al. Cutting edge: scavenging of inflammatory CC chemokines by the promiscuous putatively silent chemokine receptor D6. *J Immunol*. 2003;170(5):2279-2282. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12594248>. Accessed May 28, 2016.
301. Fukuma N, Akimitsu N, Hamamoto H, Kusuhara H, Sugiyama Y, Sekimizu K. A role of the Duffy antigen for the maintenance of plasma chemokine concentrations. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;303(1):137-139.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12646177>. Accessed May 28, 2016.
302. Cancellieri C, Caronni N, Vacchini A, et al. Review: Structure-function and biological properties of the atypical chemokine receptor D6. *Mol Immunol.* 2013;55(1):87-93. doi:10.1016/j.molimm.2012.08.003.
 303. Donà E, Barry JD, Valentin G, et al. Directional tissue migration through a self-generated chemokine gradient. *Nature.* 2013;503(7475):285-289. doi:10.1038/nature12635.
 304. Schall TJ, Proudfoot AEI. Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(5):355-363. doi:10.1038/nri2972.
 305. McLaren JE, Michael DR, Ashlin TG, Ramji DP. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy. *Prog Lipid Res.* 2011;50(4):331-347. doi:10.1016/j.plipres.2011.04.002.
 306. Michael DR, Ashlin TG, Buckley ML, Ramji DP. Liver X receptors, atherosclerosis and inflammation. *Curr Atheroscler Rep.* 2012;14(3):284-293. doi:10.1007/s11883-012-0239-y.
 307. Plutzky J. The PPAR-RXR transcriptional complex in the vasculature: energy in the balance. *Circ Res.* 2011;108(8):1002-1016. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.226860.
 308. Cheang WS, Fang X, Tian XY. Pleiotropic effects of peroxisome proliferator-activated receptor and in vascular diseases. *Circ J.* 2013;77(11):2664-2671. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24107399>. Accessed June 11, 2016.
 309. Cochain C, Zerneck A. Noncoding RNAs in vascular inflammation and atherosclerosis: recent advances toward therapeutic applications. *Curr Opin Lipidol.* 2014;25(5):380-386. doi:10.1097/MOL.000000000000108.
 310. Bessueille L, Magne D. Inflammation: a culprit for vascular calcification in atherosclerosis and diabetes. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(13):2475-2489. doi:10.1007/s00018-015-1876-4.
 311. Sierra-Filardi E, Nieto C, Domínguez-Soto A, et al. CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. *J Immunol.* 2014;192(8):3858-3867. doi:10.4049/jimmunol.1302821.
 312. Lin H-L, Ueng K-C, Hsieh Y-S, Chiang W-L, Yang S-F, Chu S-C. Impact of MCP-1 and CCR-2 gene polymorphisms on

- coronary artery disease susceptibility. *Mol Biol Rep.* 2012;39(9):9023-9030. doi:10.1007/s11033-012-1773-y.
313. McLaren JE, Michael DR, Ashlin TG, Ramji DP. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy. *Prog Lipid Res.* 2011;50(4):331-347. doi:10.1016/j.plipres.2011.04.002.
314. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med.* 2011;17(11):1410-1422. doi:10.1038/nm.2538.
315. Bäck M, Hansson GK. Anti-inflammatory therapies for atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12(4):199-211. doi:10.1038/nrcardio.2015.5.
316. Michael DR, Ashlin TG, Buckley ML, Ramji DP. Liver X receptors, atherosclerosis and inflammation. *Curr Atheroscler Rep.* 2012;14(3):284-293. doi:10.1007/s11883-012-0239-y.
317. Li N, Salter RC, Ramji DP. Molecular mechanisms underlying the inhibition of IFN- γ -induced, STAT1-mediated gene transcription in human macrophages by simvastatin and agonists of PPARs and LXRs. *J Cell Biochem.* 2011;112(2):675-683. doi:10.1002/jcb.22976.
318. Argmann CA, Van Den Diepstraten CH, Sawyez CG, et al. Transforming growth factor-beta1 inhibits macrophage cholesteryl ester accumulation induced by native and oxidized VLDL remnants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(12):2011-2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742878>. Accessed February 17, 2016.
319. Everett BM, Pradhan AD, Solomon DH, et al. Rationale and design of the Cardiovascular Inflammation Reduction Trial: a test of the inflammatory hypothesis of atherothrombosis. *Am Heart J.* 2013;166(2):199-207.e15. doi:10.1016/j.ahj.2013.03.018.
320. Ridker PM, Thuren T, Zalewski A, Libby P. Interleukin-1 inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Am Heart J.* 2011;162(4):597-605. doi:10.1016/j.ahj.2011.06.012.
321. Ridker PM, Howard CP, Walter V, et al. Effects of interleukin-1 inhibition with canakinumab on hemoglobin A1c, lipids, C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen: a phase IIb randomized, placebo-controlled trial. *Circulation.*

- 2012;126(23):2739-2748.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.122556.
322. Gilbert J, Lekstrom-Himes J, Donaldson D, et al. Effect of CC chemokine receptor 2 CCR2 blockade on serum C-reactive protein in individuals at atherosclerotic risk and with a single nucleotide polymorphism of the monocyte chemoattractant protein-1 promoter region. *Am J Cardiol.* 2011;107(6):906-911. doi:10.1016/j.amjcard.2010.11.005.
323. Ait-Oufella H, Sage AP, Mallat Z, Tedgui A. Adaptive (T and B cells) immunity and control by dendritic cells in atherosclerosis. *Circ Res.* 2014;114(10):1640-1660. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302761.

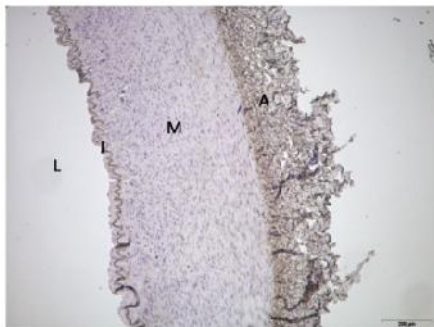
MATERIAL SUPLEMENTÀRI



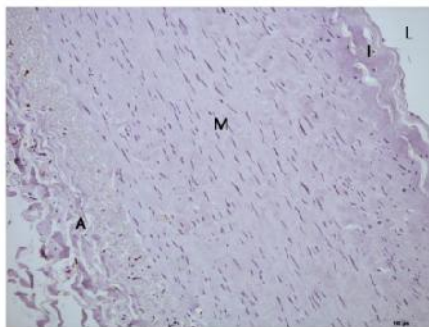
Supplementary Figure 1. Representative photomicrographs of results obtained in immunochemical studies of arteries surgically excised from patients during revascularisation procedures. The distribution of expression was not uniform throughout the anatomy of the arteries (columns). For illustrative purposes, images are presented from the same artery stained with haematoxylin-eosin (A), antibody against CD68, specific for macrophages (B), antibody against CCL2 (C), and antibodies against specific receptors (CCR2 (D), DARC (E) and D6 (F)). Complex crystals in the media are shown in black via unspecific staining with haematoxylin. Calcium deposition in the media was depicted using the alizarin red S method (G).

The orientation and magnification was chosen to appreciate atherosclerosis better the changes in intima, media and adventitia. (500µm, mag. x20; 200µm, mag. x40; 100µm, mag. x100; 50µm, mag. x200). Information is extended in subsequent figures.

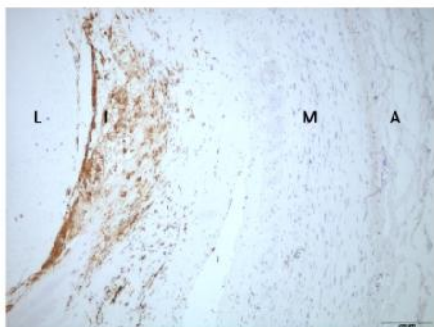
A



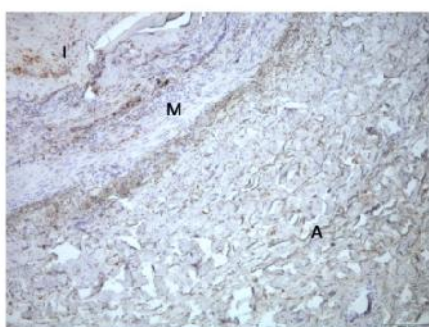
B



C



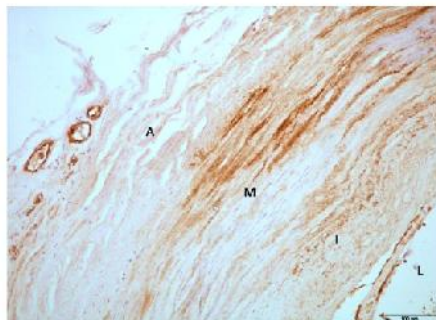
D



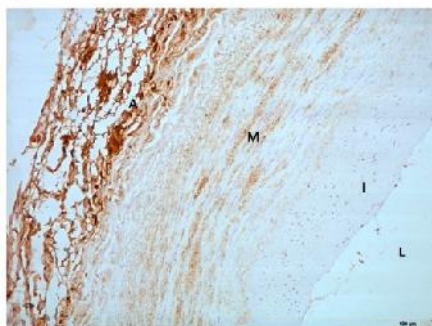
A



B



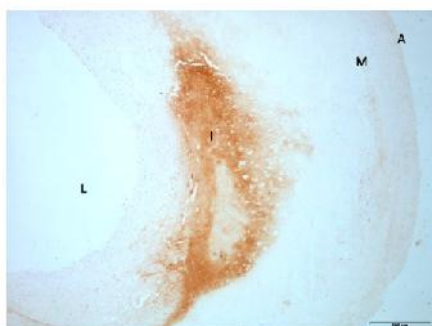
C



D



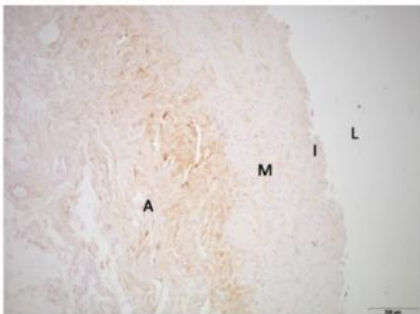
E



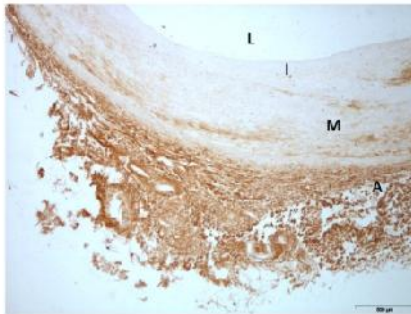
F



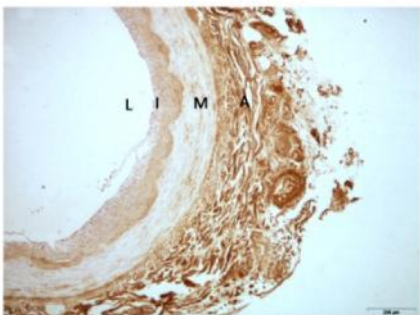
A



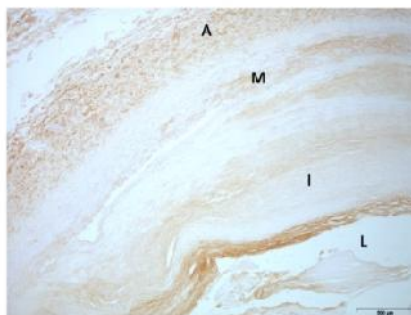
B



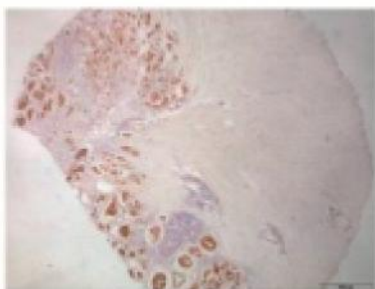
C



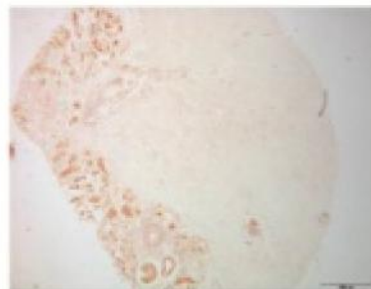
D



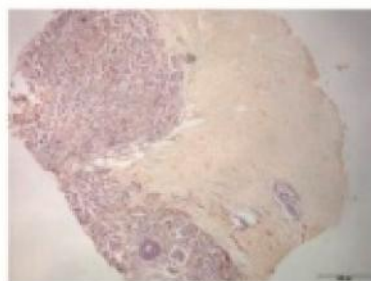
CCL2



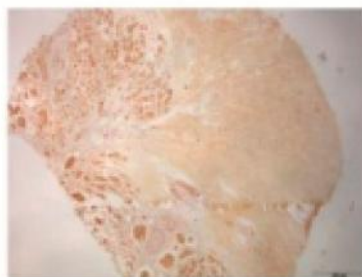
CCR2



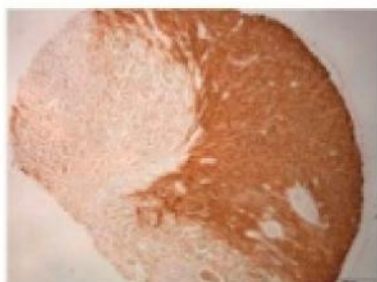
CD68

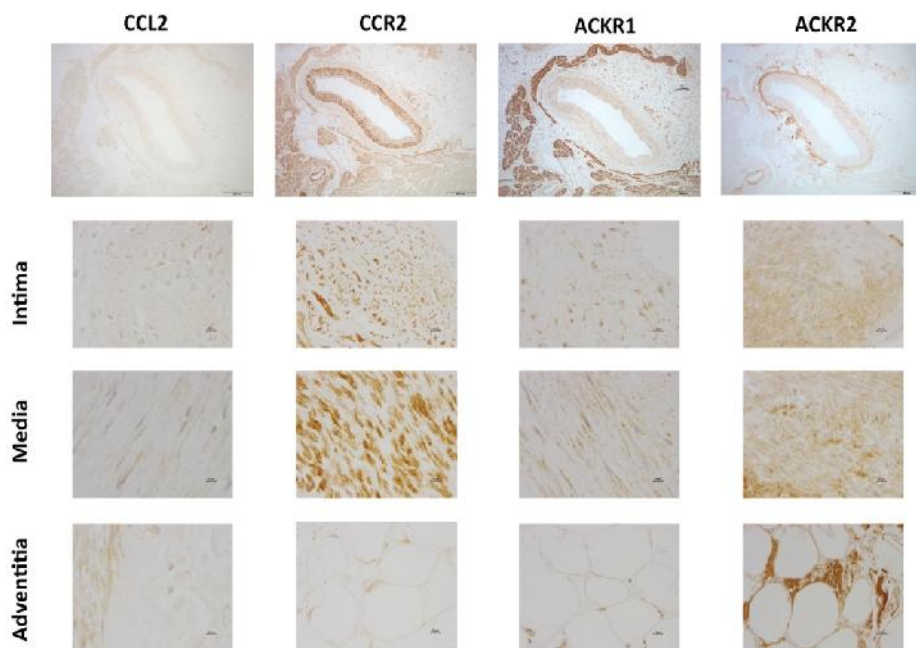


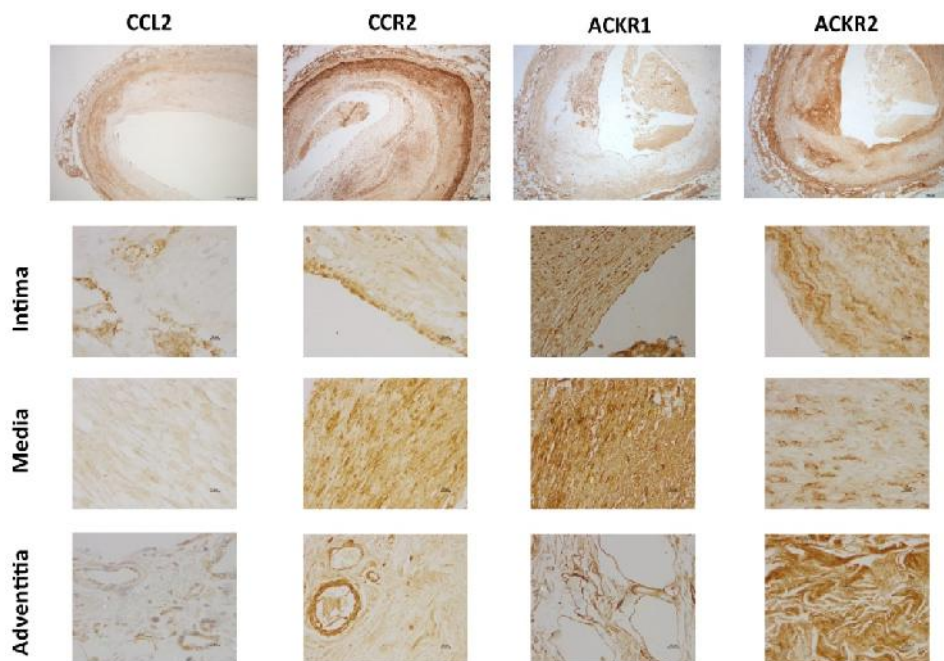
ACKR1



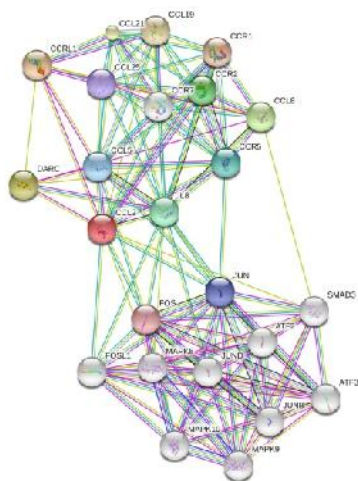
ACKR2



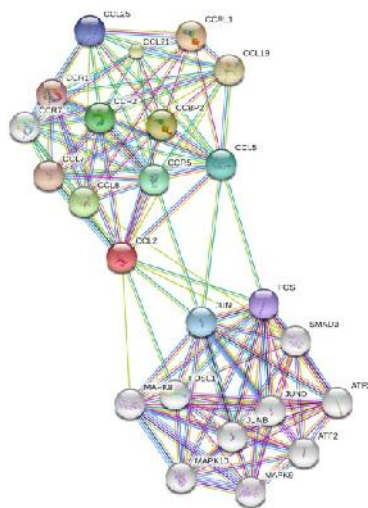




A



B



ANNEX 1

PUBLICACIONS

Prediction of cervical intraepithelial neoplasia grade 2+ (CIN2+) using HPV DNA testing after a diagnosis of atypical squamous cell of undetermined significance (ASC-US) in Catalonia, Spain

Raquel Ibáñez, Judit Moreno-Crespi, Montserrat Sardà, Josefina Autonell, Montserrat Fibla, Cristina Gutiérrez, Belen Lloveras, María Alejo, Isabel Català, Francesc Alameda, Miquel Casas, F Xavier Bosch and Sílvia de Sanjosé Email author

BMC Infectious Diseases BMC series ç open, inclusive and trusted 201212:25
DOI: 10.1186/1471-2334-12-25 Published: 26 January 2012
PMID:22280073 [PubMed - indexed for MEDLINE]
PMCID: PMC3332282

Protecting the underscreened women in developed countries: the value of HPV test.

Ibáñez R, Autonell J, Sardà M, Crespo N, Pique P, Pascual A, Martí C, Fibla M, Gutiérrez C, Lloveras B, Moreno-Crespi J, Torrent A, Baixeras N, Alejo M, Bosch FX, de Sanjosé S¹.

BMC Cancer. 2014 Aug 8;14:574. DOI: 10.1186/1471-2407-14-574.
PMID: 25102758 [PubMed - indexed for MEDLINE]
PMCID: PMC4137095

Understanding the role of circulating chemokine (C-C motif) ligand 2 in patients with chronic ischemia threaterosclerosing the lower extremities.

Rull A¹, Hernandez-Aguilera A², Fibla M³, Sepulveda J⁴, Rodríguez-Gallego E¹, Riera-Borrull M¹, Sirvent JJ³, Martín-Paredero V⁴, Menendez JA⁵, Camps J¹, Joven J⁶.

Vasc Med. 2014 Dec;19(6):442-51.
DOI: 10.1177/1358863X14554034. Epub 2014 Oct 21.
PMID:25336430 [PubMed - indexed for MEDLINE]

ARTICLES

Understanding the role of circulating chemokine (C-C motif) ligand 2 in patients with chronic ischemia threatening the lower extremities

Anna Rull, Anna Hernandez-Aguilera, Montserrat Fibla, Julio Sepulveda, Esther Rodríguez-Gallego, Marta Riera-Borrull, Juan J Sirvent, Vicente Martín-Paredero, Javier A Menendez, Jordi Camps and Jorge Joven

Vasc Med published online 21 October 2014

DOI: 10.1177/1358863X14554034

The online version of this article can be found at:

<http://vmj.sagepub.com/content/early/2014/10/18/1358863X14554034>

Published by:



<http://www.sagepublications.com>

On behalf of:



Additional services and information for *Vascular Medicine* can be found at:

Email Alerts: <http://vmj.sagepub.com/cgi/alerts>

Subscriptions: <http://vmj.sagepub.com/subscriptions>

Reprints: <http://www.sagepub.com/journalsReprints.nav>

Permissions: <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>

>> [OnlineFirst Version of Record](#) - Oct 21, 2014

[What is This?](#)



Understanding the role of circulating chemokine (C-C motif) ligand 2 in patients with chronic ischemia threatening the lower extremities

Vascular Medicine

1-10

© The Author(s) 2014

Reprints and permissions:

sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/1358863X14554034

vmj.sagepub.com



Anna Rull¹, Anna Hernandez-Aguilera^{1,2}, Montserrat Fibla³, Julio Sepulveda², Esther Rodríguez-Gallego¹, Marta Riera-Borrull¹, Juan J Sirvent³, Vicente Martín-Paredero², Javier A Menendez⁴, Jordi Camps¹ and Jorge Joven¹

Abstract

The role of chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) in peripheral artery disease is unclear. We measured the difference between serum and plasma levels of CCL2 in patients with chronic ischemia threatening the lower extremities following the observation that atypical chemokine receptors in blood and tissue cells may prevent CCL2 from entering the circulation and consequently modulate its function of attracting monocytes to the site of lesion. To identify the influence of CCL2, we compared the patients' values to those in bio-banked samples from a control population. Further, we explored the association with the Asp42Gly polymorphism (rs12075) in Duffy antigen chemokine receptor; one of these atypical chemokine receptors. When possible, we evaluated in surgically excised normal and affected arteries the calcium burden as well as the expression of CCL2 and related receptors reflecting the inflammatory status. Our findings indicate that circulating CCL2 was significantly associated with the severity and presence of the disease (OR 0.966, 95% CI 0.944 to 0.988, $p = 0.003$). Circulating CCL2 was dependent on the rs12075 genotype (AA>AG>GG), which, probably, indicates a higher expression of chemokine receptor in the arteries of AA subjects. The associations with genetic variants and the over-expression of atypical chemokine receptors in diseased arteries may have potential implications and our data indicate that CCL2 may represent a previously unrecognized factor that needs to be considered in the screening of patients with risk factors for peripheral artery disease.

Keywords

atherosclerosis, biological markers, cytokines, genetics, metabolism, peripheral artery disease, risk factors

Introduction

Lower extremity peripheral artery disease (PAD) is a major health concern that may be associated with catastrophic events in different arterial territories. The disease increases with age and, in people over the age of 55 years, the prevalence of PAD in the legs is approximately 20%.¹⁻⁴ Paradoxically, although preventive measures are effective in early stages, PAD is under-diagnosed when asymptomatic and, consequently, prevention is either applied too late or not at all.¹⁻⁶ Therefore, the search for laboratory surrogates is a relevant pursuit. We aimed to increase our understanding of the chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) in the overall inflammatory response observed in patients who develop chronic limb ischemia in order to identify associated factors⁷⁻¹² and to test the hypothesis that the expression of this chemokine and its receptors is increased in diseased arteries. This is based on our previous findings indicating that CCL2 and CCR2 (its cell surface receptor) are widely

¹Unitat de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari de Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

²Servei d'Angiologia, Cirurgia Vasculard i Endovascular, Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain

³Servei d'Anatomia Patològica, Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain

⁴Molecular Oncology Group, Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI), Girona, Spain

Corresponding author(s):

Jorge Joven / Jordi Camps
Unitat de Recerca Biomèdica
Universitat Rovira i Virgili
c/ Sant Llorenç 21
43201 Reus
Spain
Email: jorge.joven@urv.cat
jcamps@grupsagessa.cat

distributed in mice.¹³ The effect in human tissues is unknown. We also hypothesized that factors affecting the availability and/or systemic function of CCL2 may result in misinterpretation of clinical measurements.

We propose a plausible clinical impact of CCL2 in PAD because: first, the biological function of the CCL2/CCR2 pathway is its ability to induce cell migration; second, arteries with moderate atherosclerosis accumulate CCL2 in response to a variety of pro-inflammatory stimuli; and third, CCL2 may represent a potential therapeutic target.^{7,14–18} We have already shown that serum CCL2 levels are consistently higher than plasma CCL2 levels and that analytical variability is significantly higher in serum.¹⁸ This finding may alter the relevance of the observed clinical associations.¹⁹ Consequently, we reasoned that measurement of CCL2 should be performed in both types of biological samples and we arbitrarily defined circulating CCL2 as the difference between serum and plasma under identical conditions (Δ CCL2). A possible explanation for differences during laboratory analyses may lie in poorly understood chemokine receptors collectively known as ‘atypical’, ‘silent’, or ‘decoy’. These are G-protein coupled receptors that do not activate conventional signaling events (mainly, Duffy blood group chemokine receptor (DARC), D6, CCX-CKR1 and CXCR7).²⁰ Conversely, they may internalize, degrade or transport ligands (i.e. they have the potential to create clinically relevant chemokine patterns in tissues). Their levels of expression have not been explored previously in diseased arteries.

A recent genome-wide-analysis study identified a strong association between serum CCL2 levels and chromosome 1q22-q23, especially at the rs12075 marker in *DARC*.¹⁷ This was not confirmed in plasma, and a recent study revealed complex associations that may be relevant in the study of atherosclerosis.²¹ Here we present, for the first time in patients with PAD, the association between the Asp42Gly polymorphism (rs12075) in the *DARC* gene and circulating CCL2 levels, in relation to the relative expression of selected ligand and receptors in damaged arteries. Despite the apparent complexity in the interpretation, taken together our data suggest that circulating chemokines may play an important role in the pathogenesis of PAD.

Methods

Study population

This is an observational, cross-sectional study with a pre-set duration of 3 years (from January 2009 to December 2012). It involves data prospectively collected from selected patients referred to the vascular disease department of our hospital for the assessment of intermittent claudication. Diagnosis was with standard clinical assessments that included measurement of the ankle–brachial index (ABI), non-invasive imaging, and angiography when indicated. Our hospital’s ethics committee and institutional review board approved the procedures of the study protocol, and written informed consent was obtained from the participants prior to entry into the study (10-04-29/4proj3; 11-10-27/10proj1).

We recruited 174 patients aged between 55 and 85 years, in whom chronic limb ischemia was diagnosed (>2 weeks of resting pain or ulcers attributed to arterial occlusion disease). Staging III or IV was according to Fontaine, but the patients were only included if ulcers healed through medical therapy, irrespective of whether revascularization was further indicated to improve quality of life and to increase survival. These criteria were to exclude other factors such as infection, repeated trauma or significant neuropathy, and to ensure that the inclusion of diabetic patients does not constitute bias.²² We did not find significant difficulties in recalling past events and main exclusion criteria were acute ischemia, signs of infection, renal failure, liver disease, cancer, or autoimmune diseases. The number of patients recruited within our fixed term of 3 years ($n=174$) was higher than the minimal sample size required to analyze biological markers with this design, and taking into account the incidence and laboratory variability^{6–8} ($\alpha=0.02$, $\beta=0.85$; $n=125$). Diabetes, hypertension and dyslipidemia were defined according to established criteria.^{23–25} The comparison group was composed of bio-banked samples ($n=154$) representing the same general population from which the cohort of patients was selected. The controls were known to be unaffected (i.e. normal ABI values) and aged >50 years. To preserve the characteristics of the general population and to avoid population stratification, no other matching procedure was performed²⁶ and, consequently, there was a difference in age and gender distribution. However, these did not affect genetic studies and, presumably, did not skew the results of other comparisons.⁷

Laboratory measurements

At the time of recruitment, fasting blood samples were drawn and serum and plasma obtained. Blood cell counts were performed immediately in an automatic cell counter (Coulter LH 750 Analyser; Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Plasma concentrations of interleukin-8 (IL-8), soluble CD40 ligand (sCD40L) and soluble P-selectin (sP-selectin) were also measured immediately using a Bender MedSystems FlowCytomix detection on flow cytometry (Izasa, Barcelona, Spain). The remaining samples were frozen in aliquots at -80°C within 2 h of collection and stored until batched analyzed. Standard measurements were performed using enzymatic assays or chemiluminescent immunoassays.^{27,28} The updated homeostasis model assessment (HOMA2) estimates for insulin resistance were calculated.¹⁴ Plasma β_2 -microglobulin and C-reactive protein were measured using turbidimetric reagents obtained from Biokit (Barcelona, Spain). Plasma and serum CCL2 were measured with an ELISA-based assay (PeproTech, London, UK) as described.¹⁹ The difference between serum and plasma was expressed as Δ CCL2, or as a percentage [(serum – plasma) \times (100 / serum)]. The calculated value was considered a measurement of circulating CCL2, and used to investigate cell–cell interactions during laboratory handling. DNA was extracted from EDTA blood using a column-based method from Qiagen (Izasa) and samples genotyped for rs12075 using the TaqMan 5’ allelic discrimination

genotyping assay *C_2493442_10* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations.¹⁸

Immunohistochemical analyses

Portions of femoral and/or popliteal arteries from patients were obtained during surgical procedures for infra-inguinal limb revascularization ($n=30$). The same approved procedures had been used to generate non-affected donor tissue samples for banking ($n=10$) according to our Blood and Tissue Bank (www.bancsang.net/es/donants/donacio_teixits.html). After harvesting, the tissues were rinsed in phosphate buffer to remove residual blood and placed in at least 10 volumes of buffered formalin using a standard protocol for paraffin-embedded tissue samples. Three sections per slide were obtained and immunohistochemical studies were performed in batches, essentially as previously described.²⁹ Owing to differing manufacturing characteristics, and to ensure specific immunoreactivity, it is usual to test different antibodies from different suppliers before making the choice based on results obtained. A pre-requisite for an antibody is that it can be used for Western blot (WB) as well as immunochemical analyses, in order that the antibody can be checked against commercially supplied antigens. The optimal dilution and exposure time for each antibody were optimized for all subsequent analyses. In this particular study we used: D6, Abcam 1656, 1/1000; DARC, Abcam 58965, 1/500; CD68, Dako KP1, ready to use; CCR2, Abcam 21667, 1/50; and CCL2, Abcam (C-17) sc-1304, 1/500. The appropriate secondary antibodies (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) were used at a dilution of 1:200. Detection was performed with the ABC peroxidase system (Vector Laboratories, Inc.). For all the immunohistochemical measurements, negative controls were treated the same as test samples, but omitting the primary antibodies in the incubation. Also, arteries were routinely stained for calcium deposits with alizarin red S (Sigma, Madrid, Spain). Immunoreactivity was quantified automatically for each antibody using an image analysis system (AnaliSYS, Munster, Germany).²⁹

Statistical methods

The Kolmogorov–Smirnov test was used to check for normality of distribution of the variables. Values are presented either as mean (SEM) or median (interquartile range: the 1st quartile subtracted from the 3rd quartile). Comparisons between groups were made with Student's unpaired *t*-test or Kruskal–Wallis one-way analysis. An allelic frequency description and Hardy–Weinberg equilibrium test were performed using SNPStats. The crude odds ratio (OR) and their 95% confidence intervals (95% CIs) for genotype associations were calculated using the inheritance model selected by the Akaike Information Criterion.³⁰ Logarithmic transformations were used in some cases to model nonlinear relationships. Multiple regression models were used to analyze the association between variables and results are provided only when the model fits the data (i.e. relatively

low residuals). We included all variables in multivariable analyses as on theoretical grounds all have shown to be either risk factors or potential confounders. The number of variables was reduced, however, according to the explanatory or predictive purpose of the model. We routinely used the forward stepwise selection as the variable selection method in each analysis and at an arbitrarily specified significance level of $p<0.05$. Data were analyzed with SPSS version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Study population

We evaluated 174 patients (348 limbs) and identified 195 limbs with the diagnosis of chronic limb ischemia, as described above. Decreased, or absent, pulse was recorded in all patients and, in most, dry skin and coolness to palpation. Ulcers (Fontaine stage IV) were found in 120 limbs (61.5%) and pain at rest (Fontaine stage III) in 75 limbs (38.5%). The ankle systolic pressure ranged between 27 and 58 mmHg (41 ± 9 mmHg) and the ABI values between 0.3 and 0.5 (0.39 ± 0.17). Among the remaining limbs, the ABI was <0.9 in 143 and >0.9 in 10. Overall, there was no difference between right and left limbs with respect to ABI values (0.59 ± 0.04 and 0.61 ± 0.04 , respectively). Other selected characteristics and descriptive variables of the patient cohort and population group are depicted in Table 1. Prescriptions are commonly obtained from the attending general practitioners. Medication use was recalled from questionnaires applied to the patients, but these probably indicate adherence rather than actual prescriptions. There was clinical evidence of concomitant cerebrovascular or coronary artery disease in 82 patients (47.1%). Most patients ($n=141$, 81.0%) were current or former smokers (27.3% in the population control group) and other co-morbidities were significantly higher ($p<0.001$) in patients than in the population control, including hypertension (66% vs 13.2%) and dyslipidemia (31.6% vs 10.0%). Of note, 15 patients were diabetic ($n=1$ in the population control) that were managed with either insulin ($n=3$) or metformin and, as mentioned above, the possibility of bias was considered negligible.

Biological significance of CCL2 in PAD

Plasma and serum CCL2 concentrations were higher in patients than in controls and measurements in both samples were significantly correlated (Figure 1). The difference (Δ CCL2) between values in plasma and serum CCL2 was significantly ($p<0.0001$) lower in patients. We interpret the significant decrease in patients as an indication that CCL2 is either functioning or sequestered in affected arteries. A substantial amount of CCL2 may be normally bound to blood cells and, consequently, only fully detected in serum (i.e. after coagulation). The platelet count was higher in patients than in controls, and significantly correlated with Δ CCL2 ($\rho = 0.214$; $p = 0.015$). The design of the study only allows the computation of the odds ratio (OR). Despite being less sensitive than relative risk, we found (once adjusted for variables as outlined in Table 1) that plasma

Table 1. Selected descriptive characteristics and laboratory variables in participants.

	Control n=154	Patients n=174	p-value
Clinical characteristics			
Age, years	68.03 (0.56)	71.26 (0.76)	0.01
Male, %	44.8	85.1	<0.001
Medication, %			
ACEIs or ARBs	13.2	35.0	<0.001
Other anti-hypertensive agents	1.9	44.2	<0.001
Beta-blockers	0.6	11.6	<0.001
Statins	18.5	26.0	0.315
Fibrates	–	12.4	–
Insulin	–	5.7	–
Metformin	2.1	36.2	<0.001
Aspirin	11	50	<0.001
Clopidogrel	–	18	–
Pentoxifylline or cilostazol	–	16.3	–
Complete blood count			
Red blood cells, ×10 ¹² /L	4.59 (0.02)	4.09 (0.07)	<0.01
Hemoglobin, g/dL	14.04 (0.08)	12.28 (0.20)	<0.01
Leukocytes, ×10 ⁹ /L	6.64 (0.09)	8.83 (0.32)	<0.001
Platelets, ×10 ⁹ /L	213.06 (3.39)	280.97 (10.55)	<0.01
Biochemical variables			
Total cholesterol, mmol/L	5.37 (0.06)	3.98 (0.09)	<0.001
HDL-cholesterol, mmol/L	1.33 (0.02)	1.08 (0.03)	<0.001
LDL-cholesterol, mmol/L	3.40 (0.05)	2.30 (0.08)	<0.001
Triglycerides, mmol/L	1.42 (0.06)	2.94 (0.10)	<0.001
Glucose, mmol/L	6.15 (0.13)	6.61 (0.25)	0.115
Insulin, pmol/L	79.34 (9.45)	144.48 (20.34) ^a	0.004
HOMA2 IR	1.69 (0.21)	2.68 (0.34) ^a	0.015
Inflammation-related variables			
ΔCCL2, %	38.8 (1.8)	18.1 (2.2)	<0.0001
β ₂ -microglobulin, mg/Lb	2.45 (0.71–2.96)	4.98 (1.9–5.2)	<0.01
Fibrinogen, mg/dLb	285 (126–312)	676 (431–825)	<0.01
Hs-CRP, mg/Lb	2.7 (1.2–5.8)	19.6 (6.2–24.7) [§]	<0.0001
IL-8, ng/Lb	2.14 (0.81–2.52)	3.46 (1.12–5.12)	<0.05
Soluble CD40 ligand, pg/mLb	149 (84–198)	248 (107–310)	<0.05
Soluble P-selectin, ng/mLb	40 (22–60)	208 (132–354)	<0.001

^an=164.

Values are provided as percentage, Mean (SEM) or Median (interquartile range).

ACEIs, angiotensin-converting enzyme inhibitors; ARBs, angiotensin receptor blockers; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; HOMA2 IR, Homeostatic model assessment of insulin resistance; CCL2, chemokine (C-C motif) ligand 2; Hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; IL, interleukin.

CCL2 values (OR 1.007, 95% CI 1.003 to 1.012; $p = 0.001$) and ΔCCL2 (OR 0.966, 95% CI 0.944 to 0.988; $p = 0.003$) were associated with the presence of the disease. This is probably useful diagnostic and prognostic information. This association was not observed for any other inflammation-related variable. Exploration of associations with other biological determinants showed that there were no significant associations with monocyte count, age, and smoking. However, diabetes mellitus affected the interpretation of serum and plasma CCL2. These measurements were associated with plasma insulin concentration and insulin resistance (data not shown). Because our method detects exogenous insulin, the association was calculated excluding patients taking insulin. Intriguingly, serum CCL2 concentrations were significantly lower in patients with diabetes mellitus than in those without diabetes [550.51

(40.07) vs 642.51 (69.31) pg/mL; $p < 0.001$] and this difference disappeared when CCL2 was measured in plasma [441.26 (26.27) vs 435.46 (29.72) pg/mL]. These results reinforce the concept that ΔCCL2 is considerably more informative in these patients. To explore the effect of genetic variants with a potential impact on CCL2 we determined the relationships between the Asp42Gly polymorphism (rs12075) in the *DARC* gene and the circulating CCL2 levels in patients with PAD. The rate of successful genotyping was 96%. Genotype frequencies did not deviate from the Hardy–Weinberg equilibrium, either in patients or in controls. The A allele was more frequent (61%) than the G allele (35%) and there were no differences in distribution between patients and controls (Figure 2A). However, circulating CCL2 was clearly associated with the genotype (AA>AG>GG) both in population controls and in patients

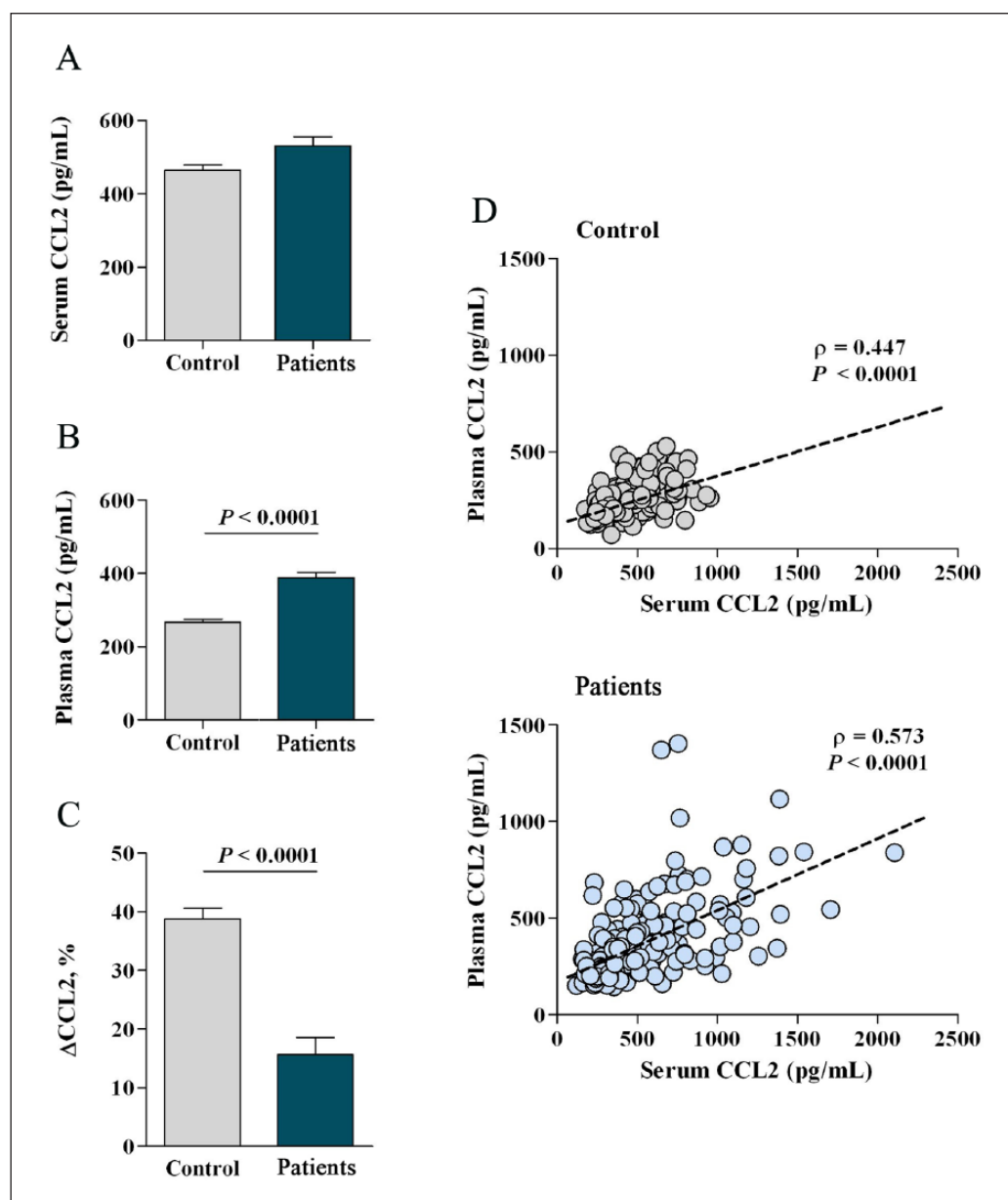


Figure 1. CCL2 concentrations (pg/mL) in serum (A) were uniformly higher than in plasma (B) in controls and patients. The differences between serum and plasma CCL2 (Δ CCL2) were calculated, and arbitrarily defined as the total amount of circulating CCL2 (C). Serum and plasma CCL2 concentrations maintained significant correlations in controls and patients (D).

(Figure 2B). Following adjustment for clinical, laboratory and genetic variables and using the over-dominant model of inheritance, Δ CCL2 remained significantly associated with the presence of PAD (OR 0.965; 95% CI 0.942 to 0.989; $p = 0.004$). As such, these genotypes appear to play a role in CCL2 function in the tissue in PAD. A preliminary assessment of the expression of CCL2 and receptors in arteries is justified.

Histology observations

Representative results in affected arteries are summarized in Supplementary Figure 1 (all supplementary figures are available online with this article) in which the same artery stained with each described marker is depicted. Calcium deposition, found exclusively in the media, was a distinct

finding in affected arteries, compared to controls. The circumferential distribution of calcium as a dark stripe in hematoxylin and eosin stained samples was a relatively frequent observation (Figure 3A). There was no correlation between alizarin staining (Figure 3B) and the expression of other markers. The CD68-positive cells (macrophages) are not observed in normal or minimally affected arteries (Supplementary Figure 2, A and B) but are predominant in newly formed intima and in the adventitia of diseased arteries (Supplementary Figure 2, C and D). In non-diseased arteries, the CCL2-stained cells were observed only in the adventitia endothelium of the vessels (Figures 4A and 4B). In affected arteries, the expression of CCL2 was intense in the adventitia and the distribution was not homogeneous in the intima and media (Figures 4C and 4D). Although there were some trends regarding this expression and circulating

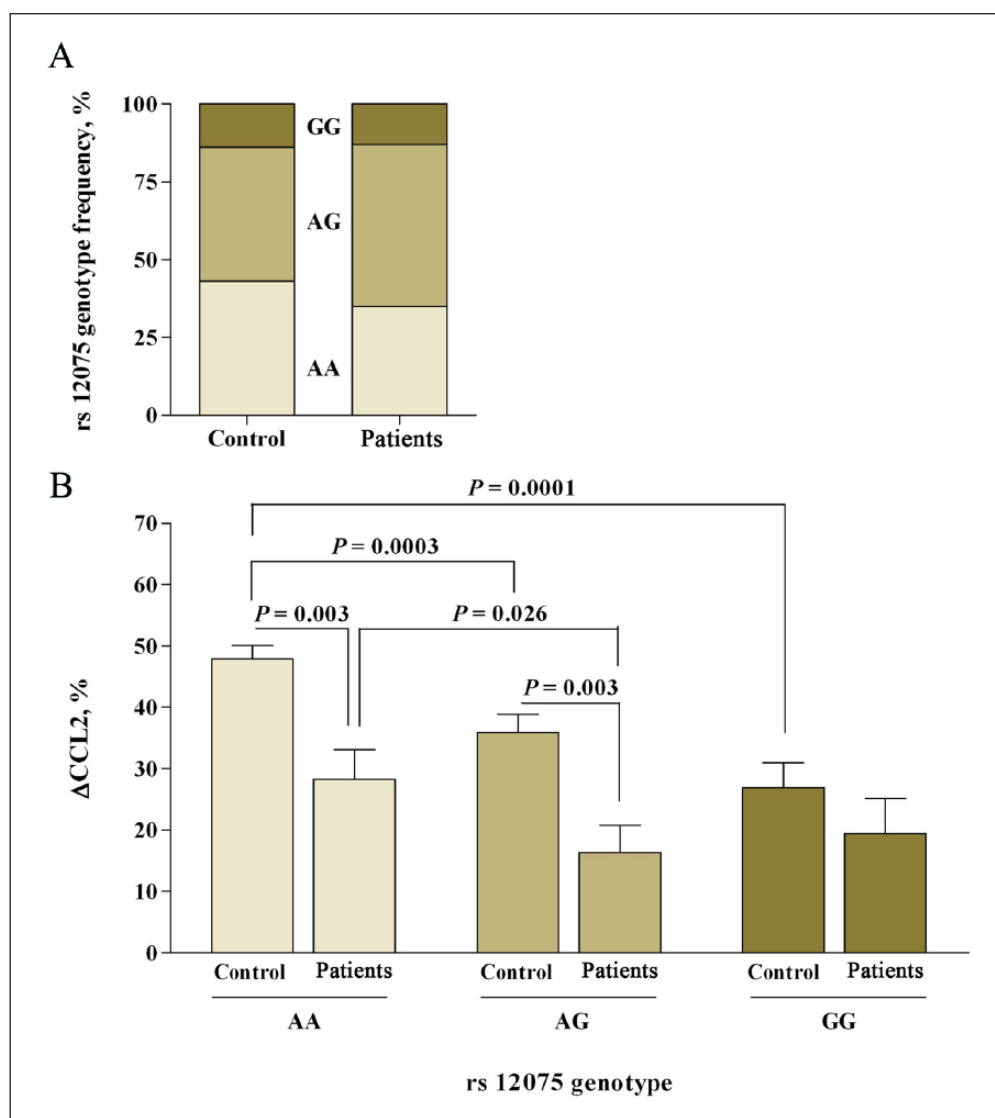


Figure 2. The rs12075 genotype distribution in patients compared to healthy participants from the same population (A). Differences between circulating CCL2 (Δ CCL2) were related to the rs12075 (Asp42Gly) genotype (B).

CCL2 or *DARC* genotypes, the low number of specimens available for analysis precluded further inferences. The expression of CCR2-stained cells was strong and limited to the media in normal arteries. The expression in affected arteries was uniform throughout, including intima and adventitia (Figure 5). The increased presence of these functional receptors (i.e. CCR2) indicates that, probably, most cells are receptive to the presence of circulating CCL2 and, consequently, may be more reactive in the case of disease progression. *DARC*-stained cells were not found in normal arteries. The expression in the intima of affected arteries appears related, albeit non-significantly, to the genotypes investigated; in most cases, staining was intense in media and adventitia. Curiously, the expression of *DARC* is more intense in atheroma, which is in contrast with the expression of other chemokine receptors. It was also evident that the expression of *DARC* in arteries with higher deposition of calcium is limited to endothelial cells in contact with the lumen (Supplementary Figure 3). The expression of D6-stained cells was practically absent in normal arteries, but intense and widely distributed throughout

affected arteries. The expression of D6 in the intima was also limited, usually to cells in contact with the lumen (Supplementary Figure 4).

Discussion

The prevalence of PAD, a complex, multi-factorial and incompletely understood condition, is expected to rise. It carries significant morbidity and health care costs, especially in those developing critical limb ischemia. The available clinical management of these patients is poor, and prognosis is pessimistic.¹⁻³ In our study, as in others,³¹ it is distressing to note that risk factor modification is far from what could be considered optimal for such a condition. Atherosclerosis is increasingly being considered an inflammatory disease, and it is currently accepted that CCL2 is involved in its pathogenesis. In mouse models, overexpression of CCL2 increased the progression of atherosclerosis, deficiency of CCL2 reduced atherosclerosis, and plasma levels of CCL2 promote recruitment of monocytes and other immune cells to the vessel wall.³² The value of CCL2 as a

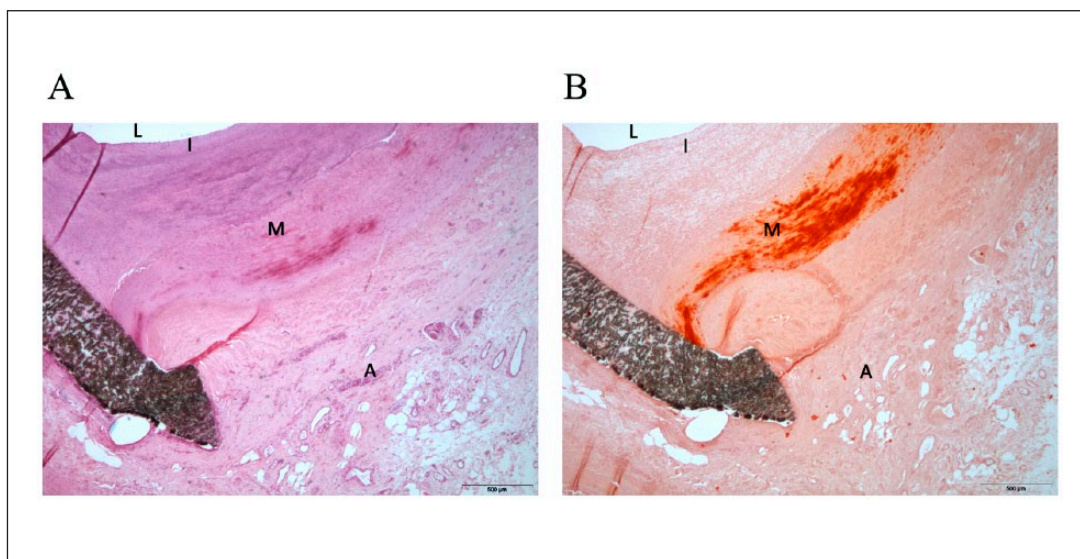


Figure 3. The presence of calcium in affected arteries is limited to the media, and unambiguous interpretation requires specific staining. Circumferential calcium deposition is observed as a dark stripe when stained with hematoxylin and eosin (A). Alizarin staining readily detects calcium without the formation of crystals (B). To clarify these findings, we have highlighted the approximate location of lumen (L), intima (I), media (M) and adventitia (A).

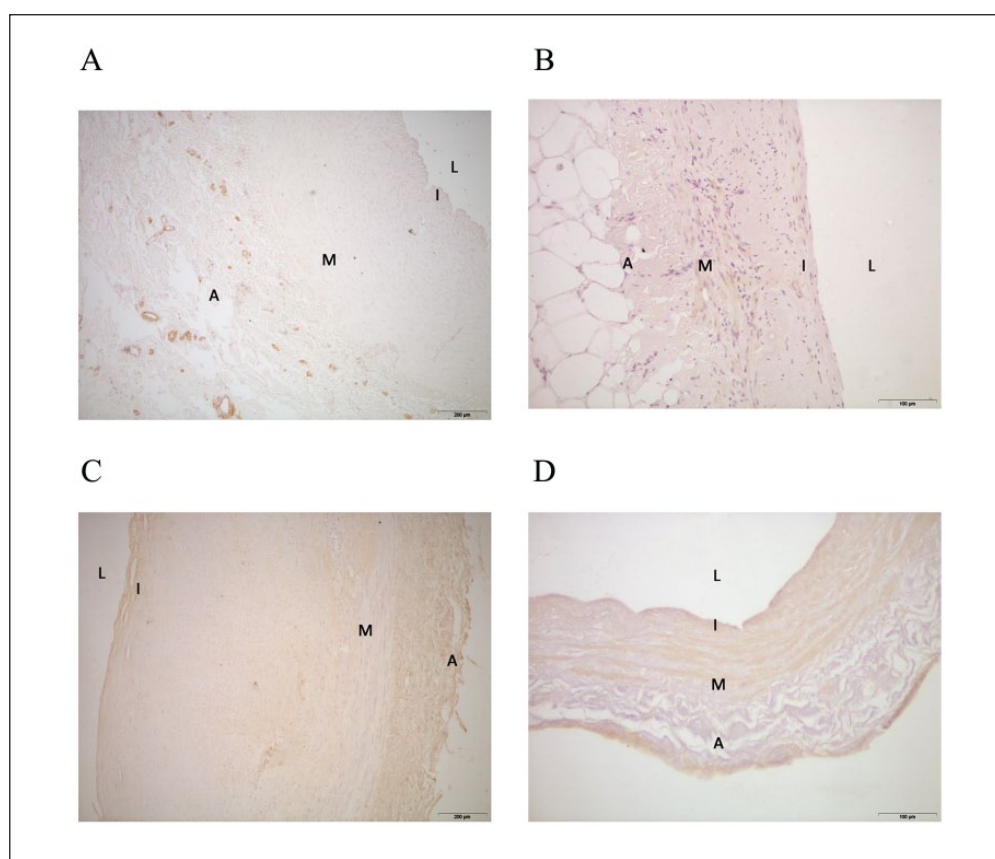


Figure 4. In normal or minimally affected arteries, CCL2 is only expressed in adventitia (A, B). Affected arteries depict widely heterogeneous expression throughout the arterial sites but, usually, are more intense in the adventitia (C, D). To clarify the findings, we have highlighted the approximate locations of lumen (L), intima (I), media (M) and adventitia (A). 200 µm, magnification $\times 40$; 100 µm.

cardiovascular risk marker has been assessed, mainly in coronary heart disease.^{33–36} Although the findings are often contradictory,¹⁶ there is no reason to exclude the relevance of lower extremities in atherosclerosis since there are limited, but consistent and suggestive, data to the contrary.^{37,38}

We identified a few factors limiting the interpretation of our findings. For example, CCL2 concentration in plasma is consistently lower than in serum, and interpretation differs depending on which measurement is used.^{17–19} Our data show that this is not an anecdotal finding. Interpretation

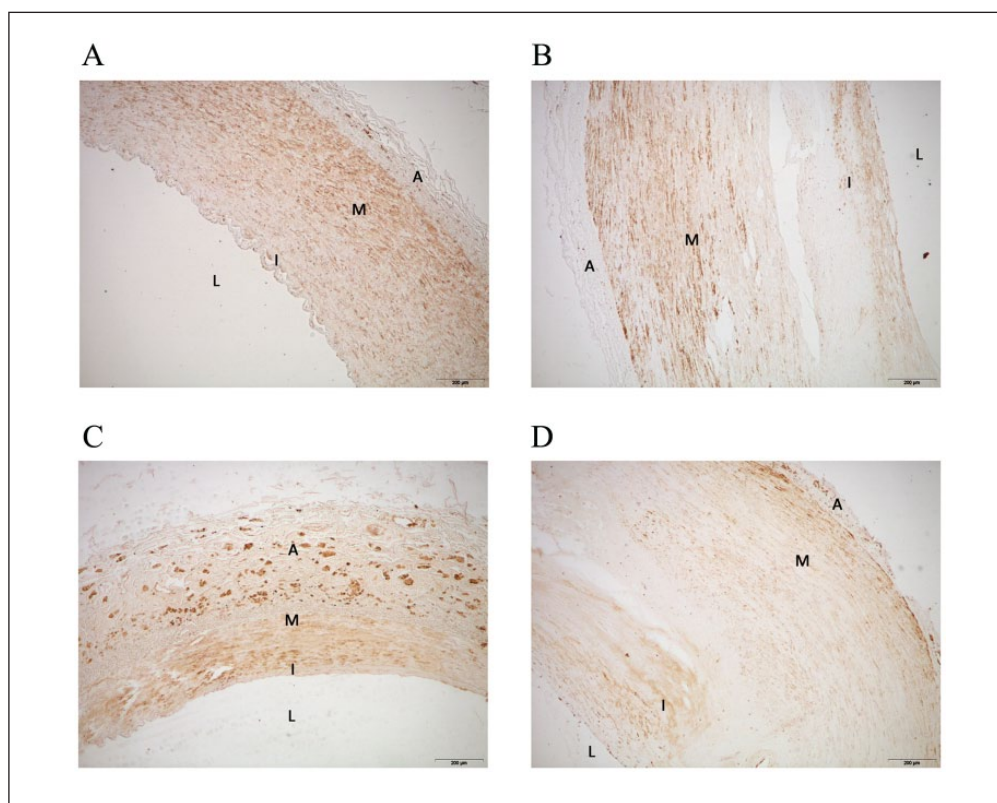


Figure 5. The expression of CCR2-stained cells was strong and limited, in normal arteries, to the media (A, B). In affected arteries the expression was uniform throughout the artery including intima and adventitia (C, D). To clarify findings, we have highlighted the approximate locations of lumen (L), intima (I), media (M) and adventitia (A). 200 μ m, magnification $\times 40$; 100 μ m.

is not simple, especially if there are other possible biological determinants (e.g. diabetes mellitus). Therefore, we propose the use of the difference between serum and plasma values (Δ CCL2) as a classifier of severity. There are at least two advantages: (1) a decrease in the influence of laboratory mishandling; and (2) that chemokines bound to blood and endothelial cells are taken into account. Using this approach, the alternative measure of the total amount of circulating CCL2 (i.e. Δ CCL2) is strongly associated with critical limb ischemia, and remains a powerful predictor when adjusted for other confounding factors. Of note is that we observed that severe and extensive lesions are consistently associated with significantly decreased Δ CCL2 values. We interpret our data as being the result of a high burden of damaged tissue. Plasma CCL2 concentrations may vary but do not reflect CCL2 bound to blood cells such as platelets.³⁹ Serum CCL2 could represent a measurement of CCL2 post-coagulation. The combination of both measurements would indirectly represent the amount of CCL2 expressed, or transported, into the artery during protracted inflammatory stimuli (i.e. a measurement of chemokine availability and function in tissues).⁴⁰ More importantly, Δ CCL2 was not, in our study, associated with other inflammation-related variables. Further, preliminary results in an on-going prospective study (data not shown) suggest that these measurements may be useful for the stratification of the extent of PAD. The availability of CCL2 may be complicated by potential effects induced by differential expression of functional receptors (CCR2)

and the presence of atypical chemokine receptors of unknown function in the regulatory network which enables the organism to modulate leukocyte migration.⁴⁰ For the first time in the current literature, we observed that a genetic polymorphism of *DARC* may be a contributing factor. Genotype frequencies in patients and in unaffected members of the same population are similar, but Δ CCL2 values are higher in genotype AA and lower in GG. Differences in Δ CCL2 between cases and controls were significant, and suggest a higher expression of these receptors in patients with AA. It is consequently a candidate genetic marker that warrants further investigation. Our histologic observations failed to show significant associations, but we found that the expression of CCR2, DARC and D6 was increased in diseased arteries, and that the distributions in the arteries are not uniform. A pathogenic role is likely, and data suggest that atypical chemokine receptors modify chemokine availability in PAD. Although these receptors have no involvement in cell migration, a modulation of the inflammatory response is likely. It should be mentioned that our finding of a significant calcium burden in the arterial tissue could be clinically important since patency rates with surgical interventions are low in cases of very calcified arteries. This high calcium load may represent an unrecognized confounding factor.

A number of limitations should be recognized in this study. First, despite our efforts to minimize the effect of diabetes mellitus (including neuropathy and difficulty in healing ulcers) it is not clear whether these patients should be

included, according to the initial definition of critical limb ischemia.²² Second, results obtained in a cross-sectional study do not quantify any improvement in clinical performance that can be gained from the addition of a biomarker to data on risk factors. Third, the genetic findings have, as yet, not been replicated in other studies and, as such, should be considered exploratory and requiring further validation. Fourth, the effects of suboptimal medical treatment the patients may have been receiving at the time of study, and the specific mechanisms of action of several drugs being administered, cannot be discarded as possible confounding factors.

Finally, PAD should be considered a clear example of a condition in which metabolism confronts inflammation. Recently, we developed a mouse model that over-expresses CCL2 and highlights an intriguing relationship between mitochondrial dysfunction, energy intake, and inflammation.⁴¹ Patients with PAD appear to have abnormal mitochondrial function in diseased arteries, independent of tissue perfusion.⁴² This would imply that, in PAD and other diseases of aging, a regulatory role of metabolic reprogramming in affected cells might be pivotal in determining the relationship with inflammation.⁴³

In conclusion, CCL2 is involved in the progression of PAD. Overall, our findings indicate that the availability of chemokines might represent a previously unrecognized factor in the development of chronic critical limb ischemia. To therapeutically influence Δ CCL2 to improve patient care is attractive.

Declaration of conflicting interest

The authors have nothing to disclose, and there is no conflict of interest.

Funding

This study was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (Carlos III Health Institute, Madrid, Spain) (PI08/1381, PI11/00130) and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (European Fund for Regional Development). Underlying research materials related to this manuscript are available on request from the corresponding author.

References

1. Criqui MH. Peripheral arterial disease—epidemiological aspects. *Vasc Med* 2001; 6(3 Suppl): 3–7.
2. Mehlsen J, Wiinberg N, Joergensen BS, Schultz-Larsen P. High prevalence of peripheral arterial disease in patients with previous cerebrovascular or coronary event. *Blood Press* 2010; 19: 308–312.
3. Gornik HL, Creager MA. Contemporary management of peripheral arterial disease: Cardiovascular risk-factor modification. *Cleve Clin J Med* 2006; 73(Suppl 4): S30–37.
4. Hirsch AT, Criqui MH, Treat-Jacobson D, et al. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA* 2001; 286: 1317–1324.
5. Criqui MH, Langer RD, Fronek A, et al. Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease. *N Engl J Med* 1992; 326: 381–386.
6. Murabito JM, Keyes MJ, Guo CY, et al. Cross-sectional relations of multiple inflammatory biomarkers to peripheral arterial disease: The Framingham Offspring Study. *Atherosclerosis* 2009; 203: 509–514.

7. Rull A, García R, Fernández-Sender L, et al. The role of combined assessment of defense against oxidative stress and inflammation in the evaluation of peripheral arterial disease. *Curr Mol Med* 2011; 11: 453–464.
8. Cooke JP, Wilson AM. Biomarkers of peripheral arterial disease. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55: 2017–2023.
9. Tous M, Ferré N, Rull A, et al. Dietary cholesterol and differential monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in aorta and liver of apo E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340: 1078–1084.
10. Marsillach J, Camps J, Ferré N, et al. Paraoxonase-1 is related to inflammation, fibrosis and PPAR delta in experimental liver disease. *BMC Gastroenterol* 2009; 9: 3.
11. McDermott MM, Lloyd-Jones DM. The role of biomarkers and genetics in peripheral arterial disease. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 1228–1237.
12. Brevetti G, Giugliano G, Brevetti L, Hiatt WR. Inflammation in peripheral artery disease. *Circulation* 2010; 122: 1862–1875.
13. Rodríguez-Sanabria F, Rull A, Beltrán-Debón R, et al. Tissue distribution and expression of paraoxonases and chemokines in mouse: the ubiquitous and joint localisation suggest a systemic and coordinated role. *J Mol Histol* 2010; 41: 379–386.
14. Rull A, Camps J, Alonso-Villaverde C, Joven J. Insulin resistance, inflammation, and obesity: role of monocyte chemoattractant protein-1 (or CCL2) in the regulation of metabolism. *Mediators Inflamm* 2010; 2010, pii: 326580.
15. Satiroglu O, Uydu HA, Demir A, Bostan M, Atak M, Bozkurt E. Association between plasma monocyte chemoattractant protein-1 levels and the extent of atherosclerotic peripheral artery disease. *Tohoku J Exp Med* 2011; 224: 301–306.
16. Coll B, Alonso-Villaverde C, Joven J. Monocyte chemoattractant protein-1 and atherosclerosis: Is there room for an additional biomarker? *Clin Chim Acta* 2007; 383: 21–29.
17. Schnabel RB, Baumert J, Barbalić M, et al. Duffy antigen receptor for chemokines (Darc) polymorphism regulates circulating concentrations of monocyte chemoattractant protein-1 and other inflammatory mediators. *Blood* 2010; 115: 5289–5299.
18. Aragonés G, Ercilla A, Barreda M, et al. Human Duffy blood group alloantigen system influences the measurement of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in serum but not in plasma. *Clin Lab* 2012; 58: 185–188.
19. Alonso-Villaverde C, Coll B, Parra S, et al. Atherosclerosis in patients infected with HIV is influenced by a mutant monocyte chemoattractant protein-1 allele. *Circulation* 2004; 110: 2204–2209.
20. Graham GJ, Locati M, Mantovani A, Rot A, Thelen M. The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors. *Immunol Lett* 2012; 145: 30–38.
21. Naitza S, Porcu E, Steri M, et al. A genome-wide association scan on the levels of markers of inflammation in Sardinians reveals associations that underpin its complex regulation. *PLoS Genet* 2012; 8: e1002480.
22. Mills JL, Conte MS, Armstrong DG, et al. The Society for Vascular Surgery Lower Extremity Threatened Limb Classification System: risk stratification based on wound, ischemia, and foot infection (WIFI). *J Vasc Surg* 2014; 59: 220–234.
23. Stergiou GS, Karpettas N, Atkins N, O'Brien E. European Society of Hypertension International Protocol for the validation of blood pressure monitors: a critical review of its application and rationale for revision. *Blood Press Monit* 2010; 15: 39–48.
24. Bakker K, Schaper NC; International Working Group on Diabetic Foot Editorial Board. The development of global

- consensus guidelines on the management and prevention of the diabetic foot 2011. *Diabetes Metab Res Rev* 2012; 28(Suppl 1): 116–118.
25. Skilton MR, Moulin P, Sérusclat A, Nony P, Bonnet F. A comparison of the NCEP-ATPIII, IDF and AHA/NHLBI metabolic syndrome definitions with relation to early carotid atherosclerosis in subjects with hypercholesterolemia or at risk of CVD: evidence for sex-specific differences. *Atherosclerosis* 2007; 190: 416–422.
 26. Virgos C, Martorell L, Valero J, et al. Association study of schizophrenia with polymorphisms at six candidate genes. *Schizophr Res* 2001; 49: 65–71.
 27. Simó JM, Castellano I, Ferré N, Joven J, Camps J. Evaluation of a homogeneous assay for high-density lipoprotein cholesterol: limitations in patients with cardiovascular, renal, and hepatic disorders. *Clin Chem* 1998; 44: 1233–1241.
 28. Matas C, Cabré M, La Ville A, et al. Limitations of the Friedewald formula for estimating low-density lipoprotein cholesterol in alcoholics with liver disease. *Clin Chem* 1994; 40: 404–406.
 29. Marsillach J, Mackness B, Mackness M, et al. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 146–157.
 30. Li Y, Wang N, Carroll RJ. Selecting the number of principal components in functional data. *J Am Stat Assoc* 2013; 108.
 31. Slovut DP, Sullivan TM. Critical limb ischemia: medical and surgical management. *Vasc Med* 2008; 13: 281–291.
 32. Reckless J, Rubin EM, Verstuyft JB, Metcalfe JC, Grainger DJ. Monocyte chemoattractant protein-1 but not tumor necrosis factor-alpha is correlated with monocyte infiltration in mouse lipid lesions. *Circulation* 1999; 99: 2310–2316.
 33. Papatheodorou K, Papanas N, Papazoglou D, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 is correlated with glycemic control and peripheral arterial disease in type 2 diabetic patients with metabolic syndrome. *Angiology* 2013; 64: 223–229.
 34. Lijmer G, Hunink MG, van den Dungen JJ, Loonstra J, Smit AJ. ROC analysis of noninvasive tests for peripheral arterial disease. *Ultrasound Med Biol* 1996; 22: 391–398.
 35. Deo R, Khera A, McGuire DK, et al. Association among plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1, traditional cardiovascular risk factors, and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1812–1819.
 36. De Lemos JA, Morrow DA, Blazing MA, et al. Serial measurement of monocyte chemoattractant protein-1 after acute coronary syndromes: results from the A to Z trial. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 2117–2124.
 37. Petrková J, Szotkowska J, Hermanova Z, Lukl J, Petrek M. Monocyte chemoattractant protein-1 in patients with peripheral arterial disease. *Mediators Inflamm* 2004; 13: 39–43.
 38. Hoogeveen RC, Morrison A, Boerwinkle E, et al. Plasma MCP-1 level and risk for peripheral arterial disease and incident coronary heart disease: Atherosclerosis Risk in Communities study. *Atherosclerosis* 2005; 183: 301–307.
 39. Lee WJ, Sheu WH, Chen YT, et al. Circulating CD40 ligand is elevated only in patients with more advanced symptomatic peripheral arterial diseases. *Thromb Res* 2006; 118: 619–626.
 40. Mortier A, Van Damme J, Proost P. Overview of the mechanisms regulating chemokine activity and availability. *Immunol Lett* 2012; 145: 2–9.
 41. Rodríguez-Gallego E, Riera-Borrull M, Hernández-Aguilera A, et al. Ubiquitous transgenic overexpression of C-C chemokine ligand 2: a model to assess the combined effect of high energy intake and continuous low-grade inflammation. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 953841.
 42. Anderson JD, Epstein FH, Meyer CH, et al. Multifactorial determinants of functional capacity in peripheral arterial disease: uncoupling of calf muscle perfusion and metabolism. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 628–635.
 43. Menendez JA, Alarcón T, Joven J. Gerometabolites: The pseudohypoxic aging side of cancer oncometabolites. *Cell Cycle* 2014; 13: 1–11.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ATEROSCLEROSI I CITOCINES: INFLUÈNCIA DE CCL2 I ELS SEUS RECEPTORS

Montserrat Fibla Simó



Connecting chemokine (C-C motif) ligand 2 to coronary artery disease

Journal:	<i>European Journal of Clinical Investigation</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Hernandez-Aguilera, Anna; Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili , Unitat de Recerca Biomèdica Fibla, Montserrat; Hospital Universitari Joan XXIII, Department of Pathology Cabré, Noemí; Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Unitat de Recerca Biomèdica Luciano-Mateo, Fedra; Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Unitat de Recerca Biomèdica Camps, Jordi; Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Unitat de Recerca Biomèdica Fernández-Arroyo, Salvador; Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Unitat de Recerca Biomèdica Martin, Vicente; Hospital Universitari Joan XXIII, Department of Vascular Surgery Menendez, Javier A.; Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI), Molecular Oncology Group Sirvent, Juan J.; Hospital Universitari Joan XXIII, Department of Pathology Joven, Jorge; Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Unitat de Recerca Biomèdica
Keywords:	Atherosclerosis, ACKRs, CCR2, DARC, D6, Inflammation

Connecting chemokine (C-C motif) ligand 2 to coronary artery disease

Anna Hernández-Aguilera^{1‡}, Montserrat Fibla^{2‡}, Noemí Cabré¹, Fedra Luciano-Mateo¹, Jordi Camps¹, Salvador Fernández-Arroyo¹, Vicente Martín-Paredero³, Javier A. Menendez⁴, Juan J. Sirvent², Jorge Joven^{1*}.

¹Unitat de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain.

² Department of Pathology, Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain.

³ Department of Vascular Surgery, Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain.

⁴ Molecular Oncology Group, Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI), Girona, Spain

‡ these authors contributed equally

Word-character count: 2,638

*Correspondence: jorge.joven@urv.cat

Unitat de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain. Carrer Sant Llorenç 21, 43201, Reus, Spain.

1
2
3 **Abstract**
4

5 **Background:** Chemokine (C-C- motif) ligand 2 (CCL2) controls leukocyte
6 migration into the wall of the artery. The function of CCL2 in regulating the
7 flow of cells is mediated by signaling through functional receptors (CCR2) but
8 CCL2 is also bound to promiscuous atypical chemokine receptors (ACKRs)
9 with the ability to scavenge, or sequester, this chemokine. Our question was
10 where and to what extent CCL2 and both types of receptors are expressed in
11 human coronary arteries as a result of atherosclerosis.
12
13
14
15
16
17

18 **Materials and methods:** In a necropsy study, we compared the detection of
19 CCL2 and related receptors in occluded coronary arteries with that in
20 unaffected arteries.
21
22

23 **Results:** The immunohistochemical expression of macrophages, CCL2 and
24 the associated receptors was significantly higher in diseased arteries. The
25 highest relative increases were those of CCL2 and ACKR1. Despite some
26 similarities in the distribution of associated receptors, there were no
27 correlations with the expression of CCL2, which was the only variable with
28 predictive accuracy of atherosclerosis. CCL2 expression was marginal in
29 normal arteries and mostly restricted to smooth muscle cells. Functional
30 networks suggest that the association between the availability of CCL2 and
31 the cellular response is complex. To fully understand this relationship, we will
32 need to explore the activity and specificity of associated receptors and the
33 confluent role of other chemokines.
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 **Conclusions:** Our findings points CCL2 as a marker potentially useful in
44 atherosclerosis diagnosis and provide data indicating that conventional and
45 atypical receptors for this chemokine are overexpressed in atherosclerotic
46 arteries.
47
48
49

50
51 **Keywords:** Atherosclerosis, ACKRs, CCR2, DARC, D6, Inflammation
52
53
54
55
56
57
58
59
60

INTRODUCTION

Inflammation in atherosclerosis entails numerous signals governing the passage of cells and blood molecules into the wall of the artery [1-4]. Chemokines transform monocytes into macrophages, promote the response of immune cells and maintain the continuous release of chemokines in a self-maintaining progressive cycle –apparently mediating in all stages of atherosclerosis [4-6]. In order to interfere with this vicious cycle and improve our current risk factor modification strategy, we need to fully understand the control of chemokine function in arteries. In particular, chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) has been shown to be critical for the development of atherosclerosis and its function is mediated by receptors [5]. Our question was where and to what extent the expression of CCL2 and associated receptors may change in diseased arteries that have been responsible for the death of patients with coronary artery disease (CAD) as compared to healthy arteries. We reasoned that analyzing data in this final stage of chronic, low-grade inflammation might support emergent therapies targeting the relationship between metabolic energy and the inflammatory process, reducing the plasticity of macrophages or facilitating immunotherapy [7-10].

The binding of CCL2 to its functional receptor (CCR2) is fostering seminal research but the lack of detail regarding what CCL2 controls and which is the underlying mechanism restricts the interpretation of results [9-16]. Evidence suggest that CCL2 regulates pleiotropic signaling pathways influencing numerous cellular processes. For example, the injection of mesenchymal stem cells in mice reduces atherosclerosis development and decreases CCL2 levels [10]; CCL2 also induces migration of adventitial

1
2
3 fibroblasts and mesenchymal stem cells into the intima [13]. It is also
4
5 important to consider atypical chemokine receptors (ACKRs) because they
6
7 bind to CCL2 without eliciting a defined response but forming active
8
9 chemokine gradients [17, 18]. The best-known ACKRs are ACKR1 (Duffy
10
11 antigen receptor for chemokines; DARC) and ACKR2 (chemokine binding
12
13 protein 2; CCBP2 or D6). Both are promiscuous and can bind to a range of C-
14
15 C chemokines [19, 20]. In cells, CCL2 rapidly dissociates from ACKR2, which
16
17 is recycled back to the cell surface for further chemokine capture; ACKR1
18
19 does not mediate chemokine internalization [21, 22]. The role of ACKRs
20
21 regulating acute inflammation seems supported [23]. The role of ACKRs in
22
23 chronic, low-grade inflammatory diseases has been less studied but recent
24
25 findings indicate that the genetic deletion of *Ackr1* in *ApoE*^{-/-} mice impairs
26
27 atherosclerosis development following a marked reduction in *Ccl2* levels [24].
28
29
30
31
32

33
34 It may be argued that the expression of ACKRs and the availability of
35
36 functional CCL2 could be coordinately regulated to modulate the inflammatory
37
38 response. To study this relationship we have measured for the first time, the
39
40 expression of CCL2 and related receptors in human coronary arteries and we
41
42 found a higher expression in arteries with advanced atherosclerosis.
43
44
45
46
47

48 MATERIALS AND METHODS

49 Research design

50
51 We designed a pre-set duration, observational, cross-sectional study in
52
53 consecutive male decedents who underwent autopsy between December
54
55 2012 and November 2014 at our settings and in which CAD was firmly
56
57 established as the cause of death. The local Ethics Committee, which acts as
58
59
60

1
2
3 the Institutional Review Board, approved the study protocol and procedures
4 (EPINOLS/12-03-29/3proj6). Written informed consents were obtained from
5
6 next of kin of the deceased for autopsy and access to clinical records and
7
8 tissues. Accordingly, we excluded decedents with sudden, out of Hospital,
9
10 death. Because CCL2 has been associated with complex diseases [5], we
11
12 also excluded decedents with evidences of recent infection, diabetes, major
13
14 metabolic disturbances, liver disturbances or neoplasms. In each corpse we
15
16 obtained at least one major coronary artery narrowed >80% in cross sectional
17
18 area by atherosclerotic plaque or associated thrombus. For comparisons, we
19
20 obtained coronary arteries from 19 men dead as a result of road traffic
21
22 accidents during the same period of time. For other associations, we
23
24 arbitrarily selected specimens with mild (less than 20%), moderate (between
25
26 21% and 50%) or severe (more than 50%) narrowing. We examined a total of
27
28 123 specimens from 87 donors.
29
30
31
32
33
34
35

36 **Histological examination**

37
38 The specimens were immediately fixed in 10% neutral-buffered formalin
39
40 and embedded in paraffin. Serial sections of 4µm were placed on a 45°C
41
42 water bath to expand to its original size before staining procedures with
43
44 hematoxylin and eosin, Alizarin Red and Masson's Trichrome reagents in
45
46 order to assess the structure and extent of fibrosis in the arteries and to
47
48 visualize the localization of calcium phosphate. The intima and media
49
50 thickness (IMT) was measured in these sections.
51
52
53

54
55 Slides were loaded in an automated slide stainer Autostainer
56
57 Universal™ (Dako, Denmark) including sections (in triplicate) for
58
59 immunohistochemical analyses after standard procedures for manual de-
60

1
2
3 waxing and heat-induced epitope retrieval. We added a blocking step for 25
4
5 minutes at room temperature prior to incubation with the primary antibody.
6
7
8 Macrophages were detected by the presence of the CD68 antigen with
9
10 reagents provided by Dako. Primary antibodies, validated by the suppliers,
11
12 against CCL2 (ab9669), CCR2 (ab21667) and ACKR2 (ab1658) were
13
14 obtained from Abcam (Cambridge, UK) and used at dilutions of 1:200, 1:100,
15
16 and 1:500 respectively. ACKR1 (PAB13254) antibody was from Abnova
17
18 (Taipei, Taiwan) and used at a dilution of 1:200. Biotinylated secondary
19
20 antibodies (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA) were used at a dilution
21
22 of 1:200. Detection was performed with the ABC peroxidase system (Vector)
23
24 and DAB peroxidase substrate (Dako). The slides were counterstained with
25
26 Mayer's hematoxylin. The choice of CCL2 and CCR2 antibodies was based
27
28 on previous results [25]. The ACKR1 and ACKR2 antibodies required further
29
30 comparison with other available antibodies (HPA013819 and HPA016421,
31
32 from Sigma; PA1-21614, from Affinity Bioreagents; and NB100-2421 from
33
34 Novus Biologicals). We then compared the pattern of immunostaining
35
36 previously described for breast cancer tissue as described [26] and we found
37
38 no significant differences among antibodies. Accordingly, selected sections
39
40 from breast tissue were used as positive controls (Figure S1). Sections from
41
42 specimens not expressing ACKR1 or ACKR2 were used as negative tissue
43
44 control to confirm the absence of background staining. Similarly, we used
45
46 negative controls from study samples by omitting the primary antibodies from
47
48 the incubations. The evaluation of staining with arbitrary scores based on
49
50 proportion of stained cells and intensity correlated with automated calculations
51
52 of stained area using the image analysis system (AnalySIS™, AnalySIS,
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Munster, Germany) and we used these values for analysis as described [27].

4
5 Since diseased arteries were greater than the histological field used for
6
7 analyses, several pictures were combined to calculate the percentage of
8
9 stained area with respect to the total area of the artery. Pictures include a size
10
11 bar for assessment of magnification.
12
13

14 15 **Statistical analyses**

16
17 Inter-observer agreement was assessed and discrepancies (<5%) were
18
19 resolved. The Student's t-test or Mann-Whitney's test were used to assess the
20
21 difference between groups according to the distribution of variables and the
22
23 chi-squared test to compare categorical variables. Spearman correlation
24
25 coefficients were used to evaluate the degree of association between
26
27 variables. To correct for multiple testing we used the False Discovery Rate
28
29 estimated using the Q-value. The true and false positive rates at various
30
31 threshold settings were used to plot receiver operating characteristic (ROC)
32
33 curves to assess variables as predictors. The Statistical Package for the
34
35 Social Sciences, version 19.0 (SPSS Inc, IBM Corp, Chicago, IL, USA) and
36
37 MetaboAnalyst 3.0[®], were used for analyses. STRING (Search Tool for the
38
39 Retrieval of Interacting Genes/Proteins) was used as a biological database
40
41 and web resource of known and predicted protein-protein interactions
42
43 (<http://string-db.org>).
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 **RESULTS**

54
55 In CAD patients, compared to controls, hypertension was more prevalent
56
57 and the incidence of affected valves, age, serum triglyceride concentration,
58
59 heart weight and ventricular thickness were significantly increased (Table 1).
60

1
2
3 The proportion of daily smokers was similar to that found in controls and there
4
5 were no differences in body mass index relating weight to height – in mean
6
7 (SD) kg/m², 25.7 (4.1) for controls and 24.8 (4.0) for CAD patients. The
8
9 modified tissue architecture of diseased arteries and the significantly higher
10
11 (p<0.001) IMT values, in median (IQR), of diseased arteries [586 µm (452.7-
12
13 865.1)] as compared with controls [379 µm (265.8-467.8)] were confirmed by
14
15 histologic examination. Macrophages (CD68 staining) were scarcely observed
16
17 in most normal or minimally affected arteries but there were frequent in the
18
19 newly formed intima and adventitia of affected arteries (Figures 1 and 2).
20
21
22
23
24

25 The immunohistochemical expression of the assayed proteins was
26
27 significantly higher in diseased arteries than in controls. Quantitative
28
29 measurements are summarized in Table 1 and illustrated in Figures 2, S2 and
30
31 S3. The highest relative increases were those of CCL2 and ACKR1 (i.e., both
32
33 were equally responsive to induction). CCL2 expression was marginally
34
35 evident (26%) in normal arteries and mostly restricted to smooth muscle cells.
36
37 In affected arteries, CCL2 expression was increased in all layers and all
38
39 specimens, especially in macrophages and adventitial tissue, but remained
40
41 more evident in the tunica media; the staining of endothelial cells was faint.
42
43 Contrarily, CCR2 was expressed in all healthy and affected specimens. In
44
45 controls, CCR2 was predominant in smooth muscle cells but widely
46
47 distributed in all layers. In affected arteries, the relative expression was higher
48
49 and included both endothelial cells and macrophages but the difference was
50
51 only significant in the adventitial tissue indicating a likely higher response in
52
53 this tunica. The expression of CCR2 was observed in more cells and with
54
55 higher intensity but the distribution of both CCL2 and CCR2 was qualitatively
56
57
58
59
60

1
2
3 similar in smooth muscle cells. The expression of ACKR1 was not detected in
4
5 all specimens (63% in controls and 81% in affected arteries). It was also
6
7 relatively weak in control arteries and more evident in smooth muscle cells. Of
8
9 note, the expression was increased over 10-fold in those affected arteries that
10
11 were positively stained. Similar to CCL2, there was a significant increase in
12
13 the proportion of stained cells in all layers. Conversely, the expression of
14
15 ACKR2 was more intense and widely distributed than that of ACKR1. The
16
17 quantitative expression of ACKR2 was similar to that observed for CCR2 but
18
19 undetectable in 16% of control arteries. It was detected in endothelial cells,
20
21 smooth muscle cells and more importantly in the adventitia and cells
22
23 surrounding adipocytes. In affected arteries, ACKR2 was present in all
24
25 specimens but the expression was quantitatively not different in the intima and
26
27 the media with respect to controls. Interestingly, however, the increased
28
29 expression in adventitia was statistically significant.
30
31
32
33
34
35

36 We also explored whether the expression of CCL2 and the associated
37
38 receptors could represent a potential marker of both the presence and
39
40 severity of atherosclerosis. We found no dependence between measured
41
42 variables using a Spearman-based correlation matrix and the model of
43
44 predictions was constructed using Random Forest – a non-parametric and
45
46 bias-free method– that pointed CCL2 as the most important variable to
47
48 indicate atherosclerosis (Figure 3). This finding was further confirmed via
49
50 ROC curves using the combined variables (Figure 4). Collectively, the data
51
52 suggest that the increased expression of CCL2 is likely the initial event and
53
54 that the predictive value of CCL2 expression is not strictly associated with
55
56 occlusion of the arteries. Values for the expression of the associated
57
58
59
60

1
2
3 receptors showed no predictive value but CCR2 expression discriminated
4
5
6 CAD samples from controls (Figure 4).

7
8 We next explored the predicted protein-protein interactions and we found
9
10 no evidence of associations between ACKR1 and ACKR2. Therefore, the
11
12 interactions between each receptor and CCL2 were examined separately
13
14 (Figure S4). The functional networks were similar for each receptor. Predicted
15
16 partners were derived from analyzing information of sequenced genes and
17
18 included additional chemokine receptors and ligands, suggesting a high level
19
20 of complexity in interpreting data. There was no evidence in database of co-
21
22 expression among these proteins in humans but the evidence for co-
23
24 expression in other species, although weak, combined with our results,
25
26 suggest that this possibility cannot be discarded.
27
28
29
30
31
32
33

34 DISCUSSION

35
36 The expression of CCL2 and associated receptors is increased in
37
38 arteries with atherosclerosis. Our study uncovers complexities in the
39
40 interpretation of chemokine function but favor CCL2 as a potentially useful
41
42 marker in atherosclerosis diagnosis. We also provide prospects for further
43
44 studies to clarify the causal roles of CCL2 signaling and upstream
45
46 inflammation in atherosclerosis and to promote CCL2 as an attractive target
47
48 since it exerts effects via cell surface receptors that are readily druggable.
49
50
51

52
53 The notion that CCL2 may represent an important cardiovascular risk
54
55 factor is mostly based on its inflammatory function as chemo-attractant but the
56
57 complexity of CCL2 biology suggests additional roles [5, 6, 21, 26, 28].
58
59
60 However, there are possible intricacies in the interpretation of data concerning

1
2
3 the value of plasma CCL2 for risk stratification after acute coronary
4
5 syndromes and to predict the risk of atherosclerosis [28-30]. The CCL2-CCR2
6
7 pairing appears to be the prevalent interaction but confirmation is challenging
8
9 because CCL2 and CCR2 bind other receptors and ligands respectively,
10
11 suggesting redundant effects [12]. Here we establish that a wide range of
12
13 cells in the artery wall including endothelial and smooth muscle cells
14
15 expresses CCL2 and CCR2. The expression is apparently constitutive and
16
17 induced, although such induction is limited to adventitial tissue in the case of
18
19 CCR2. Of note, we only detect CCR2B – one of the two isoforms of CCR2
20
21 due to alternative splicing. This is the predominant form (>90%) but it might
22
23 represent a limitation. The expression of ACKR2 is also mainly constitutive
24
25 and induction is weak and limited to the adventitia. Contrarily, the induction in
26
27 the expression of ACKR1 is quantitatively significant in a wide range of cells.
28
29 The expression of ACKRs in the vessel wall with the ability to scavenge, or
30
31 sequester, CCL2 is important because their different expression profiles in
32
33 particular cell types and layers of the artery wall complicate the availability of
34
35 circulating CCL2 for other cellular response [12, 31]. Interestingly, genome-
36
37 wide association studies (www.genome.gov/gwastudies) have identified
38
39 variants at loci 1q23.2 (rs 12075) of ACKR1 gene and 3p22.1 (rs 2228467) of
40
41 ACKR2 gene associated with circulating CCL2 levels suggesting a possible
42
43 connection between CCL2 and disease. It is possible that these variants alter
44
45 the binding of CCL2 to these receptors but our results suggest that altered
46
47 receptor expression is probably a more important factor than altered binding
48
49 properties. Moreover, the imprecision of the CCL2 assay and differences in
50
51 blood sample processing also contribute [12, 30].
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Although the inherent limitations prevent potential speculations and some drugs targeting CCL2 or CCL2-associated receptors have reached the phase of clinical trials with contradictory success [32], our results support the key role of CCL2 in the pathogenesis of CAD. For example, a clinicopathologic correlation found at necropsy with those reported earlier – or elsewhere – is probably meaningless [33] but this selected sample shows associations between inflammation, vascular calcification and remodeling in atherosclerosis [34]. Specifically, CCL2 expression, despite the lack of correlation with the expression of associated receptors, was the only value with sufficient predictive accuracy of atherosclerosis and apparently independent of the degree of occlusion. The association between CCL2 and macrophages also support our previous findings indicating that the CCL2-CCR2 axis regulates macrophage polarization by upregulating the additional production of CCL2 [35] and the high and combined expression of CCL2 and CCR2 in the media, associated with calcium deposits, may also suggest that their binding may contribute to modifications in smooth muscle cells [36]. Finally, the increased expression of ACKR1 and ACKR2 in affected coronary arteries should not be considered coincidental but strongly suggestive of the perceived function of ACKRs in the regulation of inflammation. Namely, the higher complexity derived from considering simultaneously the formation of passive CCL2 gradients and active CCL2 gradients formed by ACKRs that scavenge chemokines locally [37-40]. The measurement of expression, however, does not provide insight into receptor specificity or activity. Human studies directed to understand mechanisms regulating chemokine activity and availability and to assess efficacious drugs would require novel assays to

1
2
3 measure *in vivo* the functional properties of CCL2 and its associations with
4
5
6 cellular receptors.

7
8 We conclude that our data reinforce a model in which the continuous
9
10 production of CCL2 in chronic inflammation activates promiscuous
11
12 mechanisms with a potential predictive value of atherosclerosis. To fully
13
14 understand the pathogenesis of CAD, further studies should consider how
15
16 and to what extent the binding of CCL2 to associated receptors transduce
17
18 signals, and/or mediate scavenging.
19
20
21
22
23

24 **Acknowledgements**

25
26 Supported by grants from the Plan Nacional de Investigación Científica,
27
28 Desarrollo e Innovación Tecnológica, Carlos III Health Institute, Madrid, Spain
29
30 and the European Fund for Regional Development (FEDER), No. PI11/00130
31
32 and PI15/00285.
33
34
35

36 **Authors' contribution**

37
38 J. Joven, V. Martín-Paredero and J.J. Sirvent designed the study. M. Fibla
39
40 supervised the collection of data. J. Camps and J.A. Menendez contributed
41
42 important reagents and valuable insights. A. Hernández-Aguilera, F. Luciano-
43
44 Mateo, N. Cabré and S. Fernández-Arroyo were active in laboratory tasks. A.
45
46 Hernández-Aguilera, M. Fibla and J. Joven supervised the statistical analyses
47
48 and interpreted the results. J. Joven wrote the manuscript, which was
49
50 discussed, modified and finally approved by all co-authors.
51
52

53 **Conflict of interest**

54
55 The authors declare that there are no conflicts of interest associated with this
56
57 manuscript.
58
59
60

- 1
2
3 10 Frodermann V, van Duijn J, van Pel M, van Santbrink PJ, Bot I, Kuiper J,
4
5 *et al.* Mesenchymal Stem Cells Reduce Murine Atherosclerosis Development.
6
7
8 *Sci Rep* 2015;**5**:15559.
9
10 11 Kim SM, Kim BY, Son Y, Jung YS, Eo SK, Park YC, *et al.* 7 α -
11
12 Hydroxycholesterol induces inflammation by enhancing production of
13
14 chemokine (C-C motif) ligand 2. *Biochem Biophys Res Commun*
15
16 2015;**467**:879-84.
17
18 12 Schnabel RB, Baumert J, Barbalic M, Dupuis J, Ellinor PT, Durda P, *et al.*
19
20 Duffy antigen receptor for chemokines (Darc) polymorphism regulates
21
22 circulating concentrations of monocyte chemoattractant protein-1 and other
23
24 inflammatory mediators. *Blood* 2010;**115**:5289-5299.
25
26 13 Manka D, Chatterjee TK, Stoll LL, Basford JE, Konaniah ES, Srinivasan R,
27
28 *et al.* Transplanted perivascular adipose tissue accelerates injury-induced
29
30 neointimal hyperplasia: role of monocyte chemoattractant protein-1.
31
32 *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;**34**:1723–1730.
33
34 14 Alegret JM, Aragonès G, Elosua R, Beltrán-Debón R, Hernández-Aguilera
35
36 A, Romero-Menor C, *et al.* The relevance of the association between
37
38 inflammation and atrial fibrillation. *Eur J Clin Invest* 2013;**43**:324-31.
39
40 15 Auvynet C, Baudesson de Chanville C, Hermand P, Dorgham K, Piesse C,
41
42 Pouchy C, *et al.* ECL1i, d(LGTFLKC), a novel, small peptide that specifically
43
44 inhibits CCL2-dependent migration. *FASEB J.* 2016 Mar 15. pii: fj.201500116.
45
46 16 Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine
47
48 receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006;**354**:610-621.
49
50 17 Tabata T, Mine S, Kawahara C, Okada Y, Tanaka Y. Monocyte
51
52 chemoattractant protein-1 induces scavenger receptor expression and
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 monocyte differentiation into foam cells. *Biochem Biophys Res Commun*
4
5 2003;**305**:380-385.

6
7
8 18 Ford LB, Cerovic V, Milling SW, Graham GJ, Hansell CA, Nibbs RJ.
9
10 Characterization of conventional and atypical receptors for the chemokine
11
12 CCL2 on mouse leukocytes. *J Immunol* 2014;**193**:400-411.

13
14
15 19 Tomasdottir V, Vikingsson A, Hardardottir I, Freysdottir J. Murine antigen-
16
17 induced inflammation –a model for studying induction, resolution and the
18
19 adaptive phase of inflammation. *J Immunol Methods* 2014;**415**:36-45.

20
21
22 20 Hansell CA, Hurson CE, Nibbs RJ. DARC and D6: silent partners in
23
24 chemokine regulation? *Immunol Cell Biol* 2011;**89**:197-206.

25
26
27 21 Novitzky-Basso I, Rot A. Duffy antigen receptor for chemokines and its
28
29 involvement in patterning and control of inflammatory chemokines, *Front*
30
31 *Immunol* 2012;**3**:266.

32
33
34 22 Locati M, Torre YM, Galliera E, Bonecchi R, Bodduluri H, Vago G, *et al.*
35
36 Silent chemoattractant receptors: D6 as a decoy and scavenger receptor for
37
38 inflammatory CC chemokines. *Cytokine Growth Factors Rev* 2005;**16**:679-
39
40 686.

41
42
43 23 Nibbs RJ, Graham GJ. Immune regulation by atypical chemokine
44
45 receptors. *Nat Rev Immunol* 2013;**13**:815-829.

46
47
48 24 Wan W, Liu Q, Lionakis MS, Marino AP, Anderson SA, Swamydas M, *et al.*
49
50 Atypical chemokine receptor 1 deficiency reduces atherogenesis in ApoE-
51
52 knockout mice. *Cardiovasc Res* 2015;**106**(3):478-487

53
54
55 25 Hernández-Aguilera A, Sepúlveda J, Rodríguez-Gallego E, Guirro M,
56
57 García-Heredia A, Cabré N, *et al.* Immunohistochemical analysis of
58
59
60

1
2
3 paraoxonases and chemokines in arteries of patients with peripheral artery
4 disease. *Int J Mol Sci* 2015;**16**:11323-11338.

5
6
7
8 26 Yu KD, Wang X, Yang C, Zeng XH and Shao ZM. Host genotype and
9 tumor phenotype of chemokine decoy receptors integrally affect breast cancer
10 relapse. *Oncotarget* 2015; **6**(28): 26519-26527.

11
12
13 27 Aukrust P, Halvorsen B, Yndestad A, Ueland T, Oie E, Otterdal K, *et al.*
14 Chemokines and cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*
15 2008;**28**:1909-1919.

16
17
18 28 de Lemos JA, Morrow DA, Blazing MA, Jarolim P, Wiviott SD, Sabatine
19 MS, *et al.* Serial measurement of monocyte chemoattractant protein-1 after
20 acute coronary syndromes: results from the A to Z trial. *J Am Col Cardiol*
21 2007;**50**:2117-2124.

22
23
24 29 van Wijk DF, van Leuven SI, Sandhu MS, Tanck MW, Hutten BA,
25 Wareham NJ, *et al.* Chemokine ligand 2 genetic variants, serum monocyte
26 chemoattractant protein-1 levels, and the risk of coronary artery disease.
27 *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;**30**:1460-1466.

28
29
30 30 Rull A, Hernández-Aguilera A, Fibla M, Sepúlveda J, Rodríguez-Gallego E,
31 Riera-Borrull M, *et al.* Understanding the role of circulating chemokine (C-C
32 motif) ligand 2 in patients with chronic ischemia threatening the lower
33 extremities. *Vasc Med* 2014;**19**:442-451.

34
35
36 31 Zweemer AJM, Toraskar J, Heitman LH and Ijzerman AP. Bias in
37 chemokine receptor signaling. *Trends Immunol* 2014;**35**:243–252.

38
39
40 32 Schall TJ, Proudfoot EI. Overcoming hurdles in developing successful
41 drugs targeting chemokine receptors. *Nat. Rev. Immunol* 2011;**11**:355–363.

42
43
44 33 Roberts WC, Potkin BN, Solus DE and Reddy SG. Mode of death,
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 frequency of healed and acute myocardial infarction, number of major
4
5 epicardial coronary arteries severely narrowed by atherosclerotic plaque, and
6
7 heart weight in fatal atherosclerotic coronary artery disease: analysis of 889
8
9 patients studied at necropsy. *J Am Col Cardiol* 1990;**15**:196-203.

10
11
12 34 Bessueille L, Magne D. Inflammation: a culprit for vascular calcification in
13
14 atherosclerosis and diabetes. *Cell Mol Life Sci* 2015;**72**:2475–2489.

15
16
17 35 Sierra-Filardi E, Nieto C, Domínguez-Soto A, Barroso R, Sánchez-Mateos
18
19 P, Puig-Kroger A, *et al.* CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF
20
21 and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile.
22
23
24
25 *J Immunol* 2014;**192**:3858-3867.

26
27 36 Lin HL, Ueng KC, Hsieh YS, Chiang WL, Yang SF, Chu SC. Impact of
28
29 MCP-1 and CCR-2 gene polymorphisms on coronary artery disease
30
31 susceptibility. *Mol Biol Rep* 2012;**39**:9023-9030.

32
33
34 37 Fra AM, Locati M, Otero K, Sironi M, Signorelli P, Massardi ML, *et al.*
35
36 Cutting edge: scavenging of inflammatory CC chemokines by the
37
38 promiscuous putatively silent chemokine receptor D6. *J Immunol*
39
40
41 2003;**170**:2279-2282.

42
43 38 Fukuma N, Akimitsu N, Hamamoto H, Kusuhara H, Sugiyama Y, Sekimizu
44
45 K. A role of the Duffy antigen for the maintenance of plasma chemokine
46
47 concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;**303**:137-139.

48
49
50 39 Cancellieri C, Caronni N, Vacchini A, Savino B, Borroni EM, Locati M, *et al.*
51
52 Structure-function and biological properties of the atypical chemokine receptor
53
54 D6. *Mol Immunol* 2013;**55**:87-93.

55
56
57 40 Dona E, Barry JD, Valentin G, Quirin C, Khmelinskii A, Kunze A, *et al.*
58
59 Directional tissue migration through a self-generated chemokine gradient.
60

1
2
3 **Figure 1. Representative microphotographs of histologic changes in coronary**
4 **arteries.** Lesions, especially the thickness of media and intima, were evident with
5 hematoxylin and eosin staining (A). Alizarin Red Staining was used to assess
6 calcium deposits (B) and Masson's trichrome staining was mostly used to assess
7 variations in the overall structure and remodelling (L is Lumen, I is Intima, M is Media
8 and A is Adventitia).
9

10
11 **Figure 2. Representative microphotographs of immunohistochemical staining**
12 **in coronary arteries.** The expression in non-affected arteries and in those from
13 atherosclerotic arteries of CCL2, CD68-stained cells (macrophages), and functional
14 and putatively silent receptors for CCL2 displayed significant differences (see Table 1
15 for quantitative analysis). Although there was not a quantitative correlation, CCL2
16 and CCR2 expressions were apparent in the same layers of the artery wall.
17 Conversely, the expression of ACKR1 (DARC) and ACKR2 (D6) differed in intensity
18 and distribution (L is Lumen, I is Intima, M is Media and A is Adventitia).
19

20
21 **Figure 3. Correlation among histologic variables and random forests**
22 **classification.** Correlation matrix (A) was used to investigate the dependence
23 between multiple variables at the same time and we found no significant association.
24 In particular, the correlation between CCL2 and CCR2 was not statistically significant
25 and only CCL2 expression could be considered a good predictor of atherosclerosis
26 (B). We used Random forests to rank the importance of variables in a likely
27 classification of predictors and CCL2 was significantly different (C).
28

29
30 **Figure 4. A classification model of histologic variables to predict**
31 **atherosclerosis.** Receiving operating characteristic curves were plotted using true
32 and false positive results. Most values were relatively good predictors of coronary
33 artery disease (CCL2, CD68 and atypical receptors) but CCL2 was the most
34 significant according to the area under the curve and specificity (A). Only the
35 predictive value of CCL2 remained significant to distinguish between mild, moderate
36 and severe occlusion (B).
37

38 **Figure S1. Proteins in human breast carcinoma.** Sections of breast tissue
39 expressing all the antigens were used as positive controls and treated exactly as
40 study samples. We also selected specimens of breast tissue without ACKR1 or
41 ACKR2 expression as a source of negative tissue controls to confirm the absence of
42 background staining.
43

44 **Figure S2. Representative microphotographs of the expression of CCL2, CCR2,**
45 **ACKR1 and ACKR2 in control coronary arteries.** Images with higher
46 magnifications are segregated by layer (rows) to identify the cells in which each
47 histological staining (columns) is predominant. The design was directed to describe
48 findings summarized in Table 1.
49

50
51 **Figure S3. Representative microphotographs of the expression of CCL2, CCR2,**
52 **ACKR1 and ACKR2 in atherosclerotic coronary arteries.** Images with higher
53 magnifications are segregated by layer (rows) to identify the cells in which each
54 histological staining (columns) is predominant. The design was directed to describe
55 findings summarized in Table 1.
56

57
58 **Figure S4. Functional interaction networks.** These networks were generated using
59 CCL2 and ACKR1 (A) or CCL2 and ACKR2 (B) as the respective inputs for
60 information on *Homo sapiens*. There was no information on possible interactions
between ACKR1 and ACKR2. The following predicted functional partners had a
probabilistically confidence score > 0.98 (i.e., a significant association with the

1
2
3 classification of the KEEG database: CCR2, chemokine (C-C motif) receptor 2;
4 CCR5, chemokine (C-C motif) receptor 5; CCL5, chemokine (C-C motif) ligand 5;
5 JUN, jun proto-oncogene; CCL25, chemokine (C-C motif) ligand 25; FOS, FBJ
6 murine osteosarcoma viral oncogene homolog; CCR1, chemokine (C-C motif)
7 receptor 1; CCL7, chemokine (C-C motif) ligand 7; CCL19, chemokine (C-C motif)
8 ligand 19; CCL21, chemokine (C-C motif) ligand 21; IL8, interleukin 8; CCRL1,
9 chemokine (C-C motif) receptor-like 1; CCL8, chemokine (C-C motif) ligand 8.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Review Only

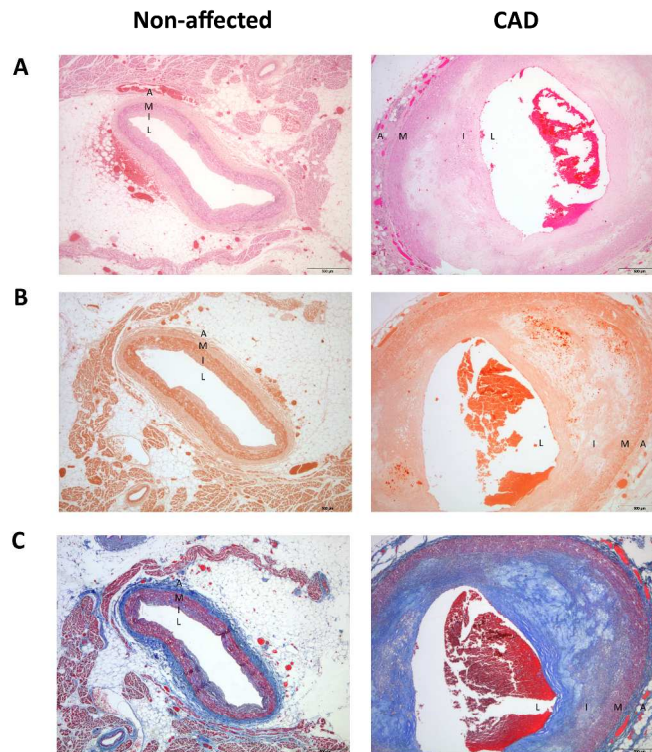


Figure 1. Representative microphotographs of histologic changes in coronary arteries. Lesions, especially the thickness of media and intima, were evident with hematoxylin and eosin staining (A). Alizarin Red Staining was used to assess calcium deposits (B) and Masson's trichrome staining was mostly used to assess variations in the overall structure and remodelling (L is Lumen, I is Intima, M is Media and A is Adventitia). 409x397mm (300 x 300 DPI)

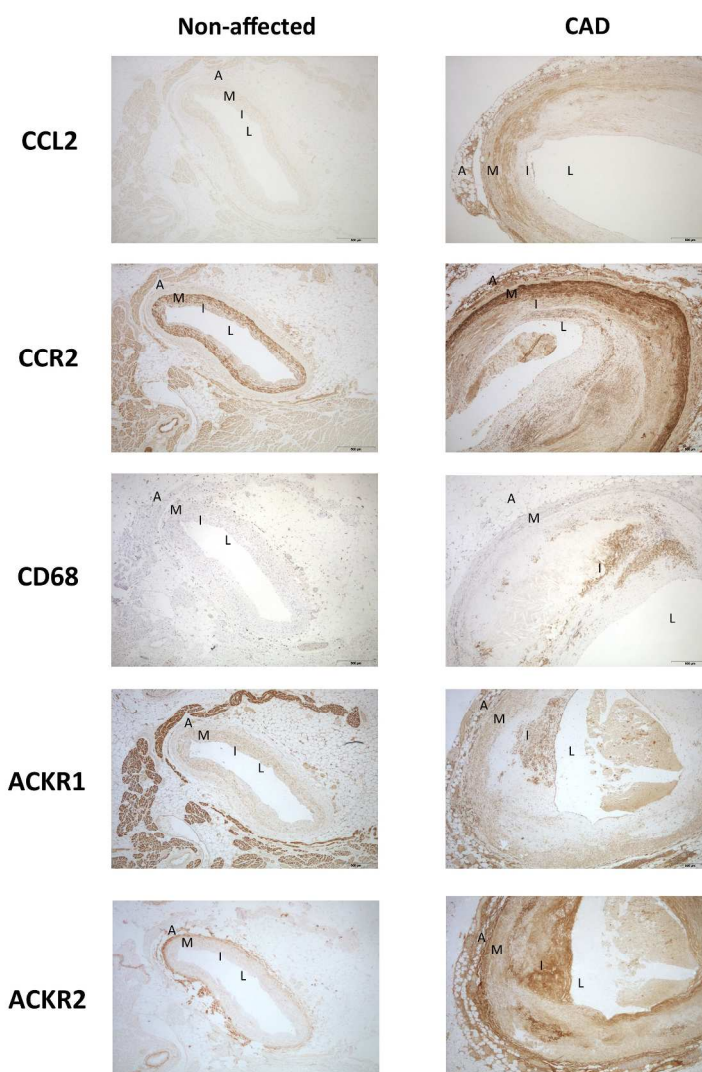


Figure 2. Representative microphotographs of immunohistochemical staining in coronary arteries. The expression in non-affected arteries and in those from atherosclerotic arteries of CCL2, CD68-stained cells (macrophages), and functional and putatively silent receptors for CCL2 displayed significant differences (see Table 1 for quantitative analysis). Although there was not a quantitative correlation, CCL2 and CCR2 expressions were apparent in the same layers of the artery wall. Conversely, the expression of ACKR1 (DARC) and ACKR2 (D6) differed in intensity and distribution (L is Lumen, I is Intima, M is Media and A is Adventitia).

209x297mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

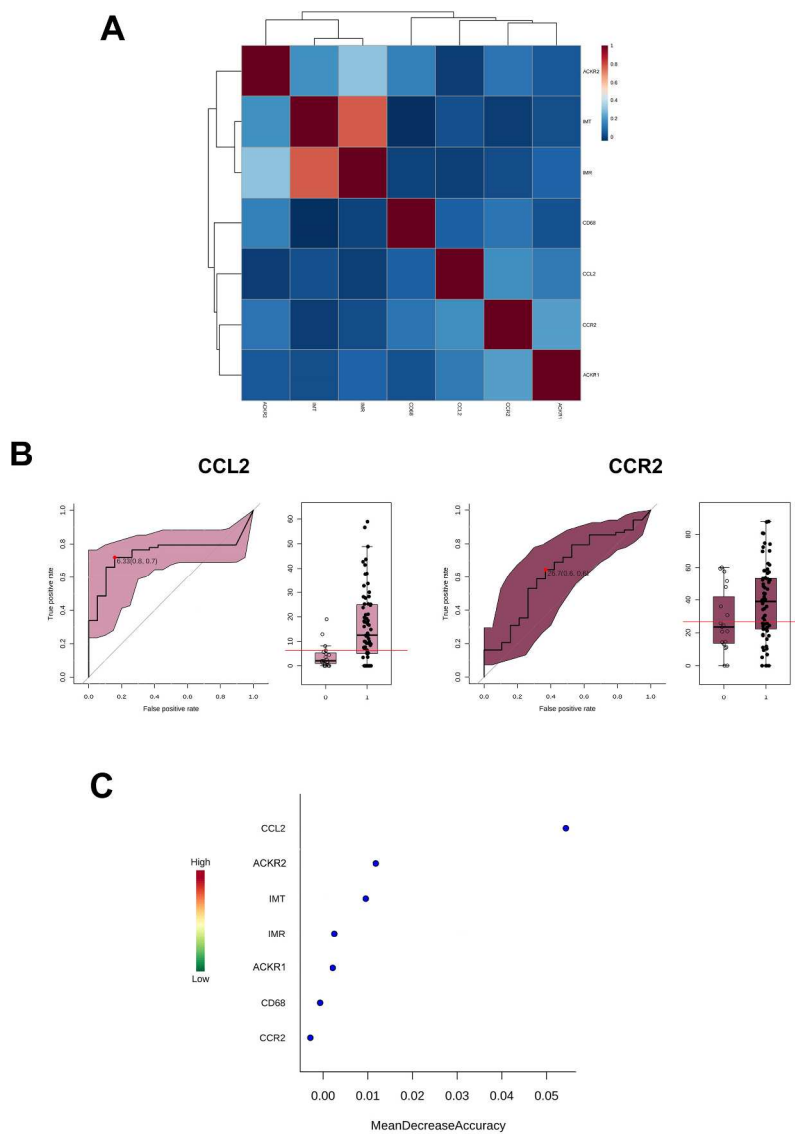
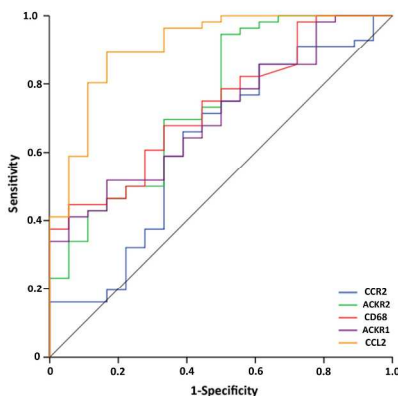


Figure 3. Correlation among histologic variables and random forest classification. Correlation matrix (A) was used to investigate the dependence between multiple variables at the same time and we found no significant association. In particular, the correlation between CCL2 and CCR2 was not statistically significant and only CCL2 expression could be considered a good predictor of atherosclerosis (B). We used Random forests to rank the importance of variables in a likely classification of predictors and CCL2 was significantly different (C).

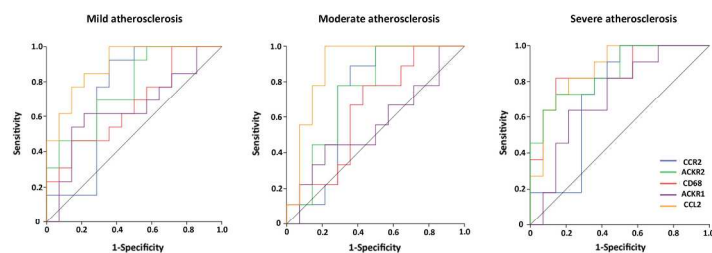
209x297mm (300 x 300 DPI)

A



Variable	Area	Error	P-value	95% CI		Sensitivity (%)	Specificity (%)
				Lower	Upper		
CCR2	0.624	0.079	0.115	0.469	0.779	80.0	38.9
ACKR2	0.749	0.069	0.002	0.614	0.884	80.0	50.0
CD68	0.734	0.063	0.003	0.611	0.857	80.0	44.4
ACKR1	0.707	0.064	0.008	0.581	0.834	80.0	38.9
CCL2	0.911	0.041	<0.001	0.831	0.991	80.0	89.0

B



CCL2	Area	Error	P-value	95% CI		Sensitivity (%)	Specificity (%)
				Lower	Upper		
Mild atherosclerosis	0.896	0.039	<0.001	0.780	1.000	80.0	78.6
Control vs Moderate atherosclerosis	0.889	0.072	0.002	0.748	1.000	80.0	78.6
Moderate vs Severe atherosclerosis	0.870	0.071	0.002	0.731	1.000	80.0	78.6

Figure 4. A classification model of histologic variables to predict atherosclerosis. Receiving operating characteristic curves were plotted using true and false positive results. Most values were relatively good predictors of coronary artery disease (CCL2, CD68 and atypical receptors) but CCL2 was the most significant according to the area under the curve and specificity (A). Only the predictive value of CCL2 remained significant to distinguish between mild, moderate and severe occlusion (B).
 209x297mm (300 x 300 DPI)

Table 1: Main clinical, biochemical and immunohistochemical variables.

	Control group (N=19)	CAD group (N=68)	P-value
Clinical characteristics			
Age, years	45 (33-69)	71 (61-77)	0.001
No smokers, n (%)	15 (78.4)	42 (61.8)	0.164
Heart weight (g)	380 (300-450)	480 (400-600)	0.002
Ventricular thickness (mm)	16 (14-18)	19 (15-20)	0.005
Fibrosis, n (%)	0	10 (15.9)	0.110
Affected valves, n (%)	2 (10.5)	31 (45.6)	0.005
Hypertension, n (%)	2 (10.5)	35 (51.5)	0.001
Biochemical variables			
Glucose (mmol/L)	4.74 (4.19–5.29)	4.85 (4.55–6.09)	0.296
Total cholesterol (mmol/L)	3.68 (2.98–4.38)	4.27 (3.18–5.51)	0.223
HDL - cholesterol (mmol/L)	1.13 (0.82–1.32)	1.02 (0.54–1.63)	0.641
LDL - cholesterol (mmol/L)	1.99 (1.83–2.46)	2.02 (1.71–3.37)	0.658
Triglycerides (mmol/L)	0.79 (0.56–1.03)	0.98 (0.81–1.84)	0.045
Immunohistochemical variables*			
Positive staining expressed as a percentage (%) of the arterial area			
CD68	0.75 (0-1.8)	3.8 (1.6-6.2)	0.002
CCL2	2.4 (1.3-5.8)	17.2 (9.1-27.3)	<0.001
CCR2	24.4 (14.4-49.6)	40.1 (24.3-54.1)	0.037
ACKR1	6.8 (2.4-12.6)	13.3 (6-43.1)	0.001
ACKR2	21.9 (8.1-35.5)	34.8 (25.2-53.7)	0.020
Percentage (%) of stained cells in positive specimens			
CCL2	(n = 5; 26%)	(n = 68; 100%)	
Intima	4.1 (2.4 – 5.3)	8.5 (5.9 – 11.2)	<0.001
Media	10.5 (3.5 – 19.1)	35.5 (22.4 – 59.6)	<0.001
Adventitia	3.6 (2.7 – 5.5)	21.5 (18.4 – 26.2)	<0.001
CCR2	(n = 19; 100%)	(n = 68; 100%)	
Intima	24.5 (19.2 – 29.3)	29.1 (24.4 – 33.3)	0.120
Media	70.1 (64.3 – 74.2)	75.6 (70.7 – 84.6.6)	0.087
Adventitia	10.4 (7.5 – 14.1)	31.8 (27.2 – 34.7)	0.001
ACKR1	(n = 12; 63%)	(n = 55; 81%)	
Intima	5.4 (3.1 – 7.3)	74.1 (64.3 – 78.2)	0.001
Media	15.8 (11.2 – 20.5)	82.7 (73.2 – 84.9)	0.001
Adventitia	3.9 (2.1 – 4.9)	65.8 (61.6 – 68.9)	0.001
ACKR2	(n = 16; 84%)	(n = 68; 100%)	
Intima	19.5 (11.9 – 26.3)	21.2 (17 – 24.4)	0.102
Media	24.9 (17.7 – 26.1)	30.7 (22.9 – 40.3)	0.087
Adventitia	50.7 (44.2 – 67.3)	74.2 (61.2 – 85.1)	0.001

* Staining was measured using automated image analysis and expressed as median and interquartile range (IQR, 25-75%).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ATEROSCLEROSI I CITOCINES: INFLUÈNCIA DE CCL2 I ELS SEUS RECEPTORS

Montserrat Fibla Simó