

**UNIVERSIDAD DE NAVARRA**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES  
MONOCITARIAS Y SU ASOCIACIÓN  
CON EL RIESGO CARDIOVASCULAR.  
HALLAZGO DE NUEVOS  
BIOMARCADORES SÉRICOS: SDF1 Y  
MMP-12.**

TESIS DOCTORAL

MARÍA MARCOS JUBILAR









# **ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES MONOCITARIAS Y SU ASOCIACIÓN CON EL RIESGO CARDIOVASCULAR. HALLAZGO DE NUEVOS BIOMARCADORES SÉRICOS: SDF1 Y MMP-12**

Memoria presentada en la **Facultad de Medicina** de la **Universidad de Navarra** por **María Marcos Jubilar** para optar al título de **Doctor en Medicina**.

José Antonio Páramo Fernández

Juan Carlos Pastrana Delgado





El Dr. D. José Antonio Páramo Fernández, Catedrático de Hematología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra, y D. Juan Carlos Pastrana Delgado, profesor titular de la Universidad de Navarra, certifican que el siguiente trabajo: "ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES MONOCITARIAS Y SU ASOCIACIÓN CON EL RIESGO CARDIOVASCULAR. HALLAZGO DE NUEVOS BIOMARCADORES SÉRICOS: SDF1 Y MMP-12", presentado por María Marcos Jubilar, ha sido realizado bajo su dirección y reúne las condiciones para ser presentada como memoria para optar al título de Doctor en Medicina.

Pamplona, Julio 2021

José Antonio Páramo Fernández

Juan Carlos Pastrana Delgado









A mi familia



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, José Antonio Páramo y Juan Carlos Pastrana por la confianza depositada en mí para sacar adelante este proyecto de tesis doctoral. Especialmente quisiera agradecer al doctor Páramo por trasmitirme su desbordante pasión por la coagulación.

A Josune Orbe, porque sin ella esta tesis no hubiera salido adelante, sus consejos, su visión y todas las infinitas aportaciones han hecho que esta tesis sea casi más suya que mía.

Al área de medicina vascular, sin la aportación de todos y cada uno de los que forman parte del grupo no hubiera sido posible que saliera adelante el proyecto. A todo el 3.05, cada uno ha sido esencial en una parte de este proyecto, Goren, Florencio, Manu, Miri, Lara... por enseñarme desde cómo pipetear, los mejores trucos con las tinciones, como a no desesperar en el laboratorio, que las cosas tienen una importancia relativa y que al final todo sale brutal. Josean y Karmentxu por estar siempre dispuestos a aportar su granito de arena.

Al departamento de hematología, por ayudarme a crecer tanto profesional como personalmente. Porque siempre estáis disponibles para resolver una duda o a debatir cualquier situación. Por hacerme ser la hematóloga que soy.

A mis amigas, por compartir tanto los momentos buenos como los malos.

Y por último, pero no por ello menos importantes, a mis padres y mi hermana, mi apoyo incondicional, siempre dispuestos a escuchar todas y cada una de mis obsesiones y miedos. Siempre disponibles para celebrarlo todo.



# **ABREVIATURAS**





AAS: ácido acetil salicílico

ACV: accidente cerebro vascular

AINES: antiinflamatorios no esteroideos

AIT: accidente isquémico transitorio

ApoE: apolipoproteína E

ApoB: apoB-lipoproteína

ARA-II: agonista del receptor de angiotensina II

CAD: enfermedad coronaria, del inglés *coronary artery disease*

CEUS: ultrasonido de contraste mejorado, del inglés *contrast enhanced ultrasound*

CHN: Complejo Hospitalario de Navarra

CUN: Clínica Universidad de Navarra

CXC: quimiocinas

DM: diabetes mellitus

EAP: enfermedad arterial periférica

EC: células endoteliales, del inglés *endothelial cells*

ECM: matriz extracelular, del inglés *extracellular matrix*

ECV: enfermedades cardiovasculares

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

<sup>18</sup>F-FDG: 18-fluoruro de fluorodesoxiglucosa

GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocito-macrófago, del inglés *granulocyte macrophage-colony stimulating factor*

HbA1c: hemoglobina glicosilada

HDL-C: lipoproteína de alta densidad, del inglés *high-density lipoprotein cholesterol*

HTA: hipertensión arterial

IAM: infarto agudo de miocardio

IECA: inhibidor del enzima convertidor de angiotensina

IL: interleucina

IMC: índice de masa corporal

KO: del inglés *knockout*

LDL-ox: lipoproteína de baja densidad oxidada, del inglés *low-density lipoprotein cholesterol oxidized*

LDL: lipoproteína de baja densidad, del inglés *low-density lipoprotein cholesterol*

M-CSF: factor estimulador de colonias de macrófagos, del inglés *macrophage-colony stimulating factor*

MFI: intensidad de fluorescencia media, del inglés *mean-fluorescence intensity*

MMP: metaloproteasa, del inglés *matrix metalloproteinase*

Mon1: monocito tipo 1 (clásico)

Mon2: monocito tipo 2 (intermedio)

Mon3. monocito tipo 3 (no clásico)

MT-MMP: metaloproteasas de membrana, del inglés *membrane-type matrix metalloproteinase*

M1: macrófago tipo 1

M2: macrófago tipo 2

M4: macrófago tipo 4

NO: óxido nítrico, del inglés *nitric oxide*

OCT: tomografía de coherencia óptica, del inglés *optical coherence tomography*

PAD: presión arterial diastólica

PAS: presión arterial sistólica

PBS: solución tampón fosfato, del inglés *phosphate buffer solution*

PCR: proteína C reactiva.

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas, del inglés *platelet derived growth factor*

PET: tomografía por emisión de positrones, del inglés *positron emission tomography*

PREDIMED: prevención dieta mediterránea

RNA: ácido ribonucleico, del inglés *ribonucleic acid*

ROS: especies reactivas de oxígeno, del inglés *reactive oxygen species*

SDF1: factor derivado del estroma 1, del inglés *stromal derived factor 1*

SMC: célula de músculo liso, del inglés *smooth muscle cell*

TBS: solución salina tamponada con tris, del inglés *tris-buffered saline*

CT: tomografía computerizada, del inglés *computerized tomography*

Th: linfocito T helper

TIMP: inhibidores de metaloproteasas, del inglés *tissue inhibitor of matrix metalloproteinases*

TGF-  $\beta$ : factor de crecimiento tisular  $\beta$ , del inglés *tumor growth factor-  $\beta$*

TLR: receptores tipo toll, del inglés *toll-like receptor*

TNF: factor de necrosis tumoral, del inglés *tumor necrosis factor*

UE: Unión Europea

VSMC: célula de músculo liso vascular, del inglés *vascular smooth muscle cell*

# ÍNDICE



<b>1. <u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	<b>1.</b>
<b>ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR: MAGNITUD DEL PROBLEMA</b> .....	<b>1</b>
<b>INFLAMACIÓN Y ATEROSCLEROSIS: ASPECTOS MOLECULARES Y CELULARES</b> .....	<b>1</b>
<i>FISIOPATOLOGÍA DE LA ATEROSCLEROSIS</i> .....	<b>2</b>
<i>MONOCITOS Y SUBPOBLACIONES</i> .....	<b>5</b>
<i>MACRÓFAGOS</i> .....	<b>8</b>
<b>PAPEL DE LAS METALOPROTEASAS EN LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR</b> .....	<b>10</b>
<i>ESTRUCTURA Y FUNCIÓN</i> .....	<b>10</b>
<i>MMPs EN LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES</i> .....	<b>13</b>
<b>EXPLORANDO NUEVOS BIOMARCADORES INFLAMATORIOS A PARTIR DE UN MODELO ANIMAL DE ATEROSCLEROSIS</b> .....	<b>17</b>
<i>EJE SDF1/CXCR4</i> .....	<b>18</b>
<i>MMP-12</i> .....	<b>21</b>
<b>2. <u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u></b> .....	<b>25</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>25</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
<b>3. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u></b> .....	<b>29</b>
<b>ESTUDIOS DE ATEROSCLEROSIS IN VITRO</b> .....	<b>29</b>
I. <b>MODELO EXPERIMENTAL DE ATEROSCLEROSIS</b> .....	<b>29</b>
<i>Estudio inmunohistoquímico de las aortas de ratón</i> .....	<b>29</b>
II. <b>CULTIVO CELULAR DE MONOCITOS Y POLARIZACIÓN MACROFÁGICA EN PRESENCIA DE MMP-10</b> .....	<b>31</b>
<i>Citometría de macrófagos</i> .....	<b>33</b>
<i>Estudios de expresión génica</i> .....	<b>34</b>
<b>ESTUDIO CLÍNICO</b> .....	<b>36</b>
<i>CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES</i> .....	<b>36</b>
<i>DETERMINACIONES ANALÍTICAS</i> .....	<b>38</b>
<i>Determinación de MMP-12 y SDF1</i> .....	<b>39</b>

<i>Otras determinaciones analíticas.....</i>	39
<i>SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES.....</i>	40
<i>DETERMINACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES MONOCITARIAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....</i>	40
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	41
<b>4. <u>RESULTADOS</u>.....</b>	<b>45</b>
<b>AUMENTO DE CXCR4 EN RATONES APOE-/- RESPECTO A RATONES APOE-/-MMP10-/-.....</b>	45
<b>PAPEL DE LA MMP-10 EN LA POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS.....</b>	48
<b>ESTUDIO CLÍNICO DE UNA COHORTE DE PACIENTES CON RIESGO CARDIOVASCULAR.....</b>	52
<i>SDF1, MMP-12 y PCR COMO MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR.....</i>	54
<i>Aumento de SDF1, MMP-12 y PCR según el grupo de riesgo cardiovascular.....</i>	54
<i>Asociación de biomarcadores inflamatorios y factores de riesgo cardiovascular.....</i>	55
<i>Aumento de SDF1 y PCR en pacientes con aterosclerosis clínica.....</i>	57
<i>La presencia de placas ateroscleróticas no se asoció con los niveles de SDF1, MMP-12 ni PCR.....</i>	66
<b>ASOCIACIÓN DE NIVELES ELEVADOS DE SDF1, MMP-12 Y PCR CON LA MORTALIDAD.....</b>	68
<b>EVALUACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES MONOCITARIAS EN RELACIÓN CON EL RIESGO CARDIOVASCULAR.....</b>	71
<i>Ausencia de diferencias en la expresión de los marcadores de superficie monocitaria según el grupo de riesgo.....</i>	73
<i>Aumento del porcentaje Mon1 y Mon2 en pacientes de grupo 3.....</i>	73
<i>Correlación de factores de riesgo cardiovascular y subpoblaciones monocitarias.....</i>	74
<i>Aumento de Mon1 y Mon2 en pacientes con eventos cardiovasculares previos.....</i>	76



<b>5. <u>DISCUSIÓN</u></b> .....	<b>79</b>
<b>IMPORTANCIA DE LA INFLAMACIÓN EN LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR</b> .....	<b>79</b>
<b>NUEVOS MARCADORES INFLAMATORIOS A PARTIR DE UN MODELO MURINO DE ATEROSCLEROSIS.</b> .....	<b>81</b>
<b>PAPEL DEL EJE SDF1/CXCR4 Y MMP-12 EN LA ATEROSCLEROSIS CLÍNICA.</b> .....	<b>83</b>
<b>PAPEL DEL EJE SDF1/CXCR4 Y MMP-12 EN LA ATEROSCLEROSIS SUBCLÍNICA.</b> .....	<b>85</b>
<b>EVALUACIÓN DE SDF1, MMP-12 Y PCR Y RIESGO DE MORTALIDAD</b> .....	<b>86</b>
<b>PAPEL DE LOS MONOCITOS-MACRÓFAGOS EN LA INFLAMACIÓN Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR</b> .....	<b>86</b>
<b>NUEVAS ESTRATEGIAS EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR</b> .....	<b>90</b>
<b>LIMITACIONES</b> .....	<b>91</b>
<b>6. <u>CONCLUSIONES</u></b> .....	<b>97</b>
<b>7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	<b>101</b>
<b>8. <u>ANEXOS</u></b> .....	<b>121</b>
<b>COMUNICACIONES A CONGRESOS</b> .....	<b>121</b>
<b>ARTÍCULOS ORIGINALES</b> .....	<b>122</b>



# **INTRODUCCIÓN**



# 1. INTRODUCCIÓN

## **ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR: MAGNITUD DEL PROBLEMA**

En la actualidad, la prevalencia de las enfermedades cardiovasculares (ECV) es de 108,7 millones de personas, presentando una incidencia anual de 19,9 millones de casos nuevos en la Unión Europea (UE), siendo mayor en mujeres. A día de hoy las ECV siguen siendo la principal causa de muerte en los países miembros de la UE, sumando un total de 2,2 millones en mujeres y 1,9 millones en hombres, lo que representa un 47% y 39% de las muertes totales respectivamente (1). En nuestro país, las ECV también representan la principal causa de mortalidad con aproximadamente 120.000 muertes al año, siendo la razón de una de cada 4 muertes en varones y una de cada 3 en mujeres. Si bien, en varones la enfermedad coronaria aguda encabeza la lista, en mujeres lo presenta el accidente cerebrovascular (2).

## **INFLAMACIÓN Y ATEROSCLEROSIS: ASPECTOS MOLECULARES Y CELULARES**

La aterosclerosis es una enfermedad sistémica que afecta a la capa íntima de las arterias grandes y medianas (aorta, carótidas, coronarias y arterias periféricas) y que se caracteriza por la formación de placas de ateroma que provocan la oclusión progresiva de la luz arterial (3). Dicho proceso se origina por una inflamación vascular crónica que representa el sustrato principal de las ECV. En los últimos años se ha demostrado la importancia de la inflamación en los distintos estadios de la aterosclerosis (4,5) que se ve favorecida por la acción de los factores de riesgo cardiovascular clásicos con activación del sistema inmunitario, favoreciendo a su vez la progresión de la placa aterosclerótica.

Diversos estudios han demostrado la importancia etiopatogénica de la inflamación en la aterosclerosis de forma independiente a la acción de los factores de riesgo cardiovascular (6), con implicación de factores genéticos y ambientales. Sin embargo, debemos de tener en cuenta que dicha inflamación no se origina de forma espontánea, sino que se produce como respuesta a un daño vascular, con el objetivo de resolver la causa que lo produjo o iniciar la reparación vascular (6).

### FISIOPATOLOGÍA DE LA ATEROSCLEROSIS

La lesión vascular inicial que originará el proceso aterosclerótico tiene lugar en zonas de alto flujo sanguíneo, es decir, zonas de bifurcación del árbol vascular arterial. A dicho nivel, se produce una disfunción endotelial que lleva al aumento de la permeabilidad local facilitando la entrada y posterior acúmulo a nivel subendotelial de apoB-lipoproteínas (ApoB), predominantemente lipoproteínas de baja densidad (LDL) y remanentes de quilomicrones (3,6–8). Es a dicho nivel donde el LDL es oxidado a LDL-ox provocando la liberación de citoquinas proinflamatorias por parte del endotelio. Dichas citoquinas originarán alteraciones en la función endotelial, entre las que destacan cambios en la permeabilidad, en la adhesión y la secreción de sustancias vasoactivas (9,10). Además, se produce la activación de células endoteliales (EC) que originará la activación del sistema inmunitario y la adhesión de diferentes tipos leucocitarios (11).

Por tanto, en este proceso inflamatorio se origina la activación tanto de la respuesta inmunitaria innata, con el reclutamiento de neutrófilos y monocitos, como de la respuesta adaptativa con la activación de linfocitos T (12). Adicionalmente, provoca la proliferación y diferenciación de células de músculo

liso vascular (VSMC) (6,13) así como el acúmulo local de lípidos extracelulares y otras moléculas de matriz, que todo ello conformará posteriormente la placa aterosclerótica (6), proceso que vemos resumido en la figura 1.

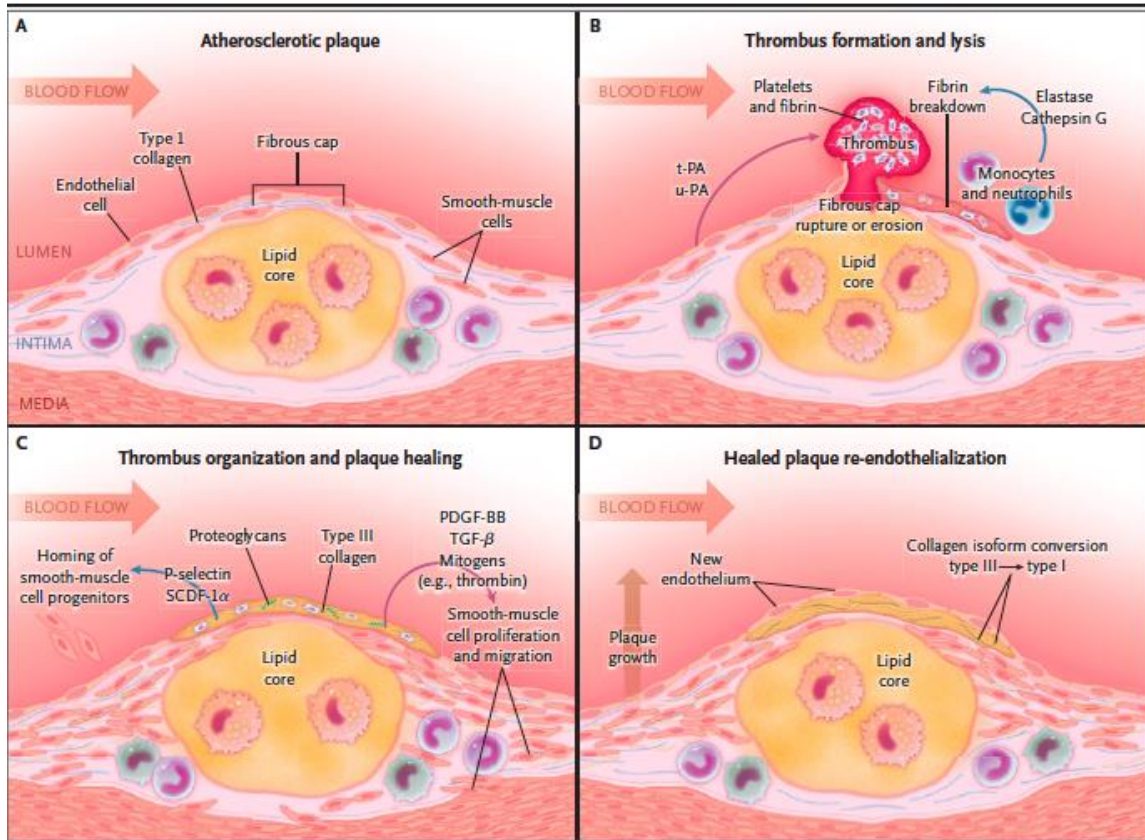
De entre todos los eventos que se producen en el proceso aterogénico, quizás uno de los pasos más críticos sea la infiltración subendotelial de monocitos procedentes de la médula ósea, los cuales son atraídos y reclutados por el endotelio gracias a la acción de diversas citoquinas y moléculas de adhesión, adoptando a nivel local un fenotipo inflamatorio con posterior transformación a macrófagos que, como veremos más adelante, serán los encargados de facilitar la progresión de la placa aterosclerótica o de promover su resolución (8,13–15). A nivel local, tras el acúmulo de lípidos en vacuolas, los macrófagos se transformarán en células espumosas (3), promoviendo la formación de un núcleo rico en lípidos que se denomina estría grasa, y que es la primera lesión macroscópicamente visible en la aterosclerosis. Por su parte, las células espumosas, como consecuencia de fenómenos inflamatorios pueden romperse liberando su contenido, LDL-ox y radicales libres, a la circulación que provocarán mayor daño endotelial y atraerán monocitos y linfocitos, formándose el denominado núcleo lipídico. Dicho núcleo será rodeado por una capa fibrosa constituida por colágeno, VSMC y EC que conformarán la placa aterosclerótica avanzada (3,13).

En situaciones que perpetúen la inflamación, la placa aterosclerótica formada podrá crecer a lo largo del tiempo de forma asintomática hasta que se produzca una ruptura o erosión de la misma (11,16). Si se produce la ruptura de la placa, se origina la exposición de componentes altamente trombogénicos al torrente sanguíneo que conlleva la activación plaquetaria, agregación y posterior

formación de un trombo. Por su parte, la formación de dicho trombo inducirá la consecuente activación del sistema fibrinolítico endógeno con el objetivo de resolver dicho fenómeno (13). Así pues, los eventos vasculares se producirán en función de la capacidad del organismo de resolver dicha ruptura que dependerá del medio inflamatorio en el que se produzca y del sistema fibrinolítico individual (13).

Por otro lado, la resolución incompleta de la lesión aterosclerótica y los defectos en la eliminación de células apoptóticas, originarán un estado inflamatorio crónico que podrá promover la sucesiva progresión de la placa y el desarrollo de posteriores eventos cardiovasculares (6,8).





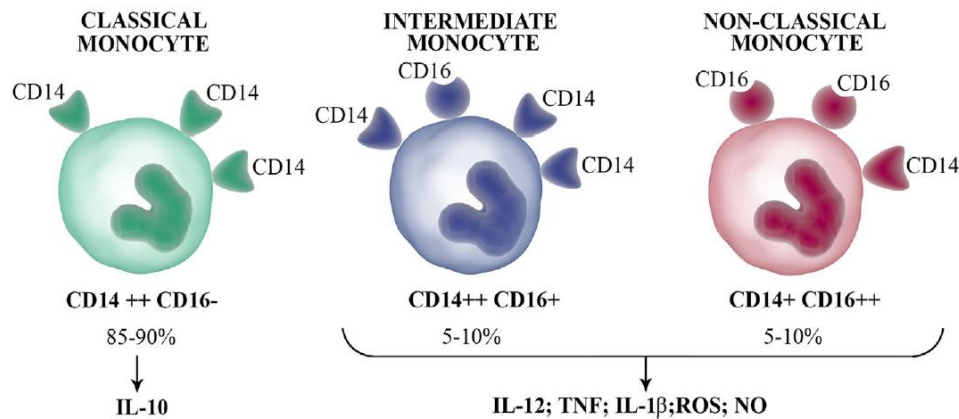
**Figura 1. Proceso de formación de la placa aterosclerótica.** A) Desarrollo de la placa a nivel subendotelial conformada por un núcleo rico en lípidos que es rodeado por una capa fibrosa. B) Ruptura de la placa y exposición de su contenido que provoca la formación de un trombo que en aquellos sujetos con un sistema fibrinolítico eficaz conseguirá resolverlo. C) Organización del trombo y atracción de células de músculo liso de médula ósea para estabilizar la lesión. D) Reendotelización de la placa que llevará a la formación de una nueva placa fibrosa, la repetición de este proceso puede condicionar la oclusión progresiva de la luz arterial (*Adaptado de ref. 13*).

## MONOCITOS Y SUBPOBLACIONES

Representan entre el 3 y 8% de los leucocitos de la sangre, produciéndose su diferenciación desde los progenitores hematopoyéticos en sangre periférica donde pueden circular durante unos pocos días antes de migrar a un tejido donde se diferenciarán a macrófagos (17). Sus principales funciones son la respuesta

inmunitaria innata, inflamación y remodelación tisular, teniendo un papel central en la inflamación asociada a la aterosclerosis (18). En dicho contexto, los monocitos atraídos por factores quimiotácticos producidos por las células endoteliales y células de músculo liso (SMC) penetran la pared vascular, donde posteriormente madurarán a macrófagos por la acción de factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y factor estimulador de colonias de granulocito-macrófago (MG-CSF) (19). La migración de monocitos a nivel subendotelial depende de vías de señalización de quimiocinas como CCR2, CCR5 y CX3CR1, ya que su bloqueo reduce la infiltración monocitaria y el tamaño de placa aterosclerótica en un modelo experimental de aterosclerosis, como es el ratón deficiente en apolipoproteína E (ApoE<sup>-/-</sup>) (19).

Tradicionalmente los monocitos se han clasificado atendiendo a la presencia de CD14 y CD16 de membrana. Se diferenciaban en dos poblaciones tanto fenotípica como funcionalmente: monocitos tipo 1 o clásicos, cuyo papel era inflamatorio; y monocitos tipo 2 o no clásicos, cuya función principal era patrullera, eliminando las células endoteliales dañadas y favoreciendo la reparación vascular. Sin embargo, en 2010, se estableció una nueva clasificación que tenía en cuenta la presencia de tres poblaciones diferentes de monocitos con funciones diferenciadas: monocitos clásicos (Mon1) (CD14<sup>++</sup> y CD16<sup>-</sup>); monocitos intermedios (Mon2) (CD14<sup>++</sup>, CD16<sup>+</sup>) y monocitos no clásicos (Mon3) (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) (17,18) (figura 2). Según esta clasificación, los monocitos denominados clásicos representan el 85-90% de los monocitos totales, los monocitos intermedios el 9% y los monocitos no clásicos el 6% (20,21).



**Figura 2. Subpoblaciones de monocitos.** Clasificación en tres subtipos atendiendo a la presencia de CD14 y CD16 de membrana. Monocito clásico (Mon1) (CD14++CD16-) que produce la secreción de interleucina 10 (IL-10), monocito intermedio (Mon2) (CD14++CD16+) y no clásico (Mon3) (CD14+CD16++) que secretan moléculas inflamatorias (IL-12, IL-1β, factor de necrosis tumoral (TNF), óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS). (*Adaptado de ref. 21*).

Si bien múltiples estudios han demostrado que los monocitos CD16+, es decir los tipo 2 y 3, están implicados en procesos inflamatorios e infecciosos, el papel que desarrolla cada uno no está del todo establecido. Inicialmente se consideró que los monocitos intermedios al ser los que más IL-10 secretaban tenían un perfil más antiinflamatorio; sin embargo, estudios recientes han mostrado que los monocitos con mayor secreción de esta interleucina fueron los clásicos. Por otro lado, parece que los más inflamatorios son los no clásicos al responder produciendo citoquinas en respuesta a ligandos del receptor tipo Toll (TLR), siendo los primeros en llegar al sitio de la lesión (21).

Por tanto, aunque en estos últimos años se ha analizado en profundidad el papel de los monocitos en el desarrollo de la aterosclerosis y las ECV, los resultados en ocasiones son contradictorios (tabla 1) (22).

**Tabla 1.** Resumen de trabajos publicados sobre la función de las subpoblaciones monocitarias en la enfermedad cardiovascular. *Adaptada de ref.(22)*

<b>Autor</b>	<b>Año</b>	<b>Resultados principales</b>
Jaipersad et al	2014	Mon1 CD14++CD16-CCR2+ se asocian con el grado de estenosis carotídea y la neovascularización de placa evidenciado por CEUS
Ammirati et al	2016	Monocitos CD14+ y Mon1 (CD14++CD16+) están reducidos en sujetos con neovascularización de placa por CEUS
Justo-Junior et al	2018	Mon2 (Cd14++CD16+) están elevados en pacientes con angina inestable.
Lorenzen et al	2011	No hay asociación entre monocitos CD14+TLR4+ y la aparición de eventos o mortalidad cardiovascular
Meeuwsen et al	2019	No hay asociación entre las subpoblaciones monocitarias y la vulnerabilidad de placa ni el desarrollo de eventos cardiovasculares.
Yamamoto et al	2016	Aumento de monocitos totales predice el desarrollo de insuficiencia cardiaca en pacientes con enfermedad coronaria (CAD).
Zhuang et al	2017	La presencia de placa de fibroateroma se asocia a un aumento de Mon2 circulantes (CD14++CD16+) por OCT.

CEUS: ultrasonido de contraste mejorado. CAD: enfermedad coronaria. OCT: tomografía de coherencia óptica

## MACRÓFAGOS

Los macrófagos son unas células descritas por primera vez en 1882 por Metchnikoff como aquellas implicadas en la defensa frente a patógenos; sin embargo, no fue hasta 1990 cuando se confirmó la presencia de macrófagos en placas ateroscleróticas humanas (23).

Los macrófagos están implicados en todos los estadios evolutivos de la aterosclerosis. Tienen la capacidad de interactuar con otras células del sistema inmunitario (linfocitos T, mastocitos o células dendríticas), así como de modificar su fenotipo en función del perfil de citoquinas al que se expongan. Por ello,

pueden presentar un perfil más inflamatorio o más inmunomodulador (24). Al inicio de la formación de la placa aterosclerótica, los macrófagos procederán de la médula ósea por una mielopoyesis aumentada, si bien, cuando la placa se encuentra bien establecida, los macrófagos presentes procederán de mielopoyesis extramedular, principalmente de macrófagos locales (23). Una vez en el espacio subendotelial, los macrófagos internalizarán el LDL-ox y se diferenciarán a células espumosas que perpetuarán la inflamación (19).

Clásicamente, los macrófagos se han dividido en dos grupos que representan los extremos de un continuo. Los macrófagos activados de forma clásica (M1) que presentan un perfil más inflamatorio y los activados de forma alternativa (M2) que tienen un perfil más inmunomodulador (24). Los macrófagos se polarizan a M1 tras la estimulación con interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) o TLR (24), dichos macrófagos mantienen una intensa interacción con los linfocitos Th1 (13). Dicha interacción a nivel de la placa aterosclerótica promueve la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-13 e IL-23; otras citoquinas como CXCL10 y CXCL11, ROS y óxido nítrico (19,25); así como colagenasas (MMP-1, 8 y 13) y otras metaloproteasas (MMP-2 y 9) que degradan el colágeno intersticial favoreciendo la ruptura de la placa fibrosa (13). Por su parte, aquellos macrófagos polarizados a M2 en respuesta a citoquinas secretadas por linfocitos Th2 (IL-4 o IL-13) tienen un perfil más antiinflamatorio pudiendo subdividirse en cuatro subpoblaciones que de forma general, a excepción de la M2b, secretan moléculas inhibitorias como IL-10 con el objetivo de contrarrestar el efecto de los M1 y promover la reparación tisular (13,19,24). Recientemente se ha descrito un nuevo subtipo de macrófagos, los M4, localizados principalmente a nivel de placa aterosclerótica, que se produce por

la estimulación de CXCL4. CXCL4 se expresa en diversas células involucradas en la aterosclerosis como las EC, monocitos y macrófagos. La polarización inducida por CXCL4 se considera irreversible y su expresión en placas ateroscleróticas carotídeas se ha correlacionado con la severidad de la lesión. Los M4 presentan características fenotípicas específicas como la expresión de MMP-7 y de proteína de unión al calcio S100A8 en su membrana, así como la pérdida completa de CD163. Dicha subpoblación de macrófagos, con baja capacidad de fagocitosis, presenta un papel principalmente proaterogénico a través de la producción de MMP-12, que origina la inestabilidad en la placa (19). Estudios histológicos realizados en placas ateroscleróticas humanas muestran la distribución heterogénea de dichas subpoblaciones, encontrándose de forma predominante los M1 en zonas próximas a la ruptura y los M2 en la adventicia y zonas de placa calcificada. Por lo que parece demostrar que los M1 favorecen el desarrollo de la placa aterosclerótica y los M2 su regresión (13,24). Es interesante señalar que los macrófagos M1 pueden cambiar su fenotipo a M2 o viceversa según las moléculas del entorno que les acompañe (26).

## **PAPEL DE LAS METALOPROTEASAS EN LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR**

### ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Las metaloproteasas de matriz (MMPs) son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc, producidas por diversos tipos celulares (endotelio, músculo liso y monocitos) (27). Fueron descritas por primera vez en 1949 en el contexto del crecimiento tumoral, posteriormente en 1962 se describió su acción sobre el colágeno (28). Presentan actividad proteolítica que contribuye a la

degradación de la matriz extracelular (ECM) y de proteínas no relacionadas con la matriz, el remodelado y la regeneración tisular (29).

Hasta el momento, se han descrito 28 tipos de metaloproteasas de las cuales al menos 23 se encuentran presentes en tejidos humanos y 14 en el tejido vascular (30). Se clasifican, como muestra en la tabla 2, atendiendo a su estructura, especificidad de sustrato y unión a las membranas en: colagenasas (MMP-1, 8 y 13), estromelisinias (MMP- 3, 10 y 11), gelatinasas (MMP-2 y 9), tipo membrana (MT-MMP) y otras (matrilisina, metaloelastasa, etc.) (27).

**Tabla 2.** Clasificación de las metaloproteasas de matriz y su especificidad de sustrato. (Adaptado de ref. 26)

**TABLA 1. Características y especificidad de las principales metaloproteasas**

MMP (tipo)	Denominación	Sustrato MEC
<b>Colagenasas</b>		
MMP-1	Colagenasa-1	Colágenos I, II, III, VII, VIII y X, gelatina, proteoglicanos, tenascina, entactina
MMP-8	Colagenasa-2	Colágenos I, II, III, V, VIII y X, gelatina, agregan
MMP-13	Colagenasa 3	Colágenos I, II, III, IV, IX, X y XIV, gelatina, tenascina, fibronectina, agregan, osteonectina
<b>Gelatinasas</b>		
MMP-2	Gelatinasa A	Colágenos I, IV, V, VII, X, XI y XIV, gelatina, elastina, fibronectina, laminina, agregan, versican, osteonectina, proteoglicanos
MMP-9	Gelatinasa B	Colágenos IV, V, VII, X, XIV, gelatina, elastina, agregan, versican, proteoglicanos, osteonectina
<b>Estromalisinias</b>		
MMP-3	Estromalislina-1	Colágenos III, IV, V y IX, gelatina, agregan, versican, proteoglicanos, tenascina, fibronectina, laminina, osteonectina
MMP-10	Estromalislina-2	Colágenos III, IV, V, gelatina, caseína, agregan, elastina, proteoglicanos
MMP-11	Estromalislina-3	Caseína, laminina, fibronectina, gelatina, colágeno IV, transferrina
<b>Tipo membrana</b>		
MMP-14	MT1-MMP	Colágenos I, II y III, caseína, elastina, fibronectina, vitronectina, tenascina, proteoglicanos, laminina, entactina
MMP-15	MT2-MMP	Tenascina, fibronectina, laminina
MMP-16	MT3-MMP	Colágeno III, gelatina, caseína, fibronectina
MMP-17	MT4-MMP	ND
MMP-24	MT5-MMP	ND
MMP-25	MT6-MMP	ND
<b>Otras</b>		
MMP-7	Matrilisina	Colágenos IV y X, gelatina, agregan, proteoglicanos, fibronectina, laminina, entactina, tenascina, caseína, transferrina, integrina b <sub>2</sub> , osteonectina, elastina
MMP-12	Metaloeelastasa	Colágeno IV, gelatina, elastina, caseína, laminina, proteoglicanos, fibronectina, vitronectina, entactina
MMP-20	Enamelisina	Amelogenina
MMP-23A	MMP-21	ND
MMP-23B	MMP-22	ND
MMP-26	Matrilisina 2	Colágeno IV, fibrinógeno, fibronectina, caseína
MMP-27	ND	ND
MMP-28	Epilisina	Caseína

MEC: matriz extracelular; MMP: metaloproteasas; ND: no determinado.

En general, su estructura proteica está formada por cinco dominios: el péptido de señalización en la región N-terminal, el dominio propéptido hidrofóbico que

contiene un residuo de cisteína, el dominio catalítico que contiene el ion de zinc, la región bisagra y el dominio tipo hemopexina en la región C-terminal que permite la unión a otras proteínas (31,32), figura 3.



**Figura 3. Representación esquemática de la estructura de las metaloproteasas de matriz.**

De forma general, las metaloproteasas se secretan de forma inactiva o de pro-MMPs, y requieren de la disociación del dominio propéptido para su activación. El residuo de cisteína del dominio propéptido y el Zinc del dominio catalítico son comunes a todas las metaloproteasas y se considera que este es el mecanismo de activación común en todas ellas (27).

El principal activador fisiológico de las MMPs es la plasmina que puede ser generada por la activación de la cascada fibrinolítica o por la inflamación (33). También serán activadas por la acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS), trombina, factor Xa, tripsina, etc. (34). Su actividad también se encuentra regulada a nivel transcripcional, postraducciona y por la acción de los inhibidores, entre los cuales destacan los inhibidores tisulares específicos de MMPs (TIMP) que se unen de forma directa e irreversible al dominio catalítico de las MMPs (27,35), y la alfa2-macroglobulina que actúa como inhibidora de proteasas (34,36).

De forma general se describe la función de las MMPs en el contexto de destrucción tisular en el cáncer, artritis, y enfermedades neurológicas degenerativas; en el contexto de la fibrosis en la aterosclerosis, cirrosis,

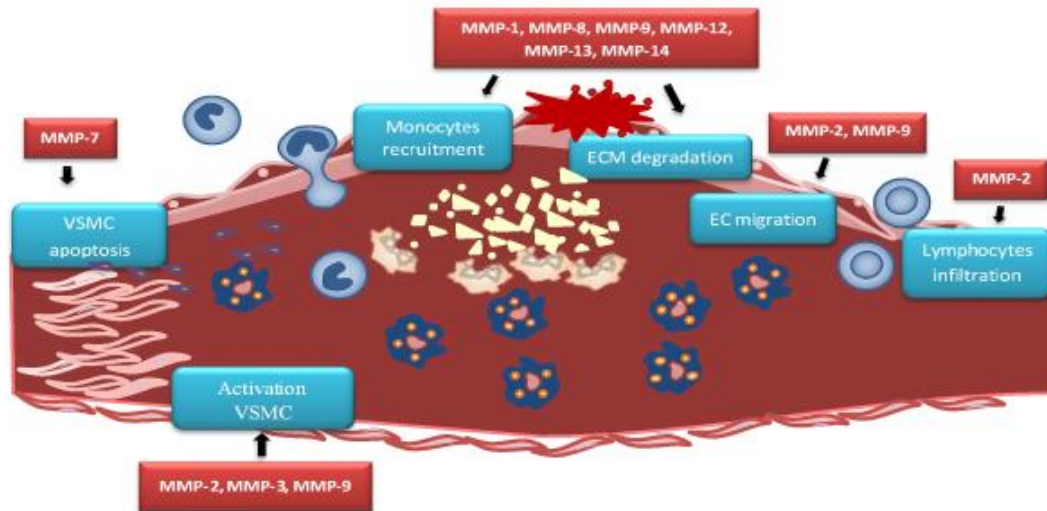


esclerosis múltiple, y fibrosis pulmonar; y en el contexto de la degradación de matriz en la cardiomiopatía dilatada, aneurismas de aorta y varices (28).

### MMPs EN LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

En las ECV parece crítico el control adecuado del sistema de las MMPs y sus inhibidores por su implicación en la progresión, ruptura y degradación de la placa aterosclerótica (13).

Hasta el momento, se ha descrito el papel de las MMP-1, 8 y 13 en la desestructuración del colágeno que facilitará la ruptura de la placa, el de las MMP-2 y 9 en la neovascularización, el de la MMP-12 como promotora de la infiltración de monocitos/macrófagos en la pared vascular y degradación de la elastasa de la ECM, y el de la MMP-14 favoreciendo la invasión de VSMC y fibroblastos (27). La figura 4 muestra las etapas del proceso aterosclerótico en el que se encuentra involucrada cada MMP (37). Además, en la tabla 3 se muestra la implicación de cada metaloproteasa en cada etapa del proceso aterogénico.



**Figura 4. Papel de la MMPs en la placa aterosclerótica.** MMP-2, MMP-3 y MMP-9: activación de células de músculo liso vascular (VSMC); MMP-7: apoptosis de las VSMC, MMP-1, MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-14: reclutamiento de monocitos y degradación de ECM; MMP-2, MMP-9: migración de células endoteliales; MMP-2: infiltración de monocitos. (*Adaptado de ref. 37*).

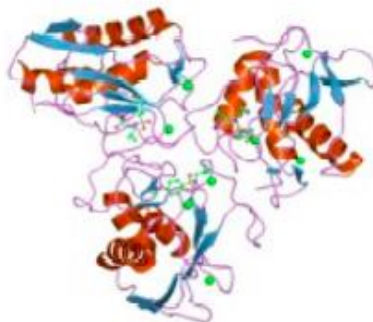
**Tabla 3.** Participación de las metaloproteasas en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis. (*Adaptado de ref. 37*)

<b>Inflamación vascular y disfunción endotelial</b>	
Aumento de la migración e invasión de células inflamatorias en la pared vascular	MMP-1, 8, 9, 12, 13 y 14.
Disfunción endotelial	MMP-2 y 9
Oxidación de LDL	MMP-1, 2, 8 y 9
Apoptosis de células endoteliales	MMP-9
<b>Desarrollo de placa</b>	
Aumento de la íntima-media	MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9 y 10
Crecimiento de placa	MMP-2
Migración de VSCM	MMP-9
Descenso de la contractilidad de VSCM	MMP-2 y 9
<b>Neovascularización</b>	
Degradación de la matriz extracelular	MMP-1, 8, 9, 12, 13 y 14
Liberación de factores de crecimiento	MMP-2, 9, 13 y 14
<b>Calcificación</b>	
Inducción de la calcificación de la placa	MMP-2 y 7
<b>Activación y desestabilización de la placa</b>	
Activación de apoptosis de VSMC en la capa fibrosa	MMP-7
Actividad lítica del colágeno	MMP-1, 8 y 13
Promoción de la ruptura de placa	MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13 y 14

En el contexto de las ECV nuestro grupo ha demostrado la relevancia de la MMP-10, describiendo su asociación con la inflamación al demostrar que la proteína C reactiva (PCR) induce la MMP-10 en células endoteliales (39) y ambos parámetros se correlacionan de forma positiva con la aterosclerosis asintomática en sujetos con factores de riesgo cardiovascular (40). Además, demostramos el papel causal de la MMP-10 en la progresión de la aterosclerosis, infiltración macrofágica y calcificación de la placa. Adicionalmente, hemos demostrado que

la MMP-10 juega un papel en el ictus isquémico (41) así como en la severidad y evolución de la enfermedad arterial periférica (EAP) (42).

Dicha metaloproteasa, es también conocida como estromelisina 2 (figura 5) y su principal función es la degradación de múltiples componentes de la ECM entre los que destacan los proteoglicanos, la laminina, fibronectina y colágeno III y IV (43). La proenzima tiene un peso molecular de 54 KDa y tras su activación es de 46 kDa (44). Su expresión se encuentra regulada a nivel transcripcional por la acción de citoquinas y factores de crecimiento que estimulan su producción como IL-1, TNF- $\alpha$ , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), trombina, calicreína y triptasa; mientras que se promueve su inhibición mediante la acción de factor de crecimiento tisular- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), heparina y glucocorticoides (36). A su vez, MMP-10 es capaz de activar otras metaloproteasas como la 1, 7, 8, 9 y 13 y es inhibida por la acción de TIMP-1 y TIMP-2 (45). Participa en múltiples procesos fisiológicos entre los que destacan la reparación de lesiones y el crecimiento óseo (46).



**Figura 5. Imagen representativa de la estructura cristalizada de la MMP-10.**  
(Adaptada de ref. 39).

### **EXPLORANDO NUEVOS BIOMARCADORES INFLAMATORIOS A PARTIR DE UN MODELO ANIMAL DE ATEROSCLEROSIS.**

En los últimos años, se han evaluado nuevos biomarcadores de riesgo y enfermedad cardiovascular con el objetivo de detectar de forma precoz dicha patología y poder evitar sus complicaciones (47,48). Se ha descrito que para que un biomarcador sea útil debe cumplir los siguientes criterios: fácil de medir, debe añadir información adicional a los factores de riesgo clásicos y debe cambiar el manejo clínico de los pacientes; además, se sugiere que sea coste efectivo y seguro. Para ello debemos atender a su poder de discriminación, calibración y reclasificación (18).

El primer biomarcador que ha demostrado su validez clínica y que hasta el momento es el único utilizado en la práctica clínica es la PCR. Datos de la población general y de cohortes de riesgo cardiovascular han demostrado la asociación entre niveles de PCR y desarrollo de las ECV, siendo útil para discriminar los pacientes de alto riesgo (49–52). Asimismo, se ha evidenciado la asociación de otros biomarcadores con el desarrollo de placa aterosclerótica y eventos cardiovasculares posteriores, si bien hasta el momento las evidencias clínicas son débiles y se precisan nuevos estudios que validen dichos resultados y nos permita establecer el algoritmo más adecuado para su uso (53).

También está cobrando importancia el estudio no solo de parámetros analíticos, sino también el papel de la imagen en la detección precoz de complicaciones cardiovasculares (54). Hasta el momento se ha evidenciado la asociación entre el grosor de la íntima-media carotídea medido mediante ecografía y el riesgo de desarrollar nuevos eventos vasculares (55), si bien actualmente está en entredicho su validez. Por otro lado, se ha estudiado la presencia de placas femorales ateroscleróticas por ecografía y el calcio coronario por tomografía

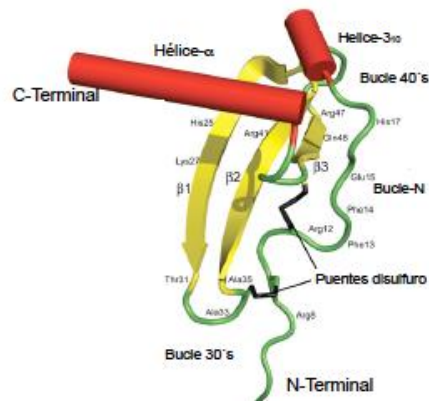
computerizada (CT) como nuevos biomarcadores de imagen (56), siendo este último un marcador de riesgo cardiovascular bien conocido y que se considera una herramienta útil que permite reclasificar pacientes de riesgo intermedio (57,58). Si bien, de forma más reciente, se está prestando especial atención a la información ofrecida por la tomografía por emisión de positrones (PET) en relación con el riesgo cardiovascular y evolución de la aterosclerosis. Se ha demostrado la utilidad tanto del PET-TC convencional con  $^{18}\text{F}$ -FDG (59), de forma combinada con resonancia magnética (60) o con nuevos radiotrazadores como el  $^{18}\text{F}$ -NaF PET/CT en la detección de la presencia de placas vulnerables (61) y por tanto la detección de pacientes en riesgo de eventos cardiovasculares agudos. Además, se ha demostrado que la captación producida en PET mediante el radiotrazador [ $^{68}\text{Ga}$ ]Pentixafor, que se une al CXCR4, en pacientes con eventos coronarios agudos, se correlaciona con la respuesta inflamatoria tras dichos eventos y se asocia con el volumen de la cicatriz del área infartada en el seguimiento (62)

### EJE SDF1/CXCR4

El factor derivado de células del estroma (SDF1), también conocido como CXCL12 (figura 6), es una quimiocina constitutiva e inducible, altamente conservada en la especie humana, perteneciente a la familia de las quimiocinas (CXC) (63). Se trata de una citoquina pleiotrópica presente en múltiples órganos: hígado, piel, pulmón, médula ósea... (64). Se han descrito dos receptores, CXCR4 y CXCR7, originando diferentes respuestas en función del receptor al que se una (65), aunque, en la actualidad parece más aceptado que la función de CXCR7 consiste en modular la función de CXCR4 (66). El receptor de quimiocinas CXCR4 pertenece a la familia de los receptores acoplados a

proteínas G transmembrana y se expresa de forma ubicua en el organismo. En la placa aterosclerótica se localiza en regiones ricas en leucocitos y células mononucleares (67).

La unión de SDF1 al receptor CXCR4 conlleva la disociación de la proteína G con la consecuente activación de las vías de MAPK y PI3K, además del reclutamiento de  $\beta$ -Arrestina que media en la endocitosis del receptor (68). Tras su unión a un recetor regula el desarrollo embrionario así como múltiples procesos fisiológicos (64), si bien, su función más conocida, es la movilización de progenitores de médula ósea a periferia (69).



**Figura 6. Representación de la estructura de un monómero de CXCL12.** (Adaptado de ref. 65).

En la patología cardiovascular, hasta el momento, se ha identificado el SDF1 como un mediador causal en enfermedad coronaria (71,72). SDF1 está presente en varios tipos celulares relevantes en el proceso inflamatorio asociados a la aterosclerosis, como los monocitos/macrófagos, linfocitos T y B, neutrófilos, células endoteliales y células de músculo liso (68), si bien el papel que juega el receptor CXCR4 en cada una de ellas no está definido todavía.

Asimismo, el CXCR4 y su ligando se encuentran expresados a nivel de cardiomiocitos y fibroblastos, y se inducen en situaciones de isquemia donde

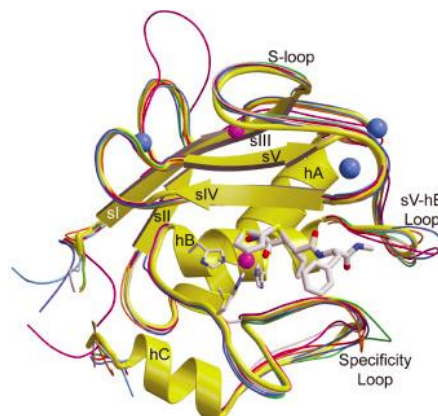
tienen una función protectora en el reclutamiento de progenitores y cardiomiocitos (68). Sin embargo, estudios en animales han demostrado que la sobreexpresión de CXCR4 en cardiomiocitos durante un infarto agudo de miocardio (IAM) favorece la lesión cardíaca al perpetuar la infiltración inflamatoria y favorecer la muerte celular (73). Además, este eje se encuentra implicado en las vías de señalización intracelular que promueven la angiogénesis, respuesta vascular inflamatoria e hiperplasia de la íntima (74). Por último, el eje CXCR4/SDF1 afecta a otros mediadores implicados en el desarrollo de la aterosclerosis, así se ha demostrado que el bloqueo de dicho eje disminuye la expresión proteolítica de mediadores, como la MMP-12 (75).

Adicionalmente, se ha demostrado el papel de la MMP-10 en la modulación del eje CXCR4/SDF1 en la regeneración muscular en un modelo experimental de daño muscular en ratones deficientes en MMP-10 (*Mmp10<sup>-/-</sup>*). En dicho modelo se demostró que los ratones *Mmp10<sup>-/-</sup>* presentaban niveles inferiores de CXCR4 y SDF1 y un retraso en la regeneración muscular respecto a los ratones MMP-10+, sugiriendo que la actividad de MMP-10 modula la señalización de CXCR4/SDF1, que es esencial para la regeneración eficiente del músculo esquelético (76).



### MMP-12

La metaloproteasa 12 es una MMP perteneciente al grupo de las metaloelastasas. Sintetizada en forma de proenzima de 54kDa, atraviesa un proceso de activación en el que se elimina el dominio propéptido y el C-terminal hasta generar una proteína de 22KDa (figura 7) (77). Se trata de una enzima secretada esencialmente por macrófagos, aunque también por plaquetas. Tiene un papel clave en la repuesta inflamatoria frente a patógenos favoreciendo el reclutamiento de leucocitos (78,79) y el remodelado tisular a través de la degradación de la elastina principalmente, aunque también actúa sobre otros componentes de la matriz extracelular como la laminina, fibronectina o el colágeno IV (80).



**Figura 7. Estructura proteica de la MMP-12.** (Adaptada de ref. 76).

Datos recientes proponen a la MMP-12 como potencial biomarcador de ECV en sujetos diabéticos tipo 2 (82) y muestran su asociación con la presencia de enfermedad coronaria (83) y accidente cerebrovascular así como con la presencia de la placa aterosclerótica (84). Se ha evidenciado en modelos experimentales de ratón su papel en la rigidez vascular dependiente de la edad (85), mientras que su deficiencia ha asociado con una reducción en la progresión aterosclerótica e infiltración macrófagica (86).



# **HIPÓTESIS**

## **Y**

# **OBJETIVOS**



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### HIPÓTESIS

Las ECV son la principal causa de mortalidad en nuestro medio (1). En estos últimos años se están realizando esfuerzos en encontrar nuevos marcadores que nos permitan identificar de forma precoz a aquellos pacientes que tienen un mayor riesgo de desarrollar eventos aterotrombóticos (47,87).

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio en el que se encuentran implicados numerosos tipos celulares, MMPs y citoquinas. En este sentido la activación monocitaria tiene especial relevancia tanto en el inicio como en la progresión de la placa aterosclerótica. Sin embargo, no se ha establecido con precisión si determinadas subpoblaciones monocitarias circulantes podrían asociarse con un determinado fenotipo inflamatorio de riesgo cardiovascular y con el grado de aterosclerosis subclínica.

### OBJETIVOS

El objetivo general del estudio ha sido analizar el papel de subpoblaciones monocitarias y nuevos biomarcadores en relación al riesgo de aterosclerosis subclínica y clínica.

Los objetivos concretos del estudio fueron:

1. Evaluar SDF1/CXCR4 y MMP-12 en dos modelos de ratón con distinto grado de aterosclerosis.
2. Estudiar la expresión de estos nuevos marcadores en pacientes con aterosclerosis subclínica y clínica y determinar su asociación con los factores de riesgo y parámetros clínicos.
3. Analizar en un subgrupo de pacientes las subpoblaciones monocitarias (Mon1, Mon2 y Mon3) y su relación con el grupo de riesgo establecido.
4. Determinar la influencia de la MMP-10 en la polarización de monocitos a M1 o M2 en estudios celulares de pacientes con riesgo cardiovascular.

**MATERIAL**

**Y**

**MÉTODOS**





### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### ESTUDIOS DE ATEROSCLEROSIS IN VITRO

##### I. MODELO EXPERIMENTAL DE ATEROSCLEROSIS

Se cruzaron ratones Mmp10<sup>-/-</sup> (C57Bl/6 background, cedidos por el Dr WC. Parks, University of Washington, Seattle, WA) con ratones knockout (KO) para apolipoproteína E, ApoE<sup>-/-</sup> (C57Bl/6 background, Charles River Laboratories, Wilmington, MA), para obtener ratones 2KO, ApoE<sup>-/-</sup>Mmp10<sup>-/-</sup>. Los ratones ApoE<sup>-/-</sup> y ApoE<sup>-/-</sup>Mmp10<sup>-/-</sup> (n=5/grupo) fueron alimentados con una dieta normal y mantenidos en una habitación de temperatura controlada y con ciclo noche/día de 12 horas, teniendo acceso libre al agua y alimento hasta el momento de su sacrificio a los 10 y 16 meses. Se obtuvieron las aortas y se congelaron en nitrógeno líquido para el análisis posterior de la expresión de los genes CXCR4, SDF1 y MMP-12 en dicha localización. Adicionalmente, en aortas de ratones de 6 y 12 meses (n=5 ApoE<sup>-/-</sup> y n=5 ApoE<sup>-/-</sup>Mmp10<sup>-/-</sup>) incluidas en parafina se evaluó la expresión proteica de CXCR4 y MMP-12 mediante estudio inmunohistoquímico.

La investigación se realizó de acuerdo a las guías éticas de la Comunidad Europea para el uso y cuidado de animales de laboratorio (directiva 86/609), y fue aprobada por el comité de Evaluación de Investigación Animal de la Universidad de Navarra.

#### ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LAS AORTAS DE RATÓN

Se emplearon secciones de 3µm de las aortas de ratón de 6 y 12 meses. Tras desparafinizar e hidratar, algunos estudios inmunohistoquímicos requirieron un

## Material y métodos

proceso de recuperación antigénica que consistió en la inmersión de las muestras pretratadas con la solución de recuperación antigénica (Dakocytomation, ref. S1699) durante 20 minutos a 95°C. A continuación, la solución fue templada a temperatura ambiente durante 20 minutos y las secciones fueron lavadas con tris buffer salino (TBS: Tris-HCL 0,05M, NaCl 0,5M, pH 7,36) durante cinco minutos. Para bloquear la actividad peroxidasa, se sumergieron los tejidos en una solución de metanol con 1,25% de peróxido de hidrógeno (Panreac, 141077) durante 20 minutos en oscuridad. Las secciones fueron lavadas dos veces con TBS durante 5 minutos.

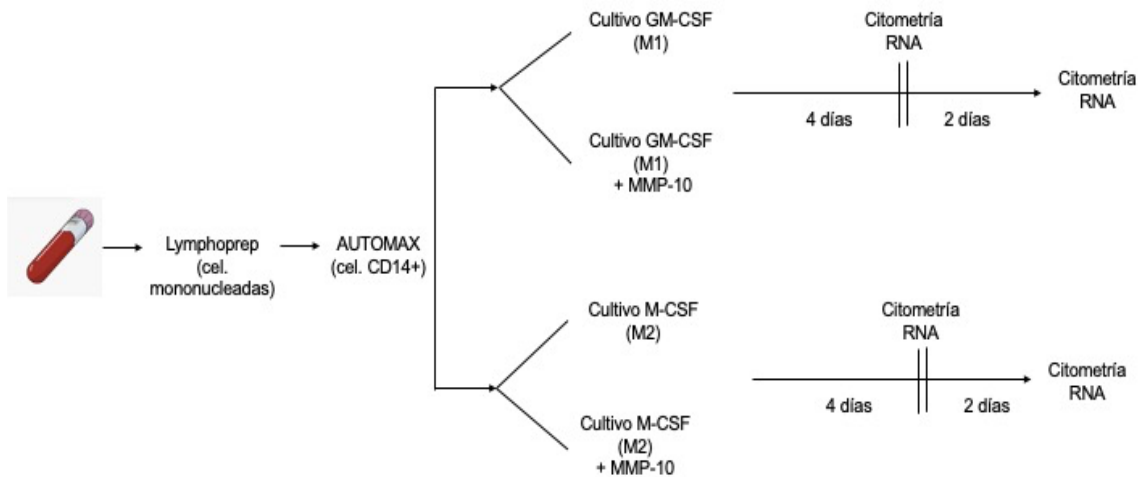
La unión inespecífica del anticuerpo primario fue evitada mediante la adición de suero normal del animal en el que se ha obtenido el anticuerpo primario, diluido 1:5 en TBS durante 45 minutos en cámara húmeda.

El anticuerpo primario fue diluido en las concentraciones adecuadas e incubado durante la noche en cámara húmeda a 4°C, se utilizaron los siguientes anticuerpos: conejo anti-MMP-12 de ratón (orb36364, Biorbyt) y conejo anti-CXCR4 de ratón (orb 74308, Biorbyt), dilución 1:100 y 1:50 respectivamente. El exceso de anticuerpo fue eliminado a las 24 horas y se lavaron las secciones con solución TBS tres veces durante 5 minutos. Se detectaron inmunocomplejos con 3,3' diaminobenzidine chromogen (DAB, Dako, ref. K3468) y la reacción se paró con agua. Tras ello, las preparaciones se montaron con medio de montaje (DPX mountant for microscopy, BDH).

Los portas se escanearon con el Aperio ImageScope (Leica ByoSistemas) y se calculó el porcentaje de área teñida respecto al área de tejido total mediante Image-J software (88).

II. CULTIVO CELULAR DE MONOCITOS Y POLARIZACIÓN MACROFÁGICA EN PRESENCIA DE MMP-10

Se realizó un estudio de activación celular y expresión de marcadores inflamatorios en nueve voluntarios sanos sin patología cardiovascular previa con el objetivo de determinar la influencia de la MMP-10 en la polarización de monocitos a M1 o M2 ( figura 8).



**Figura 8. Esquema de trabajo de cultivos monocitarios.**

Para ello se tomaron 40 mL de sangre de voluntarios sanos en 4 tubos de 10mL con quelante heparina litio, siendo procesado inmediatamente después de la extracción. Se realizó la separación de células mononucleadas (monocitos y linfocitos) mediante Lymphoprep 1,077g/mL (Axis Shield). Para dicha separación se añadió 40 mL de sangre diluida (1:1 con suero fisiológico a temperatura ambiente) a 10mL de solución de separación (lymphoprep) en proporción 4:1 y se realizó una centrifugación 25 minutos a 2000 rpm sin freno a 20°C. Tras ello se extrajo el halo de leucocitos y se lavaron en 50mL de solución tamponada con fosfato (Phosphate Buffer Solution, PBS, Oxoid). El pellet obtenido se resuspendió en medio de cultivo (RPMI 1640 + 1% P/S + 1% suero fetal bovino

## Material y métodos

+ 1% Piruvato + 1% L-glutamina) y las células se contaron en la cámara de Neubauer.

Se realizó una separación de células CD14+ mediante AutoMACS (Miltenyi Biotec). Para ello, las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 20°C con freno, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en buffer de automacs (PBS + 0,5% albumina de suero bovino (BSA) + 2.5nM ácido etilendiaminotetraacético, EDTA). Por cada  $100 \times 10^6$  células mononucleadas se añadieron 500µl de dilución 1:5 de CD14 (400µl Buffer de automacs + 100µl beads CD14 (Miltenyi Biotec, Alemania), se incubó durante 15 minutos a 4°C en oscuridad. A continuación, se lavaron las células con 10mL de Buffer de automacs, a 1500 rpm, 5 minutos a 20°C y se resuspendieron en 500 µL de Buffer de autoMACS, por cada  $100 \times 10^6$  de células, (siendo necesario añadir un volumen mínimo de 500µl). Se realizó la separación mediante AutoMACS reteniendo la fracción de células CD14+. Se realizó la selección mediante el programa possel-D. La fracción positiva obtenida se completó hasta 15mL con PBS, se centrifugó a 1500 rpm, 5 minutos a 20°C, se aspiró el sobrenadante, resuspendiendo el pellet en 1mL de buffer de autoMACS y las células se contaron. La muestra obtenida se dividió en dos tubos, para diferenciar a M1 y M2 y se precipitaron por centrifugación a 1500rpm, 5 minutos a 20°C. Las células se resuspendieron en los medios de polarización correspondientes en una relación de 1.000.000/mL y se sembraron en placas de 12 pocillos (Corning, ref. 3513). El medio contenía medio RPMI 1640 (Gibco, ref. 21875), 1% piruvato de sodio (invitrogen, ref. 11360), 1% suero bovino fetal (FSB, Gibco, ref. 41966), 1% penicillin estreptomycin, 1% L-glutamina (Gibco-invitrogen, ref. 31150), con GM-CSF (1000 µg/mL) (Miltenyi Biotec, Alemania) para la polarización a M1 y M-

GCSF (10ng/mL) (Miltenyi Biotec, Alemania) para M2. A la mitad de los pocillos se les añadió MMP-10 (1µl/mL con una concentración de 0,5ug/µL) (producida, purificada y activada en nuestro laboratorio). Las células se cultivaron a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>.

A las 48 horas de la siembra se añadió 500µl de medio fresco correspondiente a cada pocillo. Al cuarto día de cultivo, la mitad de las células se extrajeron y se analizaron mediante citometría y retrotranscripción y PCR (RT-qPCR), y el resto se volvió a sembrar y se mantuvo en cultivo hasta su recogida en el sexto día de cultivo.

Para recoger los macrófagos del cultivo se añadió 1 mL/pocillo de PBS frío y se incubó la placa 10 minutos a 4°C, se repitió el proceso anterior, se comprobó al microscopio si se habían levantado todas las células, y en caso de que aún quedasen células adheridas se repitió el proceso anterior hasta que no quedó ninguna. La solución obtenida se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de PBS a 37°C. Tras contar las células se separaron 20.000 células/condición en 100µl de PBS para el estudio de citometría.

### CITOMETRÍA DE MACRÓFAGOS

Se utilizó el siguiente panel de marcadores: CD16, CD14, CD11B, CD163, CD86, HLA-DR y CD38, tabla 4. Las muestras se adquirieron en un citómetro FACS Canto II y usando el software FACSDiva (Becton Dickinson Bioscience, San José, California). Los datos fueron analizados con el software Infinicyt (Cytognos, Salamanca). Asimismo, se realizó una fotografía diaria de un pocillo/paciente/condición.

**Tabla 4. Listado de anticuerpos específicos y reactivos**

	APC-A	APC-H7-A	FITC-A	PE-A	PE-Cy7-A	PerCP-Cy5-5-A	V450-A
<b>Macrófago</b>	CD11b	CD14	CD38	CD86	CD16	HLA-DR	CD163

En el análisis por citometría se seleccionó inicialmente la población de células correspondientes a monocitos tras enfrentar tamaño y complejidad (SSC y FSC). A continuación, se analizó la intensidad de inmunofluorescencia (MFI) de cada marcador y condición (M1 con/sin MMP-10 y M2 con/sin MMP-10 a los 4 y seis días de cultivo). A partir de datos procedentes de la literatura y estudios previos sobre polarización del laboratorio de citometría se consideraron marcadores de M1 CD11b, y de M2 CD163, CD16, CD16, HLA-DR y CD86 (25,89,90).

#### ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Se utilizaron muestras de aorta y de células en solución de homogenización (4µl de 1-Tioglicerol + 196µl Solución de homogeneización / muestra).

Se extrajo el RNA usando RNA MagMAX-96 Total RNA Isolation Kit (ThermoFisher), se cuantificó (Nanodrop) y 1 µg se retrotranscribió utilizando el Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV, Invitrogen; ref. 28025-013). A cada muestra se le añadió una mezcla que contenía 4 µl de first strand buffer 5X (Invitrogen, ref. Y02321), 0,2 µl de random primers (Invitrogen, ref. 58875), 2 µl de 10 mM dNTPs mix (dGTP, dCTP, dATP, dTTP, Invitrogen, ref. 10297018), 2 µl de ditioneitol (DTT, Invitrogen ref. Y00147), 0,5 µl de inhibidor de ribonucleasa (Invitrogen, ref. 10777019) y 1 µl de M-MLV transcriptasa reversa, con un volumen final de 20 µl. Las muestras se calentaron a 37 °C durante 60 minutos, y se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos en un termociclador (VIA 7, Applied Biosystems).

## Material y métodos

A continuación, se realizó el análisis de la expresión de genes mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR). La reacción se realizó en un volumen total de 20 µl que contenía: 50 ng de cDNA, 1 µl del ensayo a estudio (Integrated DNA Technologies, IDT), 10 µl de TaqMan™ Fast Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems, ref. 4352042) y H<sub>2</sub>O ultrapura hasta completar el volumen. La reacción se realizó en un VIIA-7 sequence detector (ThermoFisher).

En las muestras de aorta se utilizaron ensayos de expresión génica con sondas TaqMan (IDT) para SDF1 murino (Mm.PT.58.32677664), CXCR4 (Mm.PT.58.41597935), y MMP-12 (Mm.PT.58.31615472). La β-actina murina (Mm.PT.39a.22214843.g) se utilizó para normalizar los resultados.

Por su parte, en las muestras de macrófagos se analizaron las diferencias en la expresión de genes asociados a macrófagos tipo 1 (HsIP10) y macrófagos tipo 2 (MRC1) mediante qPCR. Se utilizaron la gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa GAPDH (GAPDH, Hs.PT.39a.22214836, IDT) y HPRT1 (Ha.PT.58.456221572, IDT) como controles endógenos. La relación de genes estudiados se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5. Assays *on-demand* usados en la qPCR a tiempo real.**

	Nombre del gen	Símbolo	Referencia IDT
<b>Homo Sapiens</b>	C-X-C motif chemokine ligand 10	HsIP10	Hs.PT.58.39328322.gs
	C-type mannose receptor 1	MRC1	Hs.PT.58.15093573
	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HPRT1	Ha.PT.58v.456221572
	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	Hs.PT.39a.22214836
<b>Ratón</b>	Stromal derived factor 1	SDF1	Mm.PT.58.32677664
	C-X-C motif Chemokine Receptor 4	CXCR-4	Mm.PT.58.41597935
	Matrix metalloproteinase 12	MMP-12	Mm.PT.58.31615472
	β-actina	ACTB	Mm.PT.39a.22214843.g

## ESTUDIO CLÍNICO

Previo a su inclusión, todos los pacientes fueron informados sobre los objetivos del estudio y firmaron un documento de consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de la Clínica Universidad de Navarra (2017/240). El presente estudio fue diseñado conforme con la declaración de Helsinki.

## CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES

Se incluyeron en el estudio de forma prospectiva, entre abril 2016 y junio 2019 los pacientes (n=298) con 2 o más factores de riesgo cardiovascular o aterosclerosis clínica o subclínica con o sin eventos aterotrombóticos previos procedentes de las consultas de Medicina Interna de la Clínica Universidad de Navarra (CUN) y del Servicio de Medicina Interna del Complejo Hospitalario de Navarra (CHN), y pacientes del Área de Medicina Vasculat y Medicina del Trabajo de la CUN. Los pacientes fueron divididos en tres grupos:



- GRUPO 1. Asintomáticos con dos o más factores de riesgo cardiovascular según la escala de riesgo SCORE. Se definieron los siguientes factores de riesgo cardiovascular:
  - Hipertensión: presión sistólica >140 mmHg o diastólica >90mmHg o en tratamiento antihipertensivo.
  - Diabetes mellitus: definido por alteración en curva glicémica o toma de antidiabéticos orales o uso de insulina
  - Dislipemia: colesterol total >200mg/dl, C-LDL >130mg/dl y colesterol no-HDL >160mg/dl, presencia de hipertrigliceridemia (triglicéridos >150mg/dl) o toma de hipolipemiantes.
  - Obesidad: índice de masa corporal >30 (IMC) o perímetro abdominal en mujeres >80mm y hombres>94mm.
  - Fumador: hábito tabáquico activo en los últimos 6 meses.
- GRUPO 2. Pacientes asintomáticos a los que se ha detectado patología vascular por ecografía en alguno de los siguientes territorios: carótida, aorta abdominal o femoral (mediante dispositivo Siemens S2000 y S3000, Alemania) o por presencia de microalbuminuria.
- GRUPO 3. Pacientes con manifestaciones clínicas de enfermedad cardiovascular que hubieran tenido lugar al menos un año antes de la inclusión en el estudio: IAM /angina, accidente cerebrovascular (ACV) o accidente isquémico transitorio (AIT), EAP y enfermedad renal crónica secundaria a nefroangioesclerosis o diabetes mellitus estadio 3 o mayor (MDRD < 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>).

Como criterios de exclusión se establecieron ser menor de 45 años, tener una enfermedad tumoral activa, enfermedad inflamatoria aguda o crónica de

cualquier etiología y haber recibido tratamiento con AINEs o esteroides en las dos semanas previas a la extracción analítica.

Se realizó una recogida de datos de la historia clínica: patologías previas (ACV, CAD, EAP e insuficiencia renal), factores de riesgo cardiovascular (hipertensión, dislipemia, diabetes mellitus y tabaquismo) y antecedentes familiares; exploración física con toma de presión arterial y frecuencia cardiaca, peso, altura y perímetro abdominal. Se calculó el IMC según la siguiente fórmula:  $IMC = \text{peso (Kg)} / \text{talla (m}^2\text{)}$ . Asimismo, se realizó una encuesta de adhesión a dieta mediterránea y se calculó la escala PREDIMED (PREvencion con Dieta MEDiterranea) (84).

Finalmente se determinó la presencia de placas ateroscleróticas por ecografía carotídea, abdominal y femoral y medición del espesor íntima-media carotídeo mediante ecografía de alta resolución en modo B (Siemens ACUSON S2000 y S3000, Siemens Healthcare, Alemania). Utilizándose un transductor de frecuencia de 4-9 MHz.

### DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Se tomaron muestras de sangre mediante venopunción tras ayunas de al menos 8 horas: 10 mL en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 5 mL en citrato y 5 mL en suero para la determinación de marcadores de riesgo vascular, así como marcadores inflamatorios. Dichas muestras fueron procesadas y almacenadas en el Biobanco Universidad de Navarra.

### DETERMINACIÓN DE MMP-12 Y SDF1

Ambas determinaciones se realizaron en muestras de plasma EDTA doble centrifugado mediante técnica ELISA con el sistema automático Triturus (Grifols, España). Para la MMP-12 (MMP12; LSBIO, lifespan Bioscience, EEUU) la muestra se diluyó 1:300 y para el SDF-1 (R&D systems, UK) se diluyó 1:1. La densidad óptica se determinó a 450nm usando una corrección de longitud de onda de 540nm, los resultados se expresaron en ng/mL. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron 10,3% y <7,3% respectivamente, con un límite de detección inferior de 0,156 ng/mL para la MMP-12. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron 3,6% y <4,7% respectivamente, con un límite de detección inferior de 0,018 ng/mL para el SDF-1.

### OTRAS DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Se realizaron las determinaciones analíticas rutinarias de colesterol total, colesterol-HDL, triglicéridos y glucosa mediante la técnica de rutina (Cobas 8000, Roche diagnostics, Alemania). El colesterol-LDL se calculó a través de la fórmula de Friedewald, teniendo en cuenta los valores de triglicéridos, colesterol total y colesterol-HDL; siempre que los valores de triglicéridos no fueron superiores a 400mg/dl. La creatinina se cuantificó mediante el método colorimétrico (Cobas 8000, Roche diagnostics, Alemania). La albumina en orina se calculó sobre muestra de orina de una micción con ensayo con método turbidimétrico (Roche diagnostics, Alemania).

La proteína C reactiva de alta sensibilidad se obtuvo mediante ensayo turbidimétrico (Cobas 8000, Roche diagnostics, Alemania). El fibrinógeno

plasmático se midió mediante ensayo coagulativo (tiempo de Clauss mecánico) con el autoanalizador STA-Compact (Stago, Francia).

### SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES

En febrero 2021 se revisaron las historias clínicas de todos los pacientes para evaluar el desarrollo de recurrencias o nuevos eventos cardiovasculares, así como la mortalidad.

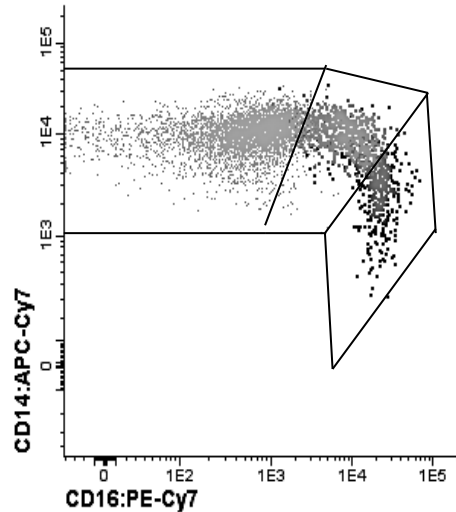
### DETERMINACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES MONOCITARIAS

#### POR CITOMETRÍA DE FLUJO

En un subgrupo de 102 pacientes consecutivos se realizó la caracterización de las subpoblaciones monocitarias mediante citometría de flujo en una muestra de sangre periférica fresca anticoagulada en EDTA (ver detalles en apartado citometría de macrófagos). En el trabajo se utilizó la clasificación establecida en el documento de consenso de la European Society of Cardiology (5) empleando un panel de anticuerpos comunes a las células presentadoras de antígeno (HLADR), otros específicos frente al compartimento monocito/macrófago (CD14, CD16, CD80, CD163, CD300e, SLAN) así como el receptor 4 de quimiocinas (CXCR4) tabla 6. Los monocitos clásicos (Mon1) se caracterizaban por ser CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>CD300e<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup>, los intermedios (Mon2) por ser CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD300e<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup>, y los no clásicos (Mon3) eran CD14<sup>lo</sup>CD16<sup>++</sup>CD300e<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup>, como se observa en la figura 9.

**Tabla 6.** Panel de anticuerpos específicos frente a monocitos.

	BV421	BV510	FIT	PE	PerCPCy5.5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7	APCH7
<b>Mon</b>	CD163	CD80	CD16	SLAN	HLADR	CXCR4	CD300e	CD14	MMP-10



**Figura 9.** Caracterización de las subpoblaciones monocitarias según marcadores CD14 y CD16.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la normalidad de la distribución de los parámetros investigados. Se realizó transformación logarítmica en aquellas variables que fue posible para normalizar su distribución. Las variables continuas paramétricas se expresaron como media y desviación estándar y aquellas con una distribución no paramétrica mediante la mediana y rango intercuartílico.

En aquellos casos en los que se trataba de parámetros que seguían una distribución normal se utilizó el test de t-Student para la comparación entre dos grupos o el ANOVA de un factor para la comparación de las variables en el caso de que hubiera más de dos grupos, realizándose el test post hoc (Bonferroni y Scheffé) en aquellas variables con diferencias estadísticamente significativas. En aquellos que no seguían dicha distribución se utilizó en la comparación entre dos

grupos el test de la U-Mann-Whitney o si había más de tres grupos el de Kruskal Wallis. La  $X^2$  de Pearson se utilizó para comparar la distribución de frecuencias en variables cuantitativas.

Se valoró la asociación entre la presencia de eventos, subtipos de eventos recogidos y la presencia de placa aterosclerótica con los parámetros inflamatorios estudiados, de forma cruda y por grupos; se realizó un ajuste multivariante incluyendo edad, sexo y factores de riesgo cardiovascular conocidos (hipertensión, diabetes, dislipemia, obesidad, tabaquismo y consumo de alcohol), mostrando los resultados de forma cruda y ajustada.

Mediante "Receiver Operating characteristic" (ROC) se comprobó si estas variables, de forma independiente y en grupo, eran capaces de mejorar la predicción de la prevalencia de ECV frente a los factores de riesgo tradicionales. Los mejores puntos de corte se determinaron mediante el índice Youden (sensibilidad – (1 – especificidad)) para la curva ROC. El tiempo al evento se mostró mediante curvas de Kaplan-Meier estableciéndose la significación estadística mediante regresión de Cox, ajustándose por edad y sexo.

Por otro lado, se calculó la media ajustada por edad y sexo mediante ANCOVA para la diferencia del porcentaje de monocitos según el grupo. Además, se calculó la correlación de Pearson para determinar la asociación entre variables numéricas continuas.

Se considerarán como significativas todas aquellas diferencias con  $p < 0,05$ .

Se realizaron los estudios estadísticos en programa STATA (versión 12; StataCorp LP, EEUU)

# RESULTADOS





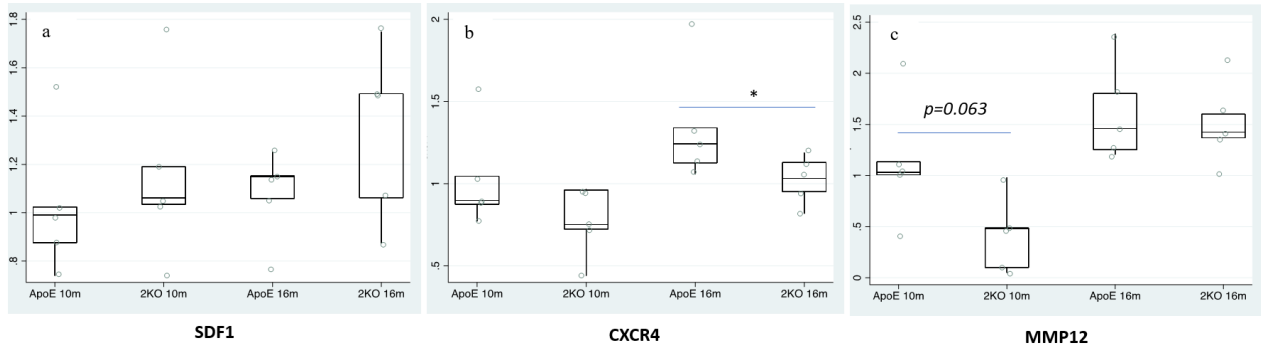
## 4. RESULTADOS

Se realizó un estudio experimental en ratones con diferentes grados de aterosclerosis y un estudio clínico con pacientes con aterosclerosis subclínica y clínica.

### **AUMENTO DE CXCR4 EN RATONES APOE-/- RESPECTO A RATONES APOE-/-MMP10-/-**

Datos previos de nuestro grupo mostraron que el modelo de ratón ApoE-/- Mmp10-/- presentaba una menor infiltración macrofágica y una menor calcificación de la placa aterosclerótica, resaltando así el papel de dicha metaloproteasa en la progresión de la placa aterosclerótica y el desarrollo de enfermedad cardiovascular (39).

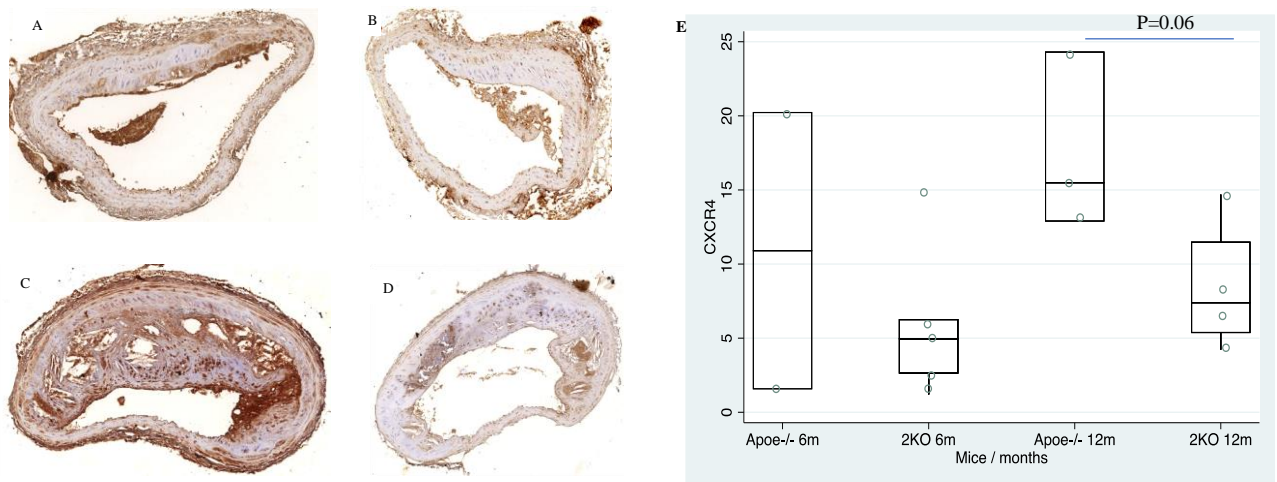
Para establecer si había diferencias en el eje SDF1/CXCR4 y MMP-12 asociadas a la progresión aterosclerótica, analizamos su expresión génica en la aorta de ratones ApoE-/- y ApoE-/-Mmp10-/- . Observamos que la expresión de CXCR4 tendía a aumentar, en los ratones ApoE-/- a los 16 meses respecto a los 2KO ( $1,4\pm 0,4$  vs  $1,0\pm 0,1$ ,  $p=0,063$ ), sin presentar diferencias a los 10 meses. En la expresión de SDF-1 no se encontraron diferencias en ninguno de los tiempos analizados entre los ratones ApoE-/- y ApoE-/-Mmp10-/- . Finalmente, la expresión de la MMP-12, se encontró significativamente aumentada a los 10 meses ( $1,1\pm 0,6$  vs  $0,4\pm 0,3$ ,  $p=0,05$ ) en los ApoE en relación a los 2KO, si bien estas diferencias desaparecían a los 16 meses ( $1,5\pm 0,4$  vs  $1,6\pm 0,5$ ) (figura 10).



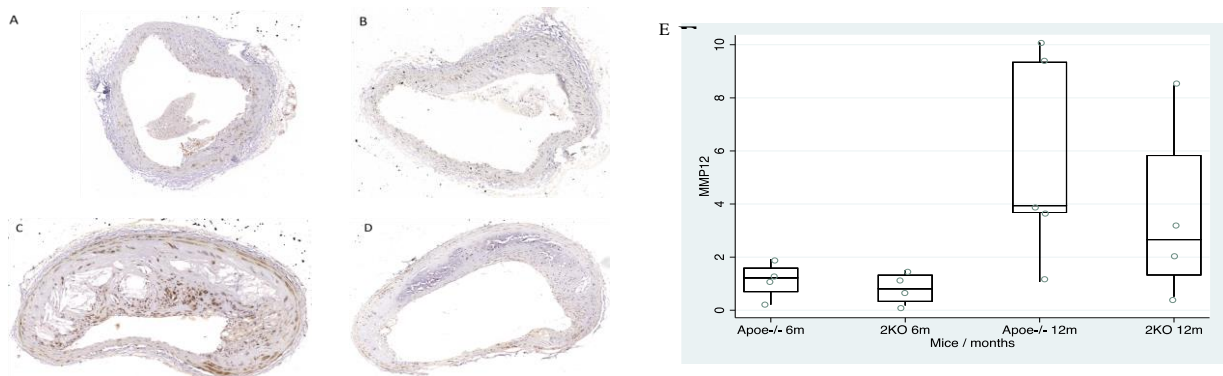
**Figura 10. Expresión de SDF1, CXCR4 y MMP-12 en la aorta de ratones ApoE<sup>-/-</sup> y 2KO (ApoE<sup>-/-</sup>Mmp10<sup>-/-</sup>) a 10 y 16 meses. a) SDF1, b) CXCR4, c) MMP-12.**

A continuación, se analizó la expresión proteica de CXCR4 y MMP-12 en las lesiones ateroscleróticas en aorta de ratones ApoE<sup>-/-</sup> y 2KO a 6 y 12 meses. Se evidenció que los ratones ApoE<sup>-/-</sup> de 12 meses presentaban un porcentaje de área teñida mayor para CXCR4 y MMP-12 respecto a los de 6 meses, si bien las diferencias fueron únicamente significativas para MMP-12 en los ratones ApoE<sup>-/-</sup> (0,85±0,8 vs 5,7±4, p=0,05).

Por su parte, al comparar ambos fenotipos (figuras 11 y 12) se observó que, de forma general, los ratones ApoE<sup>-/-</sup> el porcentaje de área teñida para ambas proteínas era mayor que los 2KO, si bien únicamente tendió a la significación el incremento de expresión de CXCR4 a los 12 meses en ApoE<sup>-/-</sup> respecto a 2KO (17,6±6 vs 8,4±4,5; p=0,067) (figura 11). Todo ello sugiere que hay una tendencia a una mayor expresión vascular de CXCR4 y MMP-12 en ratones con mayor grado de aterosclerosis (ApoE<sup>-/-</sup>) respecto a ratones 2KO.



**Figura 11. Expresión de CXCR4 en placas de aterosclerosis en aorta murina.** Expresión de CXCR4 en ratones ApoE-/- (A) y ratones 2KO (B) a 6 meses. Expresión de CXCR4 en ratones ApoE-/- (C) y ratones 2KO (D) a 12 meses. E) Box plot que muestra la cuantificación de la expresión de CXCR4 en placas de aterosclerosis.



**Figura 12. Expresión de MMP-12 en placas de aterosclerosis en aorta murina.** Expresión de MMP-12 en ratones ApoE-/- (A) y ratones 2KO (B) a 6 meses. Expresión de MMP-12 en ratones ApoE-/- (C) y ratones 2KO (D) a 12 meses. E) Box plot que muestra la cuantificación de la expresión de MMP-12 en placas ateroscleróticas.

### **PAPEL DE LA MMP-10 EN LA POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS**

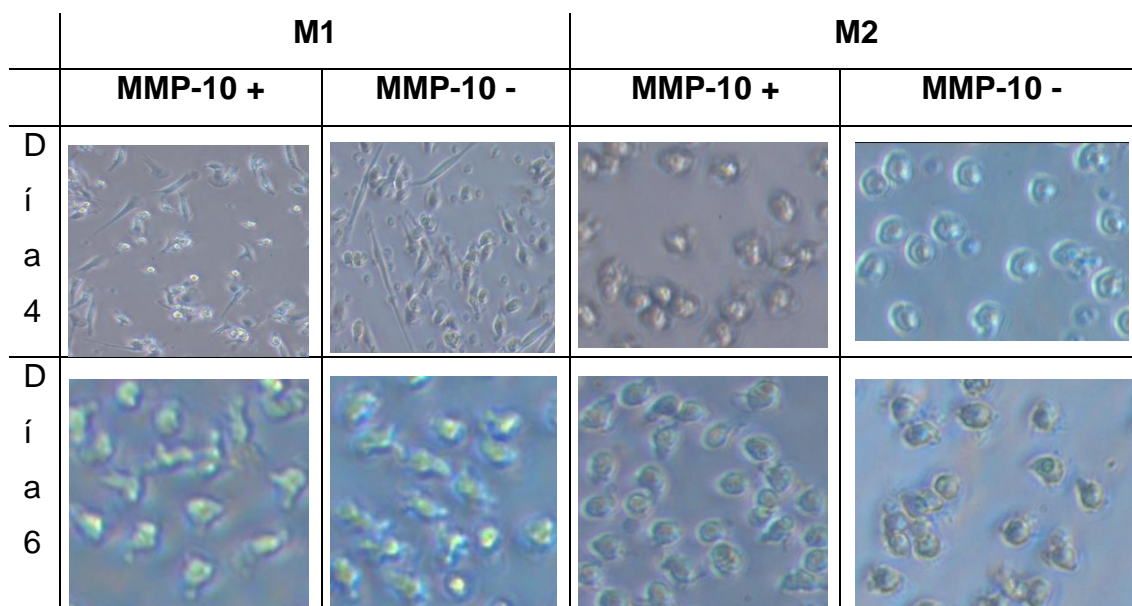
Se evaluó el papel de la MMP-10 en la polarización de los macrófagos dado los datos previos de nuestro grupo que demostraban, el papel de la MMP-10 en la infiltración macrofágica y calcificación de la placa ateromatosa en un modelo experimental de aterosclerosis.

Se realizaron cultivos de monocitos de sangre de sujetos sanos (n=9) que se polarizaron a M1 y M2 en presencia y ausencia de MMP-10. Se estudió la polarización por citometría de flujo y mediante estudios transcripcionales.

En el análisis de los resultados por citometría, se excluyeron las muestras correspondientes a uno de los sujetos por presentar una variabilidad >50% respecto al resto de valores, por lo que se analizaron las muestras correspondientes a 8 sujetos.

Observamos una adecuada polarización macrofágica a M1 y M2 en los cultivos monocitarios de sujetos sanos tras estimulación con M-CSF y GM-CSF, tanto con los marcadores de expresión génica, HsIP10 (M1) y MRC1 (M2) como mediante citometría.

A nivel morfológico, los macrófagos polarizados a partir de M-CSF (M1) presentaban un aspecto de huso y los polarizados a partir de GM-CSF (M2) presentaban un aspecto más redondeado (figura 13). Dichas características parecían perderse con los días de cultivo.



**Figura 13. Cambios morfológicos en la polarización de M1/M2 en presencia o ausencia de MMP-10+/- a los 4 y 6 días de cultivo.**

Como se muestra en la tabla 7, hubo un aumento significativo de la expresión de HsIP10 en los macrófagos M1 al sexto día de cultivo y del receptor de la manosa MRC1 en los macrófagos M2. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la expresión de HsIP10 ni de MCR1 en relación a la presencia de MMP-10.

**Tabla 7.** Diferencias en la expresión de HsIP10 (M1) y MRC1 (M2) a los 4 y 6 días de cultivo.

	Día 4		Día 6	
	MMP-10-	MMP-10+	MMP-10-	MMP-10+
<b>M1</b>	1	0,88	1,99 <sup>&amp;</sup>	2,74
<b>M2</b>	1	1,49	2,41 <sup>&amp;</sup>	2,44 <sup>*</sup>

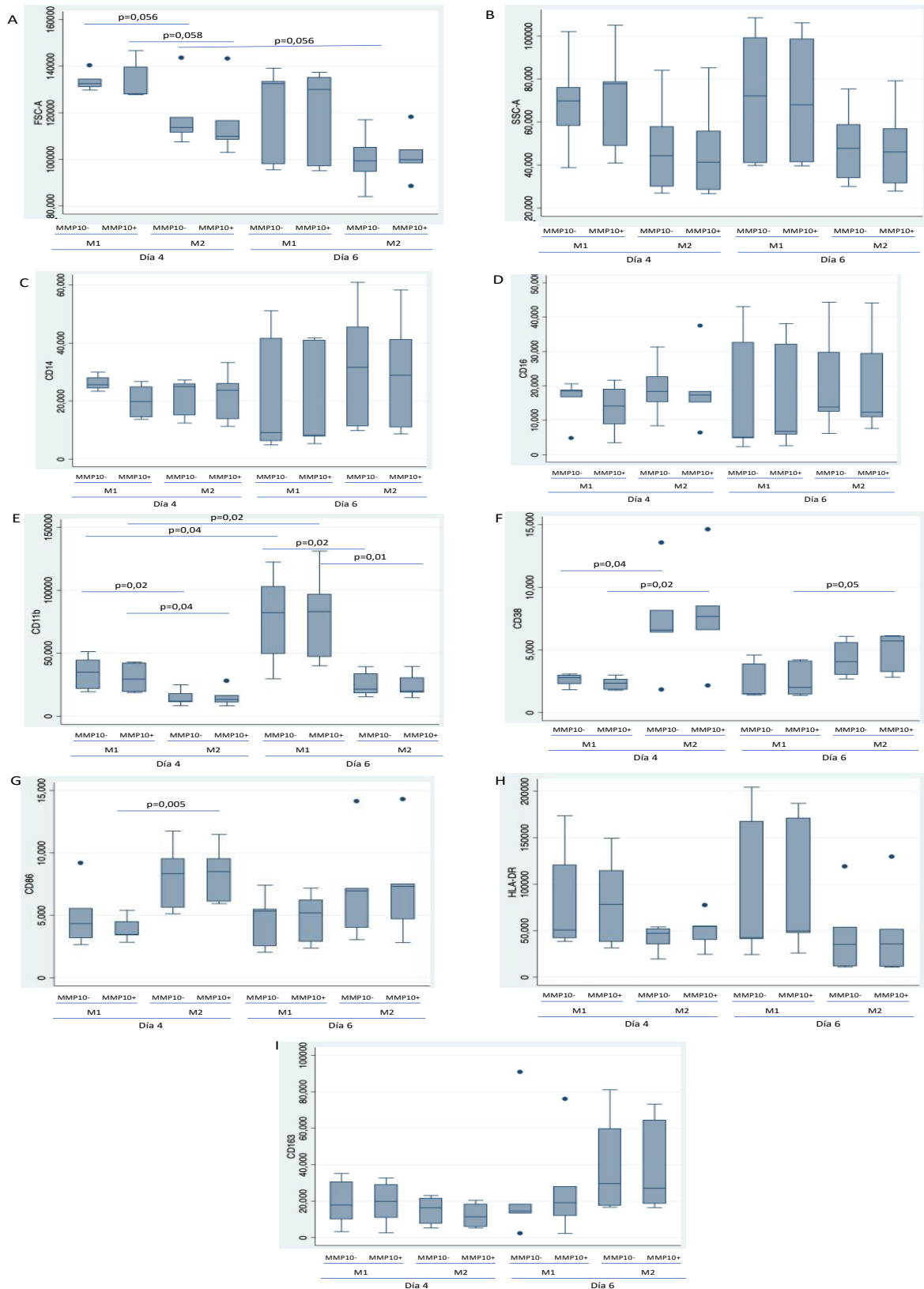
<sup>&</sup>P=0,068 en MMP-10- día 4 vs día 6, <sup>\*</sup>p<0,05 en MMP-10+ día 4 vs día 6.

Mediante citometría de flujo confirmamos la correcta polarización de los macrófagos siendo los M1 los que presentaron mayor tamaño (figura 14A) y complejidad (figura 14B). Asimismo, observamos que los macrófagos M1

mostraban una mayor intensidad de fluorescencia (MFI) de CD11b respecto a los M2 tanto a día 4 como a día 6 (figura 14E) que fue independiente de la presencia/ausencia de MMP-10. Por su parte los macrófagos M2 mostraron una mayor MFI de CD38 que los M1 a los 4 días independientemente de que estuvieran tratados o no con la MMP-10, si bien a los 6 días solo fue mayor en los M2 tratados con MMP-10 (figura 14F). Asimismo, los macrófagos M2 presentaron una mayor MFI de CD86 que los M1 pero únicamente en los tratados con MMP-10 a día 4 (figura 14G).

Finalmente, no encontramos diferencias en la MFI de CD14, CD16, HLA-DR y CD163 entre los macrófagos M1 y M2 (figura 14, paneles C, D, H e I).

Todos estos datos sugieren que la MMP-10 permite una correcta polarización de los macrófagos, si bien el tratamiento con la MMP-10 podría mejorar y mantener en el tiempo la polarización a M2.



**Figura 14. Diferencias de la expresión de marcadores de superficie según el subtipo de macrófago y la presencia de MMP-10. El eje Y representa la MFI. A) Tamaño, B) Complejidad, C) CD14, D) CD16, E) CD11b, F) CD38, G) CD86, H) HLA-DR, I) CD163.**

### **ESTUDIO CLÍNICO DE UNA COHORTE DE PACIENTES CON RIESGO CARDIOVASCULAR**

Se incluyeron un total de 298 pacientes con una mediana de edad de 66 años (59-76 años), 70,8% varones. En cuanto a los factores de riesgo un 72% eran hipertensos, un 40% diabéticos (DM), un 82% dislipémicos y un 16% fumadores actuales. En la tabla 8 se resumen las características de todos los pacientes y clasificados según los grupos de riesgo establecidos. Todos los factores de riesgo se encontraban representados de forma diferente según los grupos de riesgo, excepto el tabaquismo. La hipertensión y diabetes fueron más prevalentes en el grupo 3 respecto al grupo 1 y 2; por su parte, los pacientes de grupo 1 presentaban menos dislipemia que los pacientes de grupo 2 y 3. 120 de los 298 (40,3%) pacientes habían presentado un evento cardiovascular previo, de los cuales un 11% EAP, 23% nefropatía (según los criterios establecidos), 20% IAM/angina y un 11% ACV/AIT. Debemos remarcar que aquellos pacientes de grupo 3 presentaban menores niveles de colesterol-LDL dado que se encontraban bajo tratamiento hipolipemiante de acuerdo a las guías clínicas de riesgo cardiovascular. Asimismo, este grupo de pacientes presentaban niveles más elevados de creatinina.

En cuanto a los parámetros de estilo de vida, como el consumo de tabaco o adhesión a la dieta mediterránea (escala PREDIMED) no se observaron diferencias entre dichos grupos. La prevalencia de alcoholismo era superior en los pacientes del grupo 2 respecto al grupo 3.



**Tabla 8.** Características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio según el grupo de riesgo establecido en la clasificación.

	Grupo 1 (n=41)	Grupo 2 (n=137)	Grupo 3 (n=120)	Total (%) (n=298) ANOVA
Sexo (varón, %)	21 (51,2)	102 (74,5)	88 (73,3)	211 (70,8) *
Edad (años)	57 (53-65)	63 (58-69)	74 (68-82)	66 (59-76) ¶, †
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	26,5 (24,4-29,1)	28,6 (26,4-32)	28,6 (26,4-32,3)	28,4 (26 – 31,6) ¶
Perímetro abdominal (cm)	99 ± 12,5	103 ± 11,5	105 ± 11,5	103 ± 12 ¶
Hipertensión (n,%)	25 (62,5)	92 (67,2)	98 (81,7)	215 (72,4) ¶, †
Diabetes (n,%)	5 (12,5)	41 (30)	73 (60,8)	119 (40,1) *, ¶, †
Dislipemia (n,%)	25 (64,1)	111 (81)	106 (88,3)	242 (81,8) *, ¶,
Presión sistólica (mmHg)	135 ± 20	136 ± 17	137 ± 20	136 ± 19
Presión diastólica (mmHg)	83 ± 11	84 ± 10	72 ± 16	79 ± 14 ¶, †
Glucosa (mg/dL)	98 (92-105)	102 (95-114)	109 (96-146)	103 (94-117) ¶, †
HbA1c (%)	5,6 (5,3-5,9)	5,7 (5,5-5,9)	6 (5,5-6,8)	5,7 (5,5-6,3) ¶, †
Colesterol (mg/dL)	185 (159-204)	184 (158-209)	154 (130-175)	168 (147-200) ¶, †¶
C-HDL (mg/dL)	63,5 (47,2-73)	55,5 (44-67)	45 (36,5-56)	51 (41-63,5) ¶, †
C-LDL (mg/dL)	106 (81-142)	107 (80-132)	79 (59-99)	91 (71 - 120) ¶, †
Triglicéridos (mg/dL)	88 (62-114)	108 (77-139)	110 (81-193)	106 (75-143) ¶, †
Creatinina (mg/dL)	0,9 (0,8-1)	0,9 (0,8-1)	1,2 (0,9-1,5)	1 (0,8-1,1) ¶, †
Tabaco (n,%)	7 (17)	25 (18,3)	15 (12,5)	47 (15,8)
Alcohol (n,%)	6 (14,6)	32 (23,4)	14 (11,7)	52 (17,5) †
PREDIMED score	9 (8-10)	9 (7-11)	8 (7-10)	9 (7-10)
EAP (n,%)	0	0	33 (27,5)	33 (11,1)
Nefropatía (n,%)	0	0	68 (56,7)	68 (22,9)
IAM (n,%)	0	0	58 (48,3)	58 (19,5)
ACV (n,%)	0	0	34 (28,3)	34 (11,4)

Variables paramétricas se muestran en forma de media ± desviación típica, las variables no paramétricas en forma de mediana (rango intercuartílico) y las variables cualitativas en forma de número (%). \* diferencias entre grupo 1 y 2, ¶diferencias entre grupo 1 y 3, †diferencias entre 2 y 3

IMC: índice de masa corporal, HbA1c: Hemoglobina glicosilada, C-HDL: colesterol lipoproteínas de alta densidad, C-LDL: colesterol lipoproteínas de baja densidad, PREDIMED: PREvención con Dieta MEDiterranea. EAP: enfermedad arterial periférica, IAM: infarto agudo de miocardio, ACV: accidente cerebro vascular

SDF1, MMP-12 Y PCR COMO MARCADORES DE RIESGOCARDIOVASCULAR

## AUMENTO DE SDF1, MMP-12 Y PCR SEGÚN EL GRUPO DE RIESGO

## CARDIOVASCULAR.

Se analizaron los marcadores SDF1, MMP-12 y PCR en relación a los grupos de riesgo establecidos en el estudio.

SDF1 y MMP-12 presentaron niveles progresivamente aumentados de acuerdo al grupo de riesgo, estando aumentados de forma significativa en el grupo 3 respecto al 1 ( $p=0,004$  y  $p=0,019$  respectivamente) y al grupo 2 ( $p<0,001$  y  $p=0,009$  respectivamente) (tabla 9).

**Tabla 9.** Diferencias de los biomarcadores según grupos de riesgo establecidos.

	Grupo 1 (n=36)	Grupo 2 (n=141)	Grupo 3 (n=120)	Total (%) (n=298)
<b>SDF1 (ng/mL)</b>	2,3 ± 0,66	2,3 ± 0,44	2,72 ± 0,94	2,5 ± 0,74 <sup>¶, †</sup>
<b>MMP-12 (pg/mL)</b>	375 (225-555)	357 (246-552)	501 (282-768)	411 (243-657) <sup>¶, †</sup>
<b>PCR (mg/dL)</b>	0,09 (0,06-0,18)	0,14 (0,07-0,33)	0,24 (0,13-1)	0,18 (0,08-0,4) <sup>¶, †</sup>

SDF1: factor derivado del estroma 1, MMP-12: metaloproteasa de matriz 12, PCR: proteína C reactiva. Variables paramétricas se muestran en forma de media ± desviación standard, las variables no paramétricas en forma de mediana (rango intercuartílico). \* diferencias entre grupo 1 y 2, <sup>¶</sup>diferencias entre grupo 1 y 3, <sup>†</sup>diferencias entre 2 y 3

Tras ajustar por edad y sexo, SDF1 y MMP-12 permanecían elevados en el grupo 3 respecto al 2 ( $p=0,01$  y  $p=0,014$  respectivamente). Por su parte PCR estaba aumentada en el grupo 3 en comparación con los otros dos grupos de estudio (vs grupo 1  $p= 0,002$  y vs grupo 2  $p<0,001$ ).

Estos resultados indican que SDF1, MMP-12 y PCR se encuentran elevados en pacientes con un evento cardiovascular previo (grupo 3) en comparación con aquellos aterosclerosis subclínica (grupo 2).

### ASOCIACIÓN DE BIOMARCADORES INFLAMATORIOS Y FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR.

Encontramos varias asociaciones entre los biomarcadores estudiados y los factores clásicos de riesgo cardiovascular. Se evidenció una asociación del SDF1 con la DM [OR (IC 95%)= 0,63 (0,45-0,89),  $p=0,008$ , tabla 10] y el consumo de alcohol [OR (IC95%) = 0,82 (0,39–0,97),  $p = 0,035$ ], así como de la MMP-12 con la hipertensión [OR(IC 95%)= 1,56 (1,12-2,17),  $p=0,008$ ] y DM [IC OR(95%)= 1,56 (1,13-2,15),  $p=0,007$ ]. Además, se encontraron niveles elevados de PCR en pacientes con hipertensión [OR (IC95%) = 1,22 (1,04–1,41),  $p = 0,012$ ], DM [OR(IC 95%)= 1,34 (1,17 – 1,52,  $p<0,001$ ] y dislipidemia [OR(IC 95%)= 1,4 (1,08-1,82),  $p=0.012$ , tabla 10].

**Tabla 10.** Asociación de biomarcadores inflamatorios con factores de riesgo cardiovascular en análisis univariado.

	<b>SDF1</b>	<b>MMP-12<sup>a</sup></b>	<b>PCR<sup>a</sup></b>
	<b>OR (IC95%), p</b>	<b>OR (IC95%), p</b>	<b>OR (IC95%), p</b>
<b>Hipertensión</b>	1,23 (0,85–1,76) <i>0,26</i>	1,56 (1,12–2,17) <i>0,008</i>	1,22 (1,04–1,41) <i>0,012</i>
<b>Diabetes mellitus</b>	0,63 (0,45–0,89) <i>0,008</i>	1,56 (1,13–2,15) <i>0,007</i>	1,34 (1,17–1,52) <i>&lt;0,001</i>
<b>Dislipemia</b>	0,96 (0,64–1,44) <i>0,86</i>	1,29 (0,9–1,86) <i>0,17</i>	1,4 (1,08–1,82) <i>0,012</i>
<b>Obesidad (IMC &gt; 35)</b>	0,82 (0,54–1,25) <i>0,36</i>	1,35 (0,91–2) <i>0,13</i>	1,09 (0,97–1,23) <i>0,14</i>
<b>Tabaco (Actual)</b>	0,54 (0,33–0,87) <i>0,54</i>	0,75 (0,51–1,1) <i>0,14</i>	0,9 (0,76–1,1) <i>0,29</i>
<b>Alcohol (&gt;5/semana)</b>	0,82 (0,39–0,97) <i>0,035</i>	0,84 (0,58–1,22) <i>0,37</i>	0,81 (0,67–0,98) <i>0,028</i>

<sup>a</sup> Variables transformadas logarítmicamente. IMC: índice de masa corporal, SDF1: factor derivado del estroma 1, MMP-12: Metaloproteasa de matriz 12, PCR: Proteína C-reactiva.

Por otra parte, todos los biomarcadores correlacionaban de forma positiva con la creatinina y de forma negativa con C-HDL (tabla 11). Además, encontramos una correlación entre los nuevos biomarcadores y la PCR. La PCR correlacionaba con SDF1 ( $r=0,31$ ,  $p<0,001$ ) y MMP-12 ( $r= 0,26$ ;  $p<0,001$ ). Sin embargo, no se encontró correlación entre SDF1 y MMP-12.

**Tabla 11.** Correlación de Pearson entre factores de riesgo cardiovascular y biomarcadores inflamatorios en pacientes de riesgo cardiovascular (n=298).

	PCR (mg/dL) <sup>a</sup>		SDF1 (ng/mL)		MMP-12(pg/mL) <sup>a</sup>	
	R	P	R	P	R	P
<b>Colesterol (mg/dL)</b>					0,12	0,03
<b>C-HDL (mg/dL)</b>	-0,42	<0,001	-0,17	0,003	-0,26	<0,001
<b>HbA1c (%)</b>	0,28	<0,001	-0,12	0,035	0,25	<0,001
<b>Presión diastólica (mmHg)</b>	-0,49	<0,001	0,24	<0,001	-0,17	0,004
<b>Perímetro abdominal (cm)</b>	0,14	0,024			0,16	0,008
<b>IMC</b>	0,17	0,005			0,17	0,003
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,53	<0,001	0,27	<0,001	0,26	<0,001
<b>PREDIMED</b>	-0,14	0,019	-0,013	0,024	-0,13	0,03
<b>PCR (mg/dL)<sup>a</sup></b>	-	-	0,31	<0,001	0,26	<0,001
<b>SDF1 (ng/mL)</b>			-	-	0,1	NS

<sup>a</sup> Variables transformadas logarítmicamente. SDF1: factor derivado del estroma 1, MMP-12: metaloproteasa matriz 12, PCR: proteína reactiva C. IMC: índice de masa corporal, HbA1c: Hemoglobina glicosilada, C-HDL: colesterol lipoproteínas de alta densidad, C-LDL: colesterol lipoproteínas de baja densidad, PREDIMED: PREvención con Dieta MEDiterranea. NS: no significativas

#### AUMENTO DE SDF1 Y PCR EN PACIENTES CON ATEROSCLEROSIS CLÍNICA.

Un total de 120 pacientes (40,2%) presentaron un evento cardiovascular (tabla 12). En relación a aquellos sin manifestaciones clínicas, estos pacientes eran mayores ( $p < 0,001$ ), y presentaban una mayor prevalencia de factores de riesgo cardiovascular: mayor perímetro abdominal ( $p = 0,04$ ), hipertensión ( $p = 0,003$ ), DM ( $p < 0,001$ ) y dislipemia ( $p = 0,016$ ). Además, presentaban niveles reducidos de colesterol total ( $p < 0,001$ ), C-LDL ( $p < 0,001$ ) y C-HDL ( $p < 0,001$ ), probablemente en relación con el tratamiento hipolipemiante, pero niveles

## **Resultados**

aumentados de creatinina ( $p < 0,001$ ), triglicéridos ( $p = 0,005$ ) y hemoglobina glicosilada ( $p < 0,001$ ). Por último, la adherencia a dieta mediterránea fue peor en estos pacientes ( $p = 0,05$ ).

**Tabla 12.** Características demográficas de los pacientes estudiados según la presencia de manifestaciones clínicas de aterosclerosis.

	<b>Sin clínica (n=178)</b>	<b>Con clínica (n=120)</b>	<b>p</b>
<b>Sexo (varón, %)</b>	123 (69,1)	88 (73,3)	0,43
<b>Edad (años)</b>	61 (56-68)	74 (68-82)	<0,001
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	28,7 (25,7-31,5)	28,6 (26,4-32,3)	0,39
<b>Perímetro abdominal (cm)</b>	102,2±11,8	105,1±11,5	0,04
<b>Hipertensión (n,%)</b>	117 (66)	98 (81,7)	0,003
<b>Diabetes (n,%)</b>	46 (25,8)	73 (60,8)	<0,001
<b>Dislipidemia (n,%)</b>	136 (76,4)	106 (88,3)	0,016
<b>Presión sistólica (mmHg)</b>	136±18	137±20	0,75
<b>Presión diastólica (mmHg)</b>	84±10	72±16	<0,001
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	101 (93-111)	109 (96-146)	<0,001
<b>HbA1c (%)</b>	5,6 (5,4-5,9)	6 (5,5-6,8)	<0,001
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	184 (158-207)	154 (130-175)	<0,001
<b>C-HDL (mg/dL)</b>	57 (44-68)	45 (36,5-56)	<0,001
<b>C-LDL (mg/dL)</b>	107 (80-134)	79 (59-99)	<0,001
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	100 (72-136)	110 (81-193)	0,01
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,9 (0,8-1)	1,16 (0,9-1,5)	<0,001
<b>Tabaco (n,%)</b>	32 (18)	15 (12,5)	0,2
<b>Alcohol (n,%)</b>	38 (21,3)	14 (11,9)	0,031
<b>PREDIMED score</b>	9 (7-11)	8 (7-10)	0,05
<b>SDF1 (ng/mL)</b>	2,30±0,49	2,72±0,94	<0,001
<b>MMP-12 (pg/mL)<sup>a</sup></b>	358,5 (241,5-553,5)	501 (282-768)	0,002
<b>PCR (mg/dL)<sup>a</sup></b>	0,12 (0,07-0,31)	0,24 (0,13-1)	<0,001

Variables paramétricas se muestran en forma de media ± desviación standard, las variables no paramétricas en forma de mediana (rango intercuartílico) y las variables cualitativas en forma de número (%). <sup>a</sup>Variables transformadas logarítmicamente. SDF1: factor derivado del estroma 1, MMP-12: metaloproteasa matriz 12, PCR: proteína reactiva C. IMC: índice de masa corporal, HbA1c: Hemoglobina glicosilada, C-HDL: colesterol lipoproteínas de alta densidad, C-LDL: colesterol lipoproteínas de baja densidad, PREDIMED: PREvención con Dieta MEDiterranea.

Los pacientes con manifestaciones clínicas ateroscleróticas presentaron niveles elevados de SDF1 ( $2,72 \pm 0,94$  ng/mL vs  $2,3 \pm 0,49$  ng/mL,  $p < 0,001$ ), MMP-12 (501 [282 – 768] pg/mL vs 358,5 [242 – 554] pg/mL,  $p = 0,002$ ) y PCR (0,24 [0,13 – 1] mg/dL vs 0,12 [0,07 – 0,31] mg/dL,  $p < 0,001$ ). En el estudio multivariable, solamente SDF1 [OR (IC 95%): 2,44 (1,21 - 3,94)  $p < 0,001$ ] y PCR [OR (IC 95%): 1,59 (1,28-1,98,  $p < 0,001$ )] mantenían la asociación de forma independiente a los factores de riesgo cardiovascular (tabla 13). Observamos que en el caso de la MMP-12 las diferencias se perdían al ajustar por diabetes, lo que sugiere la importancia de este factor de riesgo en los niveles circulantes de dicha metaloproteasa.

**Tabla 13.** Análisis multivariante de regresión logística para establecer la asociación de SDF1, MMP-12 y PCR con las manifestaciones clínicas ateroscleróticas.

		OR (IC 95%)	p
<b>SDF1</b>	Crudo	2,37 (1,63 – 3,46)	<0,001
	Modelo 1	1,62 (1,1 – 2,4)	0,018
	Modelo 2	2,43 (1,51 – 3,9)	<0,001
	Modelo 3	2,44 (1,21 – 3,94)	<0,001
<b>MMP-12<sup>a</sup></b>	Crudo	1,67 (1,2 – 2,32)	0,002
	Modelo 1	1,5 (1,05 – 2,16)	0,027
	Modelo 2	1,48 ( 1 – 2,18)	0,049
	Modelo 3	1,37 (0,92 – 2)	0,12
<b>PCR<sup>a</sup></b>	Crudo	1,9 (1,6 – 2,26)	<0,001
	Modelo 1	1,62 (1,33 – 1,97)	<0,001
	Modelo 2	1,6 (1,29 – 1,98)	<0,001
	Modelo 3	1,59 (1,28 – 1,98)	<0,001

SDF1: factor derivado del estroma 1, MMP-12: metaloproteasa de matriz 12, PCR: proteína reactiva C. a Variables transformadas logarítmicamente.

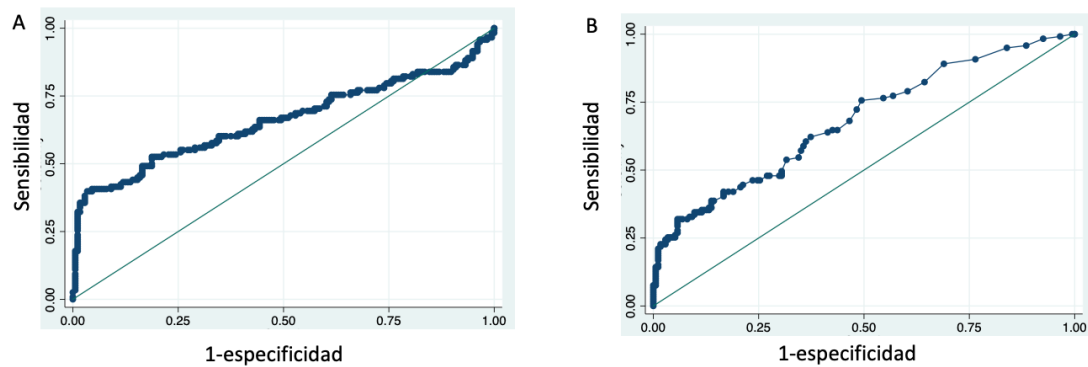
Modelo 1 incluye edad y sexo

Modelo 2 incluye edad, sexo, hipertensión, dislipemia, diabetes, perímetro abdominal

Modelo 3 incluye edad, sexo, hipertensión, dislipemia, diabetes, perímetro abdominal, tabaquismo y alcohol.



En base a estos resultados, se realizó una curva ROC observando un AUC de  $0,66 \pm 0,04$  (IC 95%: 0,59-0,73,  $p < 0,001$ ) para SDF1 y AUC de  $0,68 \pm 0,03$  (IC 95%: 0,62-0,73,  $p < 0,001$ ) para PCR (figura 15).



**Figura 15. Curvas ROC de SDF1 y PCR con la presencia de aterosclerosis clínica.** A. Curva ROC de SDF1 y manifestaciones ateroscleróticas. B. Curva ROC de PCR y manifestaciones ateroscleróticas.

La curva ROC de SDF1 y manifestaciones ateroscleróticas mejoraba significativamente tras añadir la PCR al modelo, presentando un AUC  $0.70 \pm 0.03$  (95%CI: 0.63-0.7;  $p=0.05$ ). Se utilizaron como puntos de corte para SDF1 y PCR (2,46ng/mL y 0,24mg/dL, respectivamente) mostrando una sensibilidad de 60,2% y especificidad de 65,3% para SDF1, y una sensibilidad de 63,9% y especificidad de 68,2% para PCR. Los pacientes que presentaban niveles de  $SDF1 \geq 2,46$  ng/mL tenían una probabilidad 2 veces mayor de presentar manifestaciones clínicas respecto a los que tenían niveles por debajo de ese valor [OR: 2,3 (IC 95%: 1,2-4,4),  $p=0,012$ ]. Por su parte, utilizando un punto de corte de 0,24 mg/dL para PCR y tras controlar por factores de riesgo cardiovascular dicha asociación resultó no significativa.

## Resultados

Se decidió crear una variable combinada que clasificase los pacientes en tres grupos dependiendo de los niveles de SDF1 y PCR: grupo 1 (bajo SDF1 y PCR), grupo 2 (bajo/alto SDF1 y alto/bajo PCR) y grupo 3 (alto SDF1 y PCR) (tabla 14). Como se muestra en la tabla 14, la asociación de la variable combinada de inflamación con las manifestaciones clínicas se incrementaba de forma significativa independientemente del modelo utilizado. De hecho, el modelo 3 que incluía todos los factores de riesgo mostraba que los pacientes con niveles elevados de SDF1 y PCR tenían una probabilidad 2.8 mayor (IC 95%: 1,2 -6,8,  $p=0,022$ ) de presentar manifestaciones clínicas.

**Tabla 14.** Asociación de presencia de manifestaciones clínicas ateroscleróticas y biomarcadores inflamatorios divididos por los puntos de corte para SDF1 y PCR de forma aislada y en combinación.

<b>SDF1</b>				
	<b>&lt;2,46 ng/mL</b>	<b>&gt;2,46 ng/mL</b>	<i>P</i>	
	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)		
<b>N</b>	162	136		
<b>Crudo</b>	1 (ref.)	2,8 (1,8- 4,6)	<i>&lt;0,001</i>	
<b>Modelo 1<sup>a</sup></b>	1 (ref.)	1,6 (0,9–2,9)	<i>0,088</i>	
<b>Modelo 2<sup>b</sup></b>	1 (ref.)	2,4 (1,3–4,5)	<i>0,006</i>	
<b>Modelo 3<sup>c</sup></b>	1 (ref.)	2,3 (1,2–4,4)	<i>0,012</i>	

<b>PCR</b>				
	<b>&lt;0,24 mg/dL</b>	<b>&gt;0,24 mg/dL</b>	<i>p</i>	
	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)		
<b>N</b>	184	114		
<b>Crudo</b>	1 (ref.)	2,2 (1,3–3,5)	<i>0,002</i>	
<b>Modelo 1<sup>a</sup></b>	1 (ref.)	1,3 (0,7–2,3)	<i>0,4</i>	
<b>Modelo 2<sup>b</sup></b>	1 (ref.)	1,2 (0,6–2,1)	<i>0,62</i>	
<b>Modelo 3<sup>c</sup></b>	1 (ref.)	1,3 (0,7–2,5)	<i>0,37</i>	

<b>Categorías de la combinación de biomarcadores inflamatorios</b>				
	<b>G1 OR (IC 95%)</b>	<b>G2 OR (IC 95%)</b>	<b>G3 OR (IC 95%)</b>	<i>p</i>
<b>N</b>	115	116	67	
<b>Crudo</b>	1 (ref.)	1,8 (1,0–3,1)	4,9 (2,5–9,3)	<i>&lt;0,001</i>
<b>Modelo 1<sup>a</sup></b>	1 (ref.)	1,2 (0,7–2,3)	2,0 (0,9–4,3)	<i>0,09</i>
<b>Modelo 2<sup>b</sup></b>	1 (ref.)	1,5 (0,8–3,0)	2,5 (1,1–5,6)	<i>0,032</i>
<b>Modelo 3<sup>c</sup></b>	1 (ref.)	1,7 (0,8–3,4)	2,8 (1,2–6,8)	<i>0,022</i>

SDF1: factor derivado del estroma 1, PCR: Proteína C Reactiva

<sup>a</sup>Modelo 1 incluye edad y sexo, <sup>b</sup>Modelo 2: incluye hipertensión, diabetes mellitus, dislipidemia y perímetro abdominal, <sup>c</sup>Modelo 3: edad, sexo, hipertensión, diabetes mellitus, dislipidemia, perímetro abdominal, consumo tabáquico, consumo alcohólico, PREDIMED score.

G1: SDF1 <2,46 ng/mL y PCR <0,24 mg/dL; G2: SDF1 >2,46 ng/mL y PCR <0,24 mg/dL o SDF1 <2,46 ng/mL y PCR >0,24 mg/dL; G3: SDF1 >2,46 ng/mL y PCR >0,24 mg/dL

### *DIFERENCIAS SEGÚN EVENTO CARDIOVASCULAR*

Como se muestra en la tabla 15, se analizaron los niveles de los biomarcadores según el evento cardiovascular, observándose que los pacientes con CAD, ACV y EAP presentaban niveles más elevados de SDF1; por último, los pacientes con daño renal crónico presentaron niveles elevados de los tres biomarcadores estudiados (SDF1, MMP-12 y PCR).

**Tabla 15.** Diferencias en los niveles de biomarcadores según la presencia de cada tipo de evento cardiovascular.

<b>Enfermedad coronaria (CAD)</b>			
	<b>Sí (n=58)</b>	<b>No (n=240)</b>	<b>p</b>
<b>SDF1 (ng/mL)</b>	2,65 ± 0,86	2,43 ± 0,69	0,047
<b>MMP-12 (pg/mL)<sup>a</sup></b>	513 (81-2592)	386 (0-2952)	0,1
<b>PCR (mg/dL)<sup>a</sup></b>	0,22 (0-19,4)	0,16 (0-17,1)	<0,001

<b>Accidente cerebrovascular (ACV)</b>			
	<b>Sí (n=34)</b>	<b>No (n=64)</b>	<b>p</b>
<b>SDF1 (ng/mL)</b>	3 ± 0,81	2,4 ± 0,7	<0,001
<b>MMP-12 (pg/mL)<sup>a</sup></b>	483 (36-1788)	389 (0-2952)	0,35
<b>PCR (mg/dL)<sup>a</sup></b>	0,29 (0,02-6,9)	0,15 (0-19,4)	<0,001

<b>Enfermedad arterial periférica (EAP)</b>			
	<b>Sí (n=33)</b>	<b>No (n=265)</b>	<b>p</b>
<b>SDF1 (ng/mL)</b>	2,78 ± 0,86	2,44 ± 0,71	0,012
<b>MMP-12 (pg/mL)<sup>a</sup></b>	567 (99-1581)	387 (0-2952)	0,065
<b>PCR (mg/dL)<sup>a</sup></b>	0,26 (0,04-3,53)	0,15 (0-19,4)	<0,001

<b>Nefropatía</b>			
	<b>Sí (n=68)</b>	<b>No (n=230)</b>	<b>p</b>
<b>SDF1 (ng/mL)</b>	2,93 ± 1,03	2,34 ± 0,56	<0,001
<b>MMP-12 (pg/mL)<sup>a</sup></b>	381 (0-2592)	553 (78-2952)	0,001
<b>PCR (mg/dL)<sup>a</sup></b>	0,45 (0,04-19,4)	0,13 (0-6,9)	<0,001

SDF1: factor derivado del estroma 1, PCR: Proteína C Reactiva, MMP-12: metaloproteasa de matriz 12. <sup>a</sup>Variables transformadas logarítmicamente

Sin embargo, al estudiar la asociación entre dichos marcadores y los eventos, tras ajustar por edad, sexo y factores de riesgo cardiovascular (hipertensión,

diabetes, dislipidemia, obesidad, tabaco y alcohol), solo se observó asociación entre el antecedente de ACV y EAP con SDF1 [OR (IC95%) = 1,97 (1,2-3,24) y OR (IC95%) = 1,77 (1,08-2,92) respectivamente], mientras que la nefropatía se asoció con SDF1 y PCR [OR (IC95%) = 2,41 (1,52-3,82) y OR (IC95%) = 1,67 (1,36-2,05) respectivamente].

### LOS NIVELES DE SDF1, MMP-12 Y PCR NO SE ASOCIARON CON LA PRESENCIA DE PLACAS ATEROSCLERÓTICAS

De los 298 pacientes estudiados, 234 (78,9%) pacientes presentaban placas ateroscleróticas en el momento del análisis. No se observaron diferencias en la distribución de factores de riesgo cardiovascular ni en las características demográficas entre los pacientes con placas o sin ellas (tabla 16). Asimismo, tampoco se observaron diferencias en los parámetros inflamatorios analizados entre los pacientes con o sin placas ateroscleróticas.

**Tabla 16.** Características clínicas y demográficas de pacientes con factores de riesgo cardiovascular de acuerdo a la presencia de placas ateroscleróticas.

	Sin placas (n=64)	Con placas (n=234)	p
<b>Sexo (varón, %)</b>	36 (53)	175 (76)	<0,001
<b>Edad (años)</b>	63 (55-75,5)	67 (60-76)	0,15
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	27,3 (25,7-30,4)	28,6 (26,1-32)	0,13
<b>Perímetro abdominal (cm)</b>	101,5 ± 13,6	104 (97-111)	0,13
<b>Hipertensión (n,%)</b>	50 (74,6)	165 (71,7)	0,64
<b>Diabetes (n,%)</b>	23 (34,3)	96 (41,7)	0,28
<b>Dislipidemia (n,%)</b>	49 (74,2)	193 (83,9)	0,07
<b>PAS (mmHg)</b>	135,6 ± 18,3	136,3 ± 19	0,77
<b>PAD (mmHg)</b>	77,6 ± 13,3	79,1 ± 13,9	0,43
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	101 (92-117)	104 (95-117)	0,32
<b>HbA1c (%)</b>	5,7 (5,4-6,3)	5,7 (5,5-6,3)	0,81
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	168 (147-203)	169 (148-198)	0,74
<b>C-HDL (mg/dL)</b>	55 (39-67)	50 (42-62)	0,71
<b>C-LDL (mg/dL)</b>	94 (70-127)	91 (72-120)	0,52
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	98 (70-130)	108 (78-149,5)	0,16
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	1 (0,8-1,18)	1 (0,8-1)	0,8
<b>Tabaco (n,%)</b>	9 (13,2)	38 (16,5)	0,51
<b>Alcohol (n,%)</b>	7 (10,3)	45 (19,6)	0,08
<b>PREDIMED score</b>	9 (8-10)	9 (7-10)	0,98
<b>SDF1 (ng/mL)</b>	2,46 ± 0,9	2,47 ± 0,67	0,86
<b>MMP-12<sup>a</sup> (pg/mL)</b>	381 (228-591)	424 (261 – 666)	0,11
<b>PCR<sup>a</sup> (mg/dL)</b>	0,18 (0,07-0,54)	0,17 (0,08-0,4)	0,16

Las variables paramétricas se muestran en forma de media ± desviación típica, las variables no paramétricas en forma de mediana (rango intercuartílico) y las variables cualitativas en forma de número (%). <sup>a</sup>Variables transformadas logarítmicamente

\*diferencias entre grupo 1 y 2, <sup>†</sup>diferencias entre grupo 1 y 3, <sup>‡</sup>diferencias entre 2 y 3

SDF1: factor derivado del estroma 1, MMP-12: metaloproteasa de matriz 12, PCR: proteína C reactiva. IMC: índice de masa corporal, PAD: presión arterial diastólica, PAS: presión arterial sistólica, HbA1c: Hemoglobina glicosilada, C-HDL: colesterol lipoproteínas de alta densidad, C-LDL: colesterol lipoproteínas de baja densidad, PREDIMED: PREvención con Dieta MEDiterranea.

Al analizar el número de territorios afectados por placas ateroscleróticas, 99 pacientes presentaban placas focales: 39,4% carotídeas, 14,1% aórticas y un 46,5% femorales; 72 pacientes presentaban placas en dos localizaciones y 63 pacientes presentaban placas en todas las localizaciones estudiadas. Los niveles de SDF1, MMP-12 y PCR (tabla 17) tampoco se asociaron con la localización ni con el número de placas.

**Tabla 17.** Niveles de SDF1, MMP-12 y PCR de acuerdo al número placas ateroscleróticas y áreas afectas.

	Sin placa (n=64)	Focal (n=99)	Dos localizaciones (n=72)	Tres localizaciones (n=63)	P
<b>SDF1 (ng/mL)</b>	2,46 ± 0,9	2,52 ± 0,77	2,37 ± 0,63	2,5 ± 0,56	0,28
<b>MMP-12 (pg/mL)<sup>a</sup></b>	381 (228-591)	425 (258 - 671)	426 (273 – 669)	457 (228-666)	0,39
<b>PCR (mg/dL)<sup>a</sup></b>	0,18 (0,07-0,54)	0,18 (0,09 – 0,4)	0,18 (0,08 – 0,4)	0,15 (0,07 – 0,38)	0,48

Las variables paramétricas se muestran en forma de media ± desviación típica, las variables no paramétricas en forma de mediana (rango intercuartílico) y las variables cualitativas en forma de número (%). <sup>a</sup>Variables transformadas logarítmicamente

SDF1: factor derivado del estroma 1, MMP-12: metaloproteasa de matriz 12, PCR: proteína C reactiva. IMC: índice de masa corporal, HbA1c: Hemoglobina glicosilada, C-HDL: colesterol lipoproteínas de alta densidad, C-LDL: colesterol lipoproteínas de baja densidad, PREDIMED: PREvención con Dieta MEDiterranea.

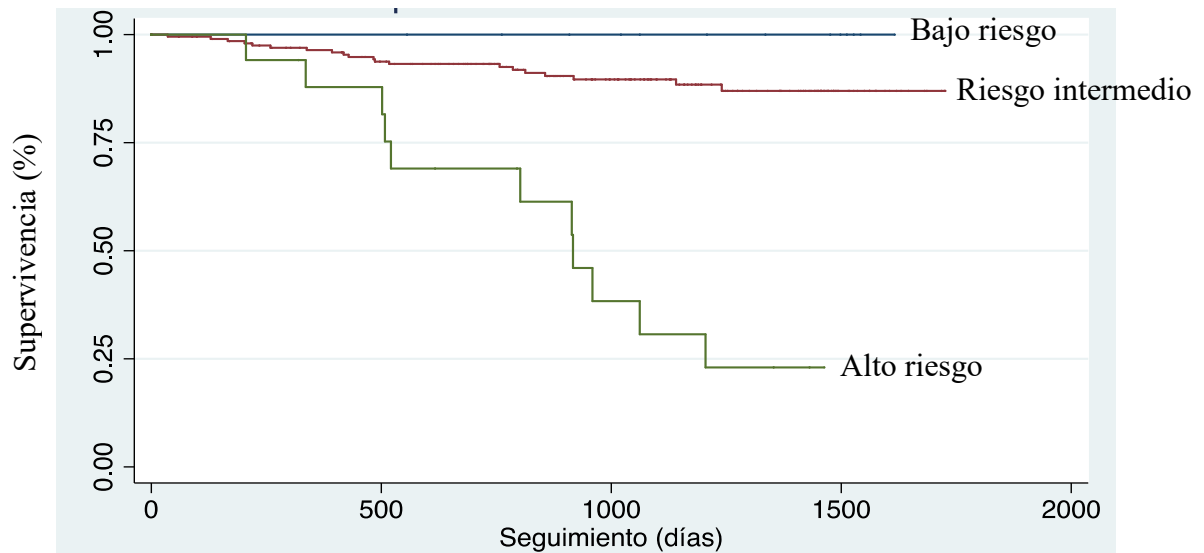
### ASOCIACIÓN DE NIVELES ELEVADOS DE SDF1, MMP-12 Y PCR CON LA MORTALIDAD

Los pacientes fueron seguidos una mediana de 33,6 meses (rango 1 día – 57,5 meses), 6 pacientes fueron perdidos en seguimiento (2%). Se registraron 22 nuevos eventos cardiovasculares (7,5%) y 31 muertes (10,6%) de las cuales



51,6% se relacionaron directamente con manifestaciones de la aterosclerosis, 12,9% fueron debido a cáncer, 16,1% por infección, 6,4% fueron relacionadas con hemorragia, finalmente en 12,9% no se pudo registrar en la historia clínica el motivo de fallecimiento.

Los pacientes que fallecieron durante el seguimiento presentaban niveles más elevados de SDF1 (3,1 (2,6-3,7) ng/mL vs 2,4 (2,1-2,8) ng/mL,  $p=0,001$ ), MMP-12 (612 (441-951) pg/mL vs 384 (243-597) pg/mL,  $p=0,001$ ) y PCR (1,11 (0,35-2,10) mg/dL vs 0,15 (0,07-0,33) mg/dL,  $p<0,001$ ). Tras ajustar por edad y sexo, aquellos que presentaban niveles elevados de MMP-12 y PCR presentaron un riesgo aumentado de muerte (HR=3,2 (95%CI: 1,2-9,1),  $p=0,026$ ; y HR= 8.7 (95%CI: 2-37.9),  $p=0,004$ ; respectivamente). Adicionalmente, tras estratificar a los pacientes en terciles de cada biomarcador, aquellos que tenían los tres biomarcadores en el tercer tercil presentaban un riesgo incrementado de muerte que permanecía significativo tras ajustar por edad y sexo (HR=3,2 (95%CI: 1,5-7,0),  $p=0,004$ ) con un índice C-Harrell's-C de 0,88 (figura 16).



**Figura 16. Supervivencia según la combinación de terciles de biomarcadores.** Variable combinada que combina SDF1, MMP-12 y PCR estratificado por terciles. Alto riesgo: 3<sup>er</sup> tercil SDF1 & MMP-12 & PCR (n= 27), bajo riesgo: 1<sup>er</sup> tercil SDF1 & MMP-12 & PCR (n=15) y riesgo intermedio: cualquier otra combinación (n=256). Curva de supervivencia de Kaplan-Meier. Test de log-rank test de supervivencia según nivel de riesgo de la variable combinada ( $p < 0,001$ ).

Aquellos que fallecieron presentaban en un 90% de los casos un evento cardiovascular previo: 3 pacientes tenían antecedentes de evento coronario agudo o EAP, 2 pacientes ACV y 8 pacientes insuficiencia renal secundaria a daño cardiovascular. De los pacientes que fallecieron, la causa principal fue nuevo evento cardiovascular (52%) seguido de infecciones (19%) y tumores (13%).

EVALUACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES MONOCITARIAS EN  
RELACIÓN CON EL RIESGO CARDIOVASCULAR

En los 102 primeros pacientes reclutados se realizó un estudio de citometría para determinar las subpoblaciones monocitarias en relación con el riesgo cardiovascular. Dicha población estaba formada por un 68,8% de varones con una edad media de 64,5 años (rango 45-86 años). Se clasificaron en 3 grupos de riesgo atendiendo a los criterios previamente descritos: grupo 1 (n=17, 18%), grupo 2 (n=53, 59%) y grupo 3 (n=22, 23%). Se excluyeron del estudio 10 pacientes al no disponer del hemograma o de resultados de citometría. Las características demográficas, factores de riesgo y parámetros analíticos están descritas en la tabla 18. Se observaron diferencias entre los grupos de riesgo en el porcentaje de varones, edad, niveles de colesterol y creatinina. Los pacientes del grupo 3 tenían una edad más avanzada respecto a los dos grupos anteriores, y presentaban mayor nivel de creatinina respecto al grupo 1. No se encontraron diferencias en el resto de los factores estudiados. Los índices Framingham y REGICOR fueron significativamente superiores en el grupo 2 en relación al grupo 1 ( $p=0,019$  y  $p=0,026$  respectivamente).

**Tabla 18.** Características demográficas de los pacientes a los que se realizó análisis de subpoblaciones monocitarias.

	Grupo 1 (n=19)	Grupo 2 (n=54)	Grupo 3 (n=19)	P (ANOVA / CHI)
<b>Sexo (varón, %)</b>	47,4	71	77,8	0,068
<b>Edad (años)</b>	59,5 (9,4)	63,9 (9,4)	70 (11,2)*#	0,003
<b>IMC (Kg/m2)</b>	25,9 (3,9)	28,8 (4,2)	28,5 (2,8)	0,09
<b>Perímetro abdominal (cm)</b>	94,3 (9,7)	103,7 (11)*	102,5 (12,1)	0,02
<b>Hipertensión (%)</b>	11 (57,9)	30 (54,6)	18 (94,7)	0,006
<b>Diabetes (n,%)</b>	5 (26,3)	13 (23,6)	9 (47,4)	0,14
<b>Dislipemia (n,%)</b>	13 (72,2)	47 (85,5)	18 (94,7)	0,16
<b>EAP (n,%)</b>	0	0	5 (26,3)	.
<b>Nefropatía (n,%)</b>	0	0	6 (31,6)	.
<b>IAM (n,%)</b>	0	0	12 (63,2)	.
<b>ACV (n,%)</b>	0	0	4 (21,1)	.
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	195 ± 40	188,3 (4,7)	169,7 (7,5)	0,04
<b>LDL-C (mg/dL)</b>	114 ± 38	109 (4,7)	92,1 (7,7)	0,12
<b>HDL-C (mg/dL)</b>	63,2 (3,4)	57,1 (2,5)	52,1 (2,4)	0,10
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	96,5 (60-139,5)	110 (82-147)	94 (84-160)	0,23
<b>PAS (mmHg)</b>	132 (6,3)	135,6 (2,6)	136 (3,6)	0,79
<b>PAD (mmHg)</b>	82,8 (3,3)	84,2 (1,3)	78,1 (1,9)	0,07
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	100,2 (2,6)	103,9 (2,5)	110,2 (4,7)	0,20
<b>HbA1c (%)</b>	5,7 (5,5 – 6,2)	5,6 (5,5 – 5,9)	5,9 (5,5 – 6,4)	0,46
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,83 (0,03)	0,89 (0,02)	0,97 (0,04)*	0,01
<b>REGICOR</b>	3,6 (2,4)	5,3 (2,8)	.	0,026
<b>FRAMINGHAM</b>	13,4 (10,2)	19,2 (8,3)	.	0,019
<b>Tabaco (%)</b>	4 (21)	11 (20)	3 (16,7)	0,79
<b>Alcohol (%)</b>	2 (10,5)	13 (23,6)	3 (15,8)	0,42

Las variables continuas se presentan como media y desviación estándar. Las variables cualitativas en porcentaje. Test de Bonferroni: \*p<0,05 vs grupo 1; #p<0,05 vs grupo 2. IMC: índice de masa corporal, EAP: enfermedad arterial periférica, IAM: infarto agudo de miocardio, ACV: accidente cerebrovascular, AAS: ácido salicílico, IECA: inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, ARA-II: antagonistas del receptor de angiotensina II, LDL-C: lipoproteínas de baja densidad, HDL-C: lipoproteínas de alta densidad, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, PCR: proteína C reactiva. HbA1c: hemoglobina glicosilada

AUSENCIA DE DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE SUPERFICIE MONOCITARIA SEGÚN EL GRUPO DE RIESGO.

De acuerdo a lo previamente publicado por Weber (20), los monocitos tipo 2 presentaban una expresión significativamente mayor de HLA-DR y CXCR-4, por su parte los monocitos tipo 3 expresaban de forma significativamente superior SLAN (tabla 19).

**Tabla 19.** Caracterización de las subpoblaciones monocitaria según los marcadores de superficie. Valores de intensidad de fluorescencia expresados como mediana y rango intercuartílico (RIC)

Mediana (RIC)	Mon1	Mon2	Mon3
<b>HLA DR</b>	5.710 (3.141)	54.155 (21.103)*	16.166 (7.478)
<b>CD300e</b>	4.509 (1.305)	10.483 (2.766)*	6.736 (2.018)
<b>CD80</b>	240 (77)	357 (111)*	279 (63)
<b>SLAN</b>	43 (15)	52 (22)	114 (97)*
<b>CXCR4</b>	1.991 (675)	2.857 (1.536)*	888 (513)

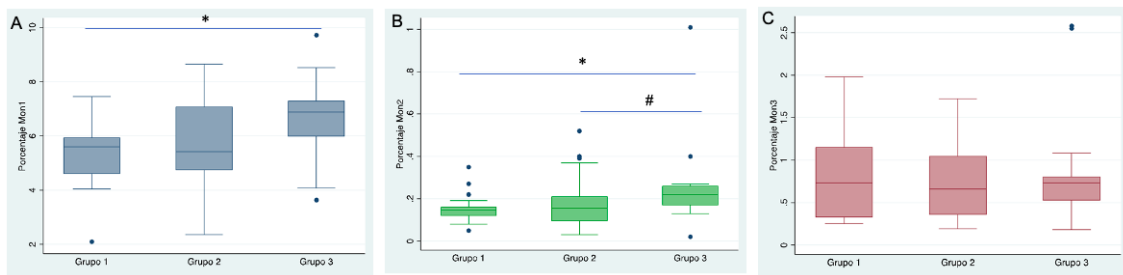
\* Aumento significativo respecto al resto de subpoblaciones monocitarias.

Al analizar la expresión de dichos marcadores de superficie según el grupo de riesgo cardiovascular, no se observaron diferencias de expresión en ninguna de las subpoblaciones.

AUMENTO DEL PORCENTAJE MON1 Y MON2 EN PACIENTES DE GRUPO 3

Los pacientes de grupo 3 presentaron un incremento significativo en el porcentaje de células con fenotipo tanto Mon1 y Mon2 respecto al grupo1 (p=0,014 y p=0,04, respectivamente), así como de Mon2 respecto al grupo 2

( $p=0,04$ ) (figura 17), mientras que no se observaron diferencias en cuanto a la distribución de células Mon3.



**Figura 17. Porcentaje de las distintas subpoblaciones de monocitos según el grupo de riesgo cardiovascular.** A) Cuantificación de monocitos tipo 1 según el grupo de riesgo, B) Cuantificación de monocitos tipo 2 según el grupo de riesgo, C) Cuantificación de monocitos tipo 3 y grupo de riesgo. \* $p < 0,05$  entre Grupo 1 y 3. #Diferencias entre Grupo 2 y 3.

#### CORRELACIÓN DE FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y SUBPOBLACIONES MONOCITARIAS

La tabla 20 muestra la relación entre los factores de riesgo cardiovascular y las distintas subpoblaciones monocitarias en la población total del estudio. El número de células Mon1 correlacionó de forma positiva con el peso, el índice de masa corporal y los triglicéridos y de forma negativa con el HDL-colesterol. Los Mon2 presentaron una correlación negativa con los niveles de colesterol total y HDL-colesterol. Por su parte, los Mon3 correlacionaron de forma positiva con el índice de masa corporal, el perímetro abdominal, los triglicéridos y la presión arterial diastólica, y negativa con el LDL-colesterol.

**Tabla 20.** Correlaciones de factores de riesgo cardiovascular y en número de monocitos de cada subpoblación en el total de pacientes analizados (n=92).

	Mon1		Mon2		Mon3		Mon Total	
	r	p	r	p	r	p	r	p
<b>Edad</b>	0,007	0,94	0,1	0,31	0,04	0,65	<b>0,02</b>	<b>0,83</b>
<b>Peso</b>	0,26	0,01	0,2	0,04	0,27	0,008	<b>0,3</b>	<b>0,003</b>
<b>Perímetro abdominal</b>	0,15	0,15	0,15	0,14	0,23	0,03	<b>0,19</b>	<b>0,07</b>
<b>IMC</b>	0,28	0,005	0,14	0,17	0,24	0,02	<b>0,31</b>	<b>0,002</b>
<b>PCR</b>	0,15	0,14	0,07	0,48	0,004	0,97	<b>0,14</b>	<b>0,17</b>
<b>Colesterol</b>	0,03	0,77	-0,21	0,04	-0,09	0,4	- <b>0,001</b>	<b>0,99</b>
<b>LDL-C</b>	0,11	0,29	-0,13	0,2	-0,27	0,008	<b>0,08</b>	<b>0,4</b>
<b>HDL-C</b>	-0,35	<0,001	-0,25	0,01	-0,02	0,83	<b>-0,38</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>TGL</b>	0,29	0,004	0,14	0,19	0,22	0,03	<b>0,31</b>	<b>0,002</b>
<b>Glucosa</b>	0,08	0,41	0,15	0,15	-0,02	0,82	<b>0,07</b>	<b>0,45</b>
<b>Creatinina</b>	0,17	0,1	0,18	0,08	0,11	0,26	<b>0,18</b>	<b>0,07</b>
<b>PAS</b>	0,02	0,81	0,04	0,68	0,16	0,11	<b>0,05</b>	<b>0,57</b>
<b>PAD</b>	0,02	0,79	0,002	0,98	0,28	0,006	<b>0,08</b>	<b>0,42</b>
<b>Leucocitos</b>	0,7	<0,001	0,25	0,01	0,15	0,15	<b>0,67</b>	<b>&lt;0,001</b>

Mon1: monocitos tipo 1, Mon2: monocitos tipo 2, Mon3: monocitos tipo 3. IMC: índice de masa corporal, PCR: proteína C Reactiva, LDL-C: lipoproteínas de baja densidad, HDL-C: lipoproteínas de alta densidad, TGL: triglicéridos, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica

AUMENTO DE MON1 Y MON2 EN PACIENTES CON EVENTOS CARDIOVASCULARES PREVIOS

Tras realizar análisis univariante en la población total estudiada, se encontró una asociación entre los eventos vasculares adversos (definido como única variable compuesta que incluía: IAM, ACV, EAP o nefropatía) y el porcentaje de Mon1 ( $\beta=0,86$ ;  $p=0,02$ ) y Mon2 ( $\beta=0,1$ ;  $p=0,002$ ), que además se correlacionaron con la cifra de leucocitos ( $r=0,7$ ,  $p<0,001$  para Mon1 y  $r=0,26$ ,  $p=0,01$  para Mon2).

Además, tras estratificar las subpoblaciones de monocitos en terciles se observó una asociación entre niveles elevados de Mon1 y la presencia de placas de ateroma en los tres territorios de forma simultánea (carotídeo, abdominal e iliaco), dichas diferencias se mantenían tras ajustar por edad y sexo (tabla 21). No se observó asociación entre el resto de las subpoblaciones y la presencia de placas de ateroma.

**Tabla 21.** Asociación de los terciles de Mon1 y la presencia de placas de ateroma en arterias carótidas, aorta e iliacas de forma simultánea.

	<b>Tercil 1</b>	<b>Tercil 2</b>	<b>Tercil 3</b>
<b>Mon1 (10<sup>9</sup>/mL)</b>	<373,4	373,4-495,4	>495,4
<b>Crudo (OR, IC 95%)</b>	1 (Ref)	2,84 (0.66-12.24)	7,69 (1.92-30.7) *
<b>Modelo 1 (OR, IC 95%)</b>	1 (Ref)	2,36 (0,48-11,57)	7,37 (1,55-34,9) *

<sup>a</sup>Modelo 1 incluye edad y sexo. \* $p<0,05$  tercil 3 vs tercil1

Estos resultados indicarían que los pacientes con placas ateroscleróticas o eventos secundarios presentarían un perfil monocitario más proinflamatorio (monocitos Mon1 y 2) respecto a pacientes con factores de riesgo cardiovascular pero sin patología aterosclerótica detectable.



# DISCUSIÓN



## 5. DISCUSIÓN

En este trabajo hemos diseñado estudios clínicos y experimentales encaminados a determinar el papel de nuevos biomarcadores inflamatorios y su posible relación con el riesgo ateroesclerótico y sus implicaciones clínicas. El desarrollo de nuevos biomarcadores puede facilitar una mejor estratificación del riesgo y tener connotaciones pronósticas.

### **IMPORTANCIA DE LA INFLAMACIÓN EN LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR**

Las ECV representan la principal causa de mortalidad en nuestro medio (2,91), siendo su principal sustrato fisiopatológico la aterosclerosis. Si bien hasta hace unas décadas era un problema centrado en países desarrollados, los programas de control de riesgo cardiovascular precoz, así como el cambio y control de otras enfermedades, ha hecho que en la actualidad se haya convertido en un problema predominante en países en vías de desarrollo (92).

En el desarrollo de la aterosclerosis y consecuente ECV tiene un papel central la inflamación crónica de la pared vascular. Así, en estos últimos años, numerosos estudios se han centrado en la evaluación y control de la inflamación como medida de control de dichas enfermedades (92). Es por ello, que está tomando especial relevancia el diagnóstico precoz de pacientes en riesgo de desarrollar nuevos eventos mediante el uso de técnicas no invasivas, entre las que destaca el uso de la ecografía, la tomografía computerizada (CT) (93,94) y más recientemente la tomografía por emisión de positrones, usando radioisótopos clásicos como la  $^{18}\text{F}$ -FDG, pero también con nuevos radioisótopos dirigidos a

detectar la presencia de placas vulnerables (61). Dichas técnicas han ido variando con el tiempo y en muchas ocasiones ofrecen resultados controvertidos sobre cuál es la mejor estrategia. Los modelos diagnósticos *multimarker* se han postulado como unos métodos diagnósticos más precisos de la ECV (95,96), dichos modelos aúnan tanto determinaciones analíticas como de imagen (97). Aunque estas estrategias *multimarker* han ido aumentando con el tiempo, apoyadas por resultados de grandes cohortes de riesgo cardiovascular (98–100), todavía queda pendiente definir cuál es el mejor abordaje tanto en la estratificación como el mejor manejo de dichos pacientes y cuál es más coste-efectivo (97,101,102).

En este estudio prospectivo realizado en pacientes mayores de 45 años y con al menos 2 factores de riesgo cardiovascular, observamos que hasta el 87,6% de los pacientes reclutados presentaban algún tipo de manifestación aterosclerótica, bien por presencia de placas que ocupasen >25% la luz del vaso o presencia de microalbuminuria, de los cuales un 40% había presentado manifestaciones clínicas de aterosclerosis (IAM o angina, AIT o ACV, EAP o enfermedad renal crónica).

Por ello, en nuestro estudio decidimos analizar el papel de nuevos marcadores inflamatorios asociados con dicha patología, así como evaluar su combinación con parámetros clásicos como la PCR, previamente descrita su elevación en aquellos pacientes que habían tenido eventos cardiovasculares previos, y que en la actualidad se utiliza en el screening y la monitorización del tratamiento de dichos pacientes (5,50,103). A partir de resultados obtenidos de un modelo de ratón con diferentes grados de aterosclerosis se decidió evaluar el papel de dos nuevos marcadores circulantes, SDF1 y MMP-12, en la inflamación crónica en

pacientes con ECV. Adicionalmente, dado el importante papel de la inmunidad innata en el desarrollo de la aterosclerosis también estudiamos el papel de las subpoblaciones monocito-macrófago como responsables de dicha inflamación. Finalmente, analizamos el papel de la MMP-10, una metaloproteasa involucrada en el proceso aterosclerótico, en la polarización de monocitos a macrófagos.

### **NUEVOS MARCADORES INFLAMATORIOS A PARTIR DE UN MODELO MURINO DE ATEROSCLEROSIS.**

Previamente, Purroy A. y cols habían evaluado el papel de la MMP-10 en el desarrollo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular, demostrando el papel central de dicha metaloproteasa en el desarrollo de la aterosclerosis, dado que ratones deficientes presentaban reducción de la aterosclerosis, así como menor inflamación local y sistémica (38).

Aprovechando dicho modelo de ratón evaluamos la expresión de distintos genes que previamente se habían propuesto como causantes o relacionados con la patología cardiovascular, como son el eje CXCR4/SDF1 y la MMP-12 (83,104,105). Los ratones ApoE<sup>-/-</sup>, es decir con mayor aterosclerosis, presentaban una expresión aumentada de CXCR4 con el tiempo, siendo sus principales diferencias a 16 meses, comparado con ratones con aterosclerosis retardada, es decir, ratones 2KO, si bien con SDF1, el ligando de CXCR4, no se observaron diferencias en su expresión a nivel de la aorta. Al evaluar la expresión proteica se confirmaba el aumento de expresión CXCR4 en ratones ApoE<sup>-/-</sup> respecto a los 2KO a los 12 meses. El papel concreto del eje SDF1/CXCR4 en la aterosclerosis todavía es desconocido, algunos trabajos muestran que los factores inflamatorios aumentan la expresión de CXCR4 en macrófagos

(68,106), mientras que otros muestran en modelos experimentales un papel ateroprotector (69). Nuestros resultados, apoyan la hipótesis de su papel proaterogénico, confirmando así los resultados de Merckelbach et al, en los que se describía la asociación CXCR4 con la progresión aterosclerótica, así como su incremento asociado a zonas ricas en macrófagos (107,108). La falta de paralelismo en la expresión de CXCR4 y SDF1 a nivel tisular puede explicarse por el hecho de que el CXCR4 no es el único receptor para SDF1 a nivel vascular (68), siendo su afinidad 10 veces mayor por CXCR7 (109). Si bien la función de CXCR7 no está del todo esclarecida, parece claro que existe una intensa interacción entre SDF1/CXCR4 y CXCR7 (109).

Por su parte, la expresión del gen de la MMP-12 en los ratones ApoE<sup>-/-</sup> se encontraba aumentada a los 10 meses en comparación con los ratones 2KO, pero estas diferencias desaparecían a los 16 meses. En cuanto a la presencia de la proteína en placa aterosclerótica no se encontraron diferencias, si bien parecía que su expresión se incrementaba en el curso del tiempo independientemente del modelo de ratón analizado. Estudios previos han señalado la asociación de niveles elevados de MMP-12 y la progresión de la placa aterosclerótica al localizarse en macrófagos asociados a la degradación de la elastina y de la matriz extracelular en pacientes con ACV (110). Dado que los ratones 2KO presentan una infiltración retardada de macrófagos en la placa (39), y es en los macrófagos donde principalmente se encuentra la MMP-12 (82), es quizás por ello que las diferencias de expresión de la MMP-12 se ven incrementadas a los 10 meses en los ApoE<sup>-/-</sup> y que con el tiempo, se pierden al igualarse la infiltración en ambos fenotipos, si bien estos resultados deben ser confirmados con muestras más amplias.

## **PAPEL DEL EJE SDF1/CXCR4 Y MMP-12 EN LA ATEROSCLEROSIS CLÍNICA**

Hasta la fecha, SDF1 se había asociado con eventos cardiovasculares agudos, siendo un factor pronóstico en la recurrencia de nuevos eventos cardiovasculares (111,112); sin embargo, no se había evaluado su papel en ECV crónica. En nuestra cohorte demostramos que SDF1 circulante se encuentra elevado en pacientes con manifestaciones clínicas cardiovasculares tras ajustar por factores de riesgo cardiovascular y otros factores de riesgo conocidos como la edad y sexo. Es conocida la función del eje SDF1/CXCR4 en la promoción de la migración de progenitores hematopoyéticos de médula ósea a sangre periférica (113), así como en la quimiotaxis de linfocitos y monocitos (114), pero además parece que tiene un papel en la transformación en célula espumosa favoreciendo el desarrollo de la aterosclerosis (115). Al igual que sucede con el CXCR4, todavía existe controversia entre el papel beneficioso o deletéreo de dicha enzima. La perpetuación de niveles elevados de dicha citoquina podría estar relacionados con la persistencia de un estímulo inflamatorio asociado a una mala resolución de un evento cardiovascular y por lo tanto a una perpetuación del daño (73). Se ha propuesto a las metaloproteasas como elementos de control en la acción del SDF1, originando una proteína troncada que impide la correcta unión al CXCR4 (114). Esta unión incorrecta impediría el desarrollo de las funciones reparadoras, impidiendo la migración de progenitores al lugar de lesión, y se detectarían niveles elevados en sangre periférica, si bien dichos datos avalarían una hipótesis que debería ser confirmada con estudios dirigidos. En este contexto, nuestros resultados confirman que aquellos pacientes con manifestaciones aterotrombóticas crónicas, como son la EAP e insuficiencia

renal, presentan cifras elevadas de SDF1. Houssini et al, evaluaron el papel del SDF1/CXCR4 en una cohorte de pacientes en programa regular de hemodiálisis, constatando que aquellos pacientes con niveles más elevados de SDF1 y CXCR4 eran los que presentaban otras manifestaciones de ECV y por tanto lo proponían como un marcador para cribado de aterosclerosis clínica (116).

En cuanto a la MMP-12, se trata de una MMP producida principalmente por macrófagos y asociada a la inestabilidad de placa aterosclerótica (82). Hasta el momento pocos estudios han evaluado el papel de la MMP-12 en la ECV, si bien previamente se había reportado la asociación entre MMP-12 y la enfermedad cardiovascular prevalente, así como la extensión de la placa aterosclerótica en pacientes con DM tipo 2 (82), también se ha demostrado la asociación de niveles elevados de dicha metaloproteasa y el desarrollo de ictus isquémico (110) o su asociación con enfermedad coronaria aguda (83). En nuestra cohorte, MMP-12 se encontraba elevada en pacientes con manifestaciones cardiovasculares previas, si bien al ajustar por factores confusores dichas diferencias se perdían.

Finalmente, la PCR clásicamente se ha asociado con la ECV, siendo predictiva de nuevos eventos y permitiendo el seguimiento en los pacientes con ECV (49,117). Asimismo, en nuestra cohorte de pacientes observamos que independientemente de la edad, sexo y el resto de los factores de riesgo cardiovascular, la PCR se asociaba con la presencia de manifestaciones clínicas.

De acuerdo con la tendencia actual de utilizar aproximaciones *multimarker* en la predicción del riesgo aterosclerótico en patología cardiovascular (95,96,118), se demostró en nuestro trabajo que la combinación de niveles elevados de SDF1 y PCR se asociaba de forma significativa con haber presentado un evento



cardiovascular previo. Estos resultados, enfatizaban la importancia de la inflamación residual que persiste más allá del evento agudo, incluso en aquellos pacientes que se encuentran tratados de forma adecuada según las guías clínicas actuales.

### **PAPEL DEL EJE SDF1/CXCR4 Y MMP-12 EN LA ATEROSCLEROSIS SUBCLÍNICA**

Teniendo en cuenta que la formación de la placa aterosclerótica es la base del desarrollo de las ECV, parece especialmente interesante la detección de pacientes con aterosclerosis subclínica que puedan beneficiarse de una intervención precoz (97). Por ello, nosotros evaluamos la asociación de niveles de SDF1, MMP-12 y PCR con la presencia y extensión de la aterosclerosis subclínica en nuestra cohorte de pacientes. Sin embargo, no encontramos dicha asociación ni con la presencia ni con la extensión de la misma. Debemos destacar que estudios anteriores habían demostrado la asociación tanto de PCR con la presencia de nuevas placas ateroscleróticas (117) como MMP-12 con la extensión de las mismas (82). Si bien, la falta de diferencias evidenciada en nuestro trabajo debe ponerse en el contexto de las características heterogéneas de nuestra población respecto a las de los estudios previamente presentados, así como al bajo número de pacientes analizados sin signos de aterosclerosis clínica o subclínica.

## **EVALUACIÓN DE SDF1, MMP-12 Y PCR Y RIESGO DE MORTALIDAD**

Evaluamos la capacidad de predecir la mortalidad por parte de dichos marcadores, observando cómo la presencia de niveles elevados de los tres biomarcadores se asociaba con el riesgo de mortalidad por todas las causas. Adicionalmente, tras utilizar una variable combinada que aunaba los tres biomarcadores estratificados en terciles se observaba que aquellos pacientes que presentaban los tres biomarcadores en el tercil superior tenían un riesgo significativamente elevado de fallecer por todas las causas respecto al resto de combinaciones posibles.

Estos resultados son especialmente interesantes, dado que hasta el momento se había demostrado que presentar niveles de SDF1 aumentados en el momento de desarrollar un evento coronario agudo se asociaban con la mortalidad y con el desarrollo de nuevos eventos (91), si bien no se había evaluado la capacidad predictiva de dicho marcador en un contexto crónico.

Es por ello, que estos hallazgos nos sugieren la presencia de una inflamación residual en pacientes con riesgo cardiovascular que perpetúa y fomenta el desarrollo de aterosclerosis y su desenlace fatal.

## **PAPEL DE LOS MONOCITOS-MACRÓFAGOS EN LA INFLAMACIÓN Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR**

La ECV, como ya hemos resaltado, se trata de un proceso inflamatorio crónico en el que la inmunidad innata juega un papel central. En dicho proceso inflamatorio destaca el papel del sistema mononuclear fagocítico, conformado por monocitos y macrófagos (13). Hasta el momento, tenemos evidencias de que

aqueños pacientes con niveles elevados de col-LDL y glucosa presentan niveles más elevados de monocitos (119), así como los pacientes obesos (120,121). Dichas células no solo se encuentran elevadas en presencia de factores de riesgo cardiovascular, sino que también en aquellos pacientes que desarrollan nuevas placas ateroscleróticas y eventos cardiovasculares (122,123). Es por todo ello, que en los últimos años ha tomado especial relevancia el estudio de las distintas subpoblaciones monocitarias en su relación con la enfermedad cardiovascular (20).

En nuestro trabajo demostramos que la determinación de las subpoblaciones monocitarias circulantes mediante citometría de flujo puede ser de utilidad para valorar el riesgo cardiovascular en pacientes con factores de riesgo y aterosclerosis subclínica y clínica. De esta forma, observamos una asociación entre las subpoblaciones monocitarias Mon1 y Mon2 con el riesgo cardiovascular, con la presencia de placas de ateroma (Mon1), la presencia de manifestaciones clínicas de aterosclerosis (Mon2) o la presencia de más de 2 factores de riesgo cardiovascular (Mon3).

Además, teniendo en cuenta la estratificación de riesgo utilizada en nuestro trabajo, observamos que se producía un aumento de monocitos conforme se incrementaba el riesgo cardiovascular de acuerdo a los grupos de riesgo pre-establecidos. Asimismo, aquellos pacientes de mayor riesgo, grupo3 (pacientes con manifestaciones clínicas), presentaron los niveles más elevados de monocitos Mon1 y Mon2 en comparación con aquellos que no presentaban aterosclerosis (grupo1). De forma general, en el proceso aterogénico la activación endotelial promueve la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria que facilita la migración e infiltración de monocitos en la placa

aterosclerótica (19). De las distintas subpoblaciones, son los Mon1 la subpoblación predominantemente identificada en las placas y los que se consideran mediadores inflamatorios. Algunos estudios indican que son los primeros monocitos en aparecer en sangre periférica (20) y su aumento se relaciona con la aparición de placas ateroscleróticas (122), lo que apoyaría la asociación entre los Mon1 y la presencia de placas reportada en nuestro estudio. Estos monocitos, que presentan una vida media muy corta posteriormente se transformarán en monocito no clásico o en macrófagos al infiltrar la placa ateromatosa (124).

En cuanto a los monocitos Mon2 se encuentran elevados en pacientes con eventos cardiovasculares previos y podrían tener un impacto pronóstico en pacientes que ya han padecido un IAM (125). En nuestro trabajo, aquellos pacientes que habían presentado eventos cardiovasculares presentan de forma significativa un porcentaje mayor de Mon2. Debemos destacar que dichos monocitos presentan una expresión aumentada de receptores de membrana con capacidad de adhesión al endotelio activado como demuestran los estudios de Rogacev y cols (126), lo que podría favorecer el proceso aterogénico (20,125,126).

Finalmente, los Mon3 (no clásicos) se ha propuesto que presenten un papel ateroprotector tanto en situación basal como durante procesos inflamatorios, siendo los que primero migran a la lesión (20,127). Sin embargo, en nuestro estudio no encontramos asociación entre el número de Mon3 y la presencia de placas ateromatosas, eventos cardiovasculares o riesgo vascular. Quizás, estas diferencias con estudios previos se deban a que no evaluamos eventos agudos sino pacientes crónicos.

Dado que la determinación de subpoblaciones monocitarias es una técnica sencilla, podría ser útil su determinación en la identificación de aquellos pacientes con una mayor inflamación residual (126).

Como hemos mencionado anteriormente, en el proceso aterogénico los monocitos son atraídos a la lesión aterosclerótica y es de forma local donde se polarizan en macrófagos (119), convirtiéndose posteriormente en células espumosas. Estos macrófagos experimentan diversos cambios fenotípicos mostrando un elevado grado de plasticidad (123,128). Aunque clásicamente se ha clasificado a dicha subpoblación en un fenotipo proinflamatorio (M1) y otro anti-inflamatorio (M2), en la actualidad parece claro que dicha clasificación no refleja todo el espectro de funciones que tiene dicha población celular y que vienen condicionados por la acción de los estímulos procedentes del microambiente (23,123). Arnold et al mostraban una relación inversa entre niveles circulantes de Mon CD16+ y la polarización a M2 en pacientes con eventos coronarios agudos, mostrando asimismo su asociación con la severidad del mismo (128), si bien dicho proceso no está ampliamente estudiado.

Hasta el momento, parece que los macrófagos con fenotipo más antiinflamatorio (M2) promueven la cicatrización de la placa aterosclerótica produciendo una diferenciación osteoblástica (24). En este contexto, parece que la MMP-10 favorece la diferenciación osteoblástica (129), siendo esta metaloproteasa necesaria en el desarrollo de la aterosclerosis (39). Por este motivo, evaluamos el papel de la MMP-10 en la polarización de macrófagos, dada la conocida función de dicha metaloproteasa en el proceso aterogénico, favoreciendo la infiltración de macrófagos en la placa aterosclerótica (39). Mediante estudios transcricionales y de citometría de flujo confirmamos la adecuada polarización

de los macrófagos en las condiciones de cultivo realizadas, sin encontrar diferencias entre los macrófagos expuestos o no a MMP-10. Sin embargo, observamos una mayor expresión de marcadores de M2 como CD38 y CD80 respecto a los M1 en los macrófagos expuestos a MMP10, que podría sugerir una mejor polarización a M2 en presencia de esta proteasa, si bien serán necesarios más estudios para caracterizar dicha asociación. Además en nuestro trabajo existen diferencias en la expresión de algunos receptores de membrana respecto a lo previamente descrito en la literatura, aunque debemos resaltar que es conocido que dicha expresión puede variar según el medio de cultivo y el estímulo utilizado en la polarización (89,90).

## **NUEVAS ESTRATEGIAS EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR**

De forma general, el tratamiento de las ECV se ha centrado en el control de los factores de riesgo y en corregir las secuelas originadas por las mismas. Si bien, dado el elevado coste personal y económico que suponen dichas enfermedades, parece fundamental centrarnos en evitar el desarrollo de las secuelas (92). Es por ello por lo que las estrategias actuales parecen centrarse en reducir la inflamación generada en dicho contexto. Es evidente la estrecha interrelación existente entre la ECV y las vías inflamatorias mediadas por alteración en la inmunidad innata, destacando el papel de la IL-1, una citoquina con un papel clave en la progresión de la aterosclerosis (130).

El primer gran estudio clínico que demostró la importancia del control de la inflamación en pacientes con patología cardiovascular fue el estudio CANTOS que mostraban que pacientes en los que tras un evento coronario agudo persistía

una inflamación, pese a encontrarse con adecuado control de factores de riesgo cardiovascular, tras inhibir la IL-1 $\beta$  por un anticuerpo monoclonal (canakimumab), presentaban menos eventos cardiovasculares, asociándose además a una reducción de los niveles de PCR (5,131). Posteriormente, otros estudios dirigidos a controlar la inflamación de forma más inespecífica encontraron resultados dispares; así el ensayo CIRT, que trataba pacientes con eventos cardiovasculares con metotrexato, no encontró beneficio clínico en su uso; si bien, otros ensayos que utilizaban colchicina conseguían reducir los eventos cardiovasculares con su uso (132). También se han explorado la inhibición directa de la IL-1 con distintos anticuerpos monoclonales (133).

Otras estrategias se han dirigido al control de la inmunidad innata y adaptativa como medio de regulación de la inflamación. Así, algunas estrategias se basan en modular el cambio fenotípico de macrófagos de M1 a M2, con el objetivo de favorecer la cicatrización de la placa aterosclerótica (13) y otras, en promover el control de la inflamación cardiovascular mediante la inmunización tanto activa como pasiva a través de vacunas, bien clásicas como las vacunas de la gripe y neumococo, o con dianas más novedosas como frente al antígeno derivados de LDL(134).

En resumen, todas estas estrategias subrayan la importancia del hallazgo de nuevos marcadores inflamatorios que pudieran actuar como dianas terapéuticas en el control de la inflamación residual en estos pacientes.

### **LIMITACIONES**

Nuestro trabajo muestra diversas limitaciones, entre las que destaca la distribución heterogénea de pacientes entre los grupos de estudio, así como el

elevado porcentaje de varones en la población analizada. Asimismo, en el estudio experimental solo se utilizaron machos, dado que en el momento del diseño no existía ningún requisito de género, lo cual puede ser considerado con una importante limitación. Por otro lado, si bien el seguimiento es corto, 33 meses, destacaremos que se produjeron 22 nuevos eventos (7,4%) y 31 fallecimientos (10,4%), lo que para el tamaño muestral disponible y el tiempo de seguimiento podemos valorar como considerable.

No se puede establecer una relación causal entre los marcadores inflamatorios estudiados y la mortalidad, pero estos resultados pueden ser la base para futuros estudios de cohortes más amplios que confirmen nuestros hallazgos.

A pesar de estas limitaciones nuestro estudio muestra individuos con eventos cardiovasculares previos quienes se encuentran con un riesgo incrementado de nuevos eventos por la persistencia de dichos marcadores elevados y éstos se asocian con la mortalidad global en el estudio de seguimiento. Además, debemos reseñar que tanto SDF1 como MMP-12 pueden ser inhibidos mediante anticuerpos monoclonales, por lo que podrían representar nuevas dianas terapéuticas.

En cuanto al estudio celular, presentamos un bajo tamaño muestral con heterogeneidad de resultados que dificulta la interpretación.

En resumen, los resultados de nuestro trabajo abren vías para la investigación de nuevos biomarcadores inflamatorios en relación tanto al riesgo cardiovascular global como al riesgo inflamatorio residual en pacientes con aterosclerosis, lo



que puede ser de ayuda para establecer una medicina personalizada, junto con los estudios de genómica y nuevos métodos de imagen cardiovascular.



# CONCLUSIONES



## 6. CONCLUSIONES

1. CXCR4 se encuentra aumentado en la aorta de ratones con aterosclerosis espontánea avanzada (ApoE<sup>-/-</sup>) respecto a ratones con aterosclerosis moderada (ApoE<sup>-/-</sup>Mmp10<sup>-/-</sup>) a los 16 meses.
2. Ratones ApoE<sup>-/-</sup> a los 10 meses presentan una tendencia a una mayor expresión de MMP-12 aórtica respecto a ratones 2KO.
3. SDF1 se encuentra elevada en pacientes con antecedente de enfermedad cardiovascular clínica, pudiendo reflejar un estado de inflamación residual.
4. En nuestro trabajo no se observó asociación de los biomarcadores estudiados y la presencia o extensión de las placas ateroscleróticas.
5. Los niveles elevados de SDF1, MMP-12 y PCR se asociaron con un incremento de la mortalidad global.
6. Según los grupos de riesgo cardiovascular establecidos, a medida que aumenta el grupo de riesgo se produce un aumento de Mon1, con características proinflamatorias.
7. Un incremento en el porcentaje de Mon2 se asocia con historia de manifestaciones clínicas de enfermedad cardiovascular.
8. La polarización de macrófagos no se ve afectada por la presencia de MMP-10.

En resumen, el avance en el conocimiento de nuevos biomarcadores inflamatorios permite la estratificación del riesgo cardiovascular más allá de los factores de riesgo cardiovascular.



# **BIBLIOGRAFÍA**





## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Timmis A, Townsend N, Gale CP, Torbica A, Lettino M, Petersen SE, et al. European society of cardiology: Cardiovascular disease statistics 2019. *Eur Heart J*. 2020; 41:12–85.
2. Bueno H, Pérez-Gómez B. Global Rounds: Cardiovascular health, disease, and care in Spain. *Circulation*. 2019; 140:13-15.
3. Patrana C, Landecho MF, García-Casasola G. Arteriosclerosis. JC Pastrana, G. García-Casasola. *Fisiopatología y patología general básicas para ciencias de la salud*. (2013; 143-151). Barcelona, España. Elsevier España S.L.
4. Wang TJ, Nam B-H, Wilson PWF, Wolf PA, Levy D, Polak JF, et al. Association of C-reactive protein with carotid atherosclerosis in men and women: the Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22:1662–7.
5. Ridker PM, MacFadyen JG, Everett BM, Libby P, Thuren T, Glynn RJ, et al. Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: a secondary analysis from the CANTOS randomised controlled trial. *Lancet*. 2018; 391:319–28.
6. Tabas I. 2016 Russell Ross memorial lecture in vascular biology: Molecular-cellular mechanisms in the progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017; 37:183–9.
7. Bergheanu SC, Bodde MC, Jukema JW. Pathophysiology and treatment of atherosclerosis: Current view and future perspective on lipoprotein modification treatment. *Netherlands Hear J*. 2017; 25:231–42.
8. Tabas I, Lichtman AH. Monocyte-Macrophages and T Cells in

- Atherosclerosis; 2017; 47:621–634.
9. Ross R. Atherosclerosis - An inflammatory disease. *N Engl J Med*; 1999; 340:115–26.
  10. Hansson GK. Mechanisms of disease: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*; 352:1685–95.
  11. Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature*. 2021; 592:524–33.
  12. Ruparelia N, Chai JT, Fisher EA, Choudhury RP. Inflammatory processes in cardiovascular disease: A route to targeted therapies. *Nat Rev Cardiol*. 2017; 14:133–44.
  13. Vergallo R, Crea F. Atherosclerotic plaque healing. *N Engl J Med*. 2020; 383:846–57.
  14. Cappellari R, Anna MD, Maria B, Rigato M, Cignarella A, Avogaro A, et al. Shift of monocyte subsets along their continuum predicts cardiovascular outcomes. *Atherosclerosis*. 2017; 266:95–102.
  15. Nahrendorf M. Myeloid cell contributions to cardiovascular health and disease. *Nature*. 2018; 24:711–20.
  16. Rudijanto A. The Role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones*. 2007; 39:86-93.
  17. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010; 116:e74-e80.
  18. Weber C, Shantsila E, Hristov M, Caligiuri G, Guzik T, Heine GH, et al. Role and analysis of monocyte subsets in cardiovascular disease. *Thromb Haemost*. 2016; 116:626–37.

19. Herrero-Fernandez, Gomez-Bris, Somovilla-Crespo, Gonzalez-Granado. Immunobiology of atherosclerosis: A complex net of interactions. *Int J Mol Sci.* 2019; 20:5293.
20. Weber C, Shantsila E, Hristov M, Caligiuri G, Guzik T, Heine GH, et al. Role and analysis of monocyte subsets in cardiovascular disease. *Thromb Haemost.* 2016; 116:626–37.
21. Sanmarco LM, Eberhardt N, Ponce NE, Cano RC, Bonacci G, Aoki MP. New insights into the immunobiology of mononuclear phagocytic cells and their relevance to the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Front Immunol.* 2018; 8:1921.
22. Moroni F, Ammirati E, Norata GD, Magnoni M, Camici PG. The role of monocytes and macrophages in human atherosclerosis, plaque neoangiogenesis, and atherothrombosis. *Mediators of Inflamm.* 2019; 2019:7434376.
23. Frodermann V, Nahrendorf M. Macrophages and cardiovascular health. *Physiol Rev;* 2018; 98:2523–69.
24. Sihoi A, Ikari Y. Plaque calcification during atherosclerosis progression and regression. *J Atheroscler Thromb* 2018; 25:294-303.
25. Colin S, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol Rev.* 2014;262:153–66.
26. Stöger JL, Gijbels MJJ, van der Velden S, Manca M, van der Loos CM, Biessen EAL, et al. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2012; 225:461–8.
27. Rodríguez JA, Orbe J, Páramo JA. Metaloproteasas, remodelado vascular y síndromes aterotrombóticos. *Rev Esp Cardiol.* 2007; 60:959–67.

28. Laronha H, Caldeira J. Structure and function of human matrix metalloproteinases. *Cells*. 2020; 9:1076.
29. Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev*. 2005; 85: 1–31.
30. Wang X, Khalil RA. Matrix metalloproteinases, vascular remodeling, and vascular disease. *Adv Pharmacol*. 2018; 81:241–330.
31. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017; 147:1–73.
32. Tallant C, Marrero A, Gomis-Rüth FX. Matrix metalloproteinases: Fold and function of their catalytic domains. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803:20–8.
33. Fu X, Parks WC, Heinecke JW. Activation and silencing of matrix metalloproteinases. Vol. 19, *Semin Cell Dev Biol*. 2008; 19:2-13.
34. Hobeika MJ, Thompson RW, Muhs BE, Brooks PC, Gagne PJ. Matrix metalloproteinases in peripheral vascular disease. *J Vasc Surg*; 2007; 45:849–57.
35. Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol*. 2015; 44-46: 247-54.
36. Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008. 40:1362–78.
37. Brown BA, Williams H, George SJ. Evidence for the involvement of matrix-degrading metalloproteinases (MMPs) in atherosclerosis. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017; 147:197–237.
38. Olejarz W, Łacheta D, Kubiak-Tomaszewska G. Matrix metalloproteinases as biomarkers of atherosclerotic plaque instability. *Int J Mol Sci*. 2020;

- 21:3946.
39. Purroy A, Roncal C, Orbe J, Meilhac O, Belzunce M, Zalba G, et al. Matrix metalloproteinase-10 deficiency delays atherosclerosis progression and plaque calcification. *Atherosclerosis*. 2018; 278:124–34.
  40. Orbe J, Montero I, Rodríguez JA, Beloqui O, Roncal C, Páramo JA. Independent association of matrix metalloproteinase-10, cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis. *J Thromb Haemost*. 2007; 5:91–7.
  41. Cuadrado E, Rosell A, Penalba A, Slevin M, Alvarez-Sabín J, Ortega-Aznar A, et al. Vascular MMP-9/TIMP-2 and neuronal MMP-10 up-regulation in human brain after stroke: A combined laser microdissection and protein array study. *J Proteome Res*. 2009; 8:3191–7.
  42. Martínez-Aguilar E, Gómez-Rodríguez V, Orbe J, Rodríguez JA, Fernández-Alonso L, Roncal C, et al. Matrix metalloproteinase 10 is associated with disease severity and mortality in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg*. 2015; 61:428–35.
  43. Nagaset H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*; 1999; 274: 21491–4.
  44. Bertini I, Calderone V, Fragai M, Luchinat C, Mangani S, Terni B. Crystal structure of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 10. *J Mol Biol*. 2004;336:707–16.
  45. Batra J, Robinson J, Soares AS, Fields AP, Radisky DC, Radisky ES. Matrix metalloproteinase-10 (MMP-10) interaction with tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-2: Binding studies and crystal structure. *J Biol Chem*. 2012; 287:15935–46.
  46. Krampert M, Bloch W, Sasaki T, Bugnon P, Rüllicke T, Wolf E, et al.

- Activities of the matrix metalloproteinase stromelysin-2 (MMP-10) in matrix degradation and keratinocyte organization in wounded skin. *Mol Biol Cell*. 2004; 15:5242–54.
47. Páramo JA, Rodríguez JA, Orbe J. Integrating soluble biomarkers and imaging technologies in the identification of vulnerable atherosclerotic patients. *Biomark Insights*. 2007; 1:165–73.
  48. Martínez PJ, Baldán-Martín M, López JA, Martín-Lorenzo M, Santiago-Hernández A, Agudiez M, et al. Identification of six cardiovascular risk biomarkers in the young population: A promising tool for early prevention. *Atherosclerosis*. 2019; 282:67–74.
  49. Kaptoge S, Di Angelantonio E, Pennells L, Wood AM, White IR, Gao P, et al. C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *N Engl J Med*. 2012; 367:1310–20.
  50. Folsom AR, Pankow JS, Tracy RP, Arnett DK, Peacock JM, Hong Y, et al. Association of C-reactive protein with markers of prevalent atherosclerotic disease. *Am J Cardiol*. 2001; 88:112–7.
  51. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, et al. 2016 European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts. Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J*. 2016; 2315-81.
  52. Goff DC, Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D’Agostino RB, Gibbons R,

- et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: A report of the American college of cardiology/American heart association task force on practice guidelines. *Circulation*. 2014; 129:S49-73.
53. Martinez E, Martorell J, Riambau V. Review of serum biomarkers in carotid atherosclerosis. *J Vasc Surg*. 2020; 71:329–41.
54. Wang TJ. Assessing the role of circulating, genetic, and imaging biomarkers in cardiovascular risk prediction. *Circulation*. 2011; 123:551–65.
55. Lorenz MW, Gao L, Ziegelbauer K, Norata GD, Empana JP, Schmidtman I, et al. Predictive value for cardiovascular events of common carotid intima media thickness and its rate of change in individuals at high cardiovascular risk – Results from the PROG-IMT collaboration. *PLoS One*. 2018; 13:e0191172.
56. Laclaustra M, Casasnovas JA, Fernández-Ortiz A, Fuster V, León-Latre M, Jiménez-Borreguero LJ, et al. Femoral and carotid subclinical atherosclerosis association with risk factors and coronary calcium: The AWHs study. *J Am Coll Cardiol*. 2016; 67:1263–74.
57. Greenland P, Blaha MJ, Budoff MJ, Erbel R, Watson KE. Coronary calcium score and cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol*; 2018; 72: 434–47.
58. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, Himmelfarb CD, Khera A, Lloyd-Jones D, McEvoy JW, Michos ED, Miedema MD, Muñoz D, Smith SC Jr, Virani SS, Williams KA Sr, Yeboah J, Ziaeian B. 2019 ACC/AHA Guideline on the primary prevention of cardiovascular disease: a report of the American college of cardiology/american heart association task force on clinical practice guidelines. *Circulation*. 2019; 140:e596-e646.

59. Raggi F, Pelassa S, Pierobon D, Penco F, Gattorno M, Novelli F, et al. Regulation of human macrophage M1-M2 polarization balance by hypoxia and the triggering receptor expressed on myeloid cells-1. *Front Immunol.* 2017; 8:1097.
60. Fernández-Friera L, Fuster V, López-Melgar B, Oliva B, Sánchez-González J, Macías A, et al. Vascular inflammation in subclinical atherosclerosis detected by hybrid PET/MRI. *J Am Coll Cardiol.* 2019; 73:1371–82.
61. McKenney-Drake ML, Moghbel MC, Paydary K, Alloosh M, Houshmand S, Moe S, et al. <sup>18</sup>F-NaF and <sup>18</sup>F-FDG as molecular probes in the evaluation of atherosclerosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2018; 45:2190–200.
62. Reiter T, Kircher M, Schirbel A, Werner A, Kropf S, Ertl G, et al. Imaging of C-X-C Motif Chemokine Receptor CXCR4 Expression After Myocardial Infarction With [<sup>68</sup>Ga]Pentixafor-PET/CT in Correlation With Cardiac MRI. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2018;11:1541–3
63. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* 1998;392: 565–8.
64. Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol.* 2007; 28:299–307.
65. Mazinghi B, Ronconi E, Lazzeri E, Sagrinati C, Ballerini L, Angelotti ML, et al. Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells. *J Exp Med.* 2008; 205:479–90.
66. Levoye A, Balabanian K, Baleux F, Bachelerie F, Lagane B. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood.* 2009; 113:6085–93.
67. Derlin T, Sedding DG, Dutzmann J, Haghikia A, König T, Napp LC, et al. Imaging of chemokine receptor CXCR4 expression in culprit and nonculprit



- coronary atherosclerotic plaque using motion-corrected [68Ga]pentixafor PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2018;45:1934
68. Döring Y, Pawig L, Weber C, Noels H. The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. *Front Physiol*. 2014; 5:212.
69. Döring Y, Noels H, van der Vorst EPC, Neideck C, Egea V, Drechsler M, et al. Vascular CXCR4 Limits atherosclerosis by maintaining arterial integrity clinical perspective. *Circulation*. 2017; 136:388–403.
70. Murphy JW, Cho Y, Sachpatzidis A, Fan C, Hodsdon ME, Lolis E. Structural and functional basis of CXCL12 (stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ ) binding to heparin. *J Biol Chem*. 2007; 282:10018–27.
71. Tavakolian V, Mohammadi M, Hassanshahi G, Kounis NG, Esmaeili A, Tavakolian Ferdousie V, et al. Serum CXCL10 and CXCL12 chemokine levels are associated with the severity of coronary artery disease and coronary artery occlusion. *Int J Cardiol*. 2017; 233:23–8.
72. Sjaarda J, Gerstein H, Chong M, Yusuf S, Meyre D, Anand SS, et al. Blood CSF1 and CXCL12 as causal mediators of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2018; 72:300–10.
73. Chen J, Chemaly E, Liang L, Kho C, Lee A, Park J, et al. Effects of CXCR4 gene transfer on cardiac function after ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol*. 2010; 176:1705–15.
74. Gao JH, Yu XH, Tang CK. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) in atherosclerosis: An underlying therapeutic target. *Clin Chim Acta*. 2019; 495:538–44.
75. Michineau S, Franck G, Wagner-Ballon O, Dai J, Allaire E, Gervais M. Chemokine (C-X-C Motif) receptor 4 blockade by AMD3100 inhibits

- experimental abdominal aortic aneurysm expansion through anti-inflammatory effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34:1747–55.
76. Bobadilla M, Sainz N, Abizanda G, Orbe J, Rodriguez JA, Páramo JA, et al. The CXCR4/SDF1 axis improves muscle regeneration through MMP-10 activity. *Stem Cells Dev.* 2014; 23:1417–27.
77. Kaynar M, Shapiro SD. Matrix Metalloproteinase-12/Macrophage Elastase. N. Rawlings, G Salvensen (Eds). *Handbook of Proteolytic Enzymes, 3ª edición* (2013; 800-804). Academic Press, Elsevier.
78. Dean RA, Cox JH, Bellac CL, Doucet A, Starr AE, Overall CM. Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR + CXC chemokines and generates CCL2, -7, -8, and -13 antagonists: Potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx. *Blood.* 2008; 112:3455–64.
79. Liu S lin, Bajpai A, Hawthorne EA, Bae Y, Castagnino P, Monslow J, et al. Cardiovascular protection in females linked to estrogen-dependent inhibition of arterial stiffening and macrophage MMP12. *JCI Insight.* 2019; 4:e122742.
80. Nar H, Werle K, Bauer MMT, Dollinger H, Jung B. Crystal structure of human macrophage elastase (MMP-12) in complex with a hydroxamic acid inhibitor. *J Mol Biol.* 2001; 312:743–51.
81. Lang R, Kocourek A, Braun M, Tschesche H, Huber R, Bode W, et al. Substrate specificity determinants of human macrophage elastase (MMP-12) based on the 1.1 Å crystal structure. *J Mol Biol.* 2001; 312:731–42.
82. Goncalves I, Bengtsson E, Colhoun HM, Shore AC, Palombo C, Natali A, et al. Elevated plasma levels of MMP-12 are associated with atherosclerotic

- burden and symptomatic cardiovascular disease in subjects with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35:1723–31.
83. Jguirim-Souissi I, Jelassi A, Addad F, Hassine M, Najah M, Hamda K Ben, et al. Plasma metalloproteinase-12 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels and presence, severity, and outcome of coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2007; 100:23–7.
84. Hu W, Wei R, Wang L, Lu J, Liu H, Zhang W. Correlations of MMP-1, MMP-3, and MMP-12 with the degree of atherosclerosis, plaque stability and cardiovascular and cerebrovascular events. *Exp Ther Med.* 2018; 15:1994–8.
85. Liu SL, Bae YH, Yu C, Monslow J, Hawthorne EA, Castagnino P, et al. Matrix metalloproteinase-12 is an essential mediator of acute and chronic arterial stiffening. *Sci Rep.* 2015; 5:1–9.
86. Johnson JL, George SJ, Newby AC, Jackson CL. Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:15575–80.
87. Ammirati E, Moroni F, Norata GD, Magnoni M, Camici PG. Markers of inflammation associated with plaque progression and instability in patients with carotid atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015:718329.
88. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012; 9:676–82.
89. Rey-Giraud F, Hafner M, Ries CH. In Vitro Generation of Monocyte-Derived Macrophages under Serum-Free Conditions Improves Their Tumor

- Promoting Functions. Rojas M, editor. PLoS One. 2012;7:e42656.
90. Vogel DYS, Glim JE, Stavenuiter AWD, Breur M, Heijnen P, Amor S, et al. Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. *Immunobiology*. 2014;219:695–703.
  91. Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, et al. Heart Disease and stroke statistics-2021 update: a report from the american heart association. *Circulation*. 2021; 143:e254-e743.
  92. Libby P, Bornfeldt KE. How far we have come, how far we have yet. *Circ Res*. 2020; 126:1107–11.
  93. López-Melgar B, Fernández-Friera L, Oliva B, García-Ruiz JM, Peñalvo JL, Gómez-Talavera S, et al. Subclinical atherosclerosis burden by 3D ultrasound in mid-life: the PESA study. *J Am Coll Cardiol*. 2017; 70:301-13.
  94. Chen CH, Hung CL, Po HL, Yun CH, Wu YJ, Liu CC, et al. Early detection of subclinical atherosclerosis in asymptomatic patients assessed by carotid duplex and coronary computed tomography. *Int J Gerontol*. 2013; 7:27–34.
  95. Vassalle C. New biomarkers and traditional cardiovascular risk scores: Any crystal ball for current effective advice and future exact prediction? *Clin Chem Lab Med*. 2018; 56:1803–5.
  96. Wang J, Tan G-J, Han L-N, Bai Y-Y, He M, Liu H-B. Novel biomarkers for cardiovascular risk prediction. *J Geriatr Cardiol*. 2017; 14:135–50.
  97. Daniels LB. Multiple biomarker assessment in primary prevention of cardiovascular disease. *Curr Cardiovasc Risk Rep*. 2009; 3:131–6.
  98. Kim HC, Greenland P, Rossouw JE, Manson JAE, Cochrane BB, Lasser NL, et al. Multimarker prediction of coronary heart disease risk. *The*

- women's health initiative. *J Am Coll Cardiol.* 2010; 55:2080–91.
99. Ridker PM, Buring JE, Rifai N, Cook NR. Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women: The Reynolds Risk Score. *J Am Med Assoc.* 2007; 297:611–9.
  100. Zethelius B, Berglund L, Sundström J, Ingelsson E, Basu S, Larsson A, et al. Use of multiple biomarkers to improve the prediction of death from cardiovascular causes. *N Engl J Med.* 2008; 358:2107–16.
  101. Martinez E, Martorell J, Riambau V. Review of serum biomarkers in carotid atherosclerosis. *J. Vasc Surg.* 2020; 71:329-41.
  102. Wang TJ, Gona P, Larson MG, Tofler GH, Levy D, Newton-Cheh C, et al. Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. *N Engl J Med.* 2006; 355:2631–9.
  103. Ridker PM. A test in context: High-sensitivity C-reactive protein. *J Am Coll Cardiol.* 2016; 67:712–23.
  104. Bakogiannis C, Sachse M, Stamatelopoulos K, Stellos K. Platelet-derived chemokines in inflammation and atherosclerosis. *Cytokine.* 2019; 122:154157.
  105. Stellos K, Ruf M, Sopova K, Kiliass A, Rahmann A, Stamatelopoulos K, et al. Plasma levels of stromal cell-derived factor-1 in patients with coronary artery disease: Effect of clinical presentation and cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis.* 2011; 219:913–6.
  106. Irvine KM, Andrews MR, Fernandez-Rojo MA, Schroder K, Burns CJ, Su S, et al. Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) delivers a proatherogenic signal to human macrophages. *J Leukoc Biol.* 2009; 85:278–88.
  107. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin*

- Cancer Res. 2010; 16:2927–31.
108. Merckelbach S, Van Der Vorst EPC, Kallmayer M, Rischpler C, Burgkart R, Döring Y, et al. Expression and cellular localization of CXCR4 and CXCL12 in human carotid atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost.* 2018; 118:195–206.
109. van der Vorst EPC, Döring Y, Weber C. MIF and CXCL12 in cardiovascular diseases: Functional differences and similarities. *Front Immunol.* 2015; 6:373.
110. Mahdessian H, Perisic Matic L, Lengquist M, Gertow K, Sennblad B, Baldassarre D, et al. Integrative studies implicate matrix metalloproteinase-12 as a culprit gene for large-artery atherosclerotic stroke. *J Intern Med.* 2017; 282:429–44.
111. Tong G, Wang N, Zhou Y, Leng J, Gao W, Tong X, et al. Role of stromal cell-derived factor-1 in patients with non-ST elevation acute coronary syndrome. *Int Heart J.* 2014; 55:219–27
112. Matsuoka S, Uematsu M, Nakamura T, Shimizu T, Futamata M, Obata J ei, et al. High levels of stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  predict secondary cardiac events in stable patients with a history of myocardial infarction. *J Cardiol.* 2017; 69:320–5.
113. Dar A, Goichberg P, Shinder V, Kalinkovich A, Kollet O, Netzer N, et al. Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells. *Nat Immunol.* 2005; 6:1038–46.
114. McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power C, Clark-Lewis I, et al. Matrix Metalloproteinase activity inactivates the CXC Chemokine stromal

- cell-derived factor-1. *J Biol Chem.* 2001;43503–8.
115. Li L, Du Z, Rong B, Zhao D, Wang A, Xu Y, et al. Foam cells promote atherosclerosis progression by releasing CXCL12. *Biosci Rep.* 2020; 40:BSR2019327.
116. Mousavi S, Dormanesh B, Shahidi S, Moghadam A, Kazemi M, Abediny A. Stromal cell-derived factor-1 and CXC chemokine receptor type-4 are associated with cardiovascular disease in patients under hemodialysis. *Int J Prev Med.* 2019; 10:219.
117. Cozlea DL, Farcas DM, Nagy A, Keresztesi AA, Tifrea R, Cozlea L, et al. The impact of C reactive protein on global cardiovascular risk on patients with coronary artery disease. *Curr Heal Sci J.* 2013; 39:225–31.
118. Cummings DM, King DE, Mainous AG, Geesey ME. Combining serum biomarkers: the association of C-reactive protein, insulin sensitivity, and homocysteine with cardiovascular disease history in the general US population. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2006; 13:180-5.
119. Moore KJ, Koplev S, Fisher EA, Tabas I, Björkegren JLM, Doran AC, et al. Macrophage Trafficking, inflammatory resolution, and genomics in atherosclerosis: JACC macrophage in CVD series (Part 2). *J Am Coll Cardiol.* 2018;72: 2181–97.
120. Rogacev KS, Ulrich C, Blömer L, Hornof F, Oster K, Ziegelin M, et al. Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *Eur Heart J.* 2010; 31:369–76.
121. Rahman MS, Murphy AJ, Woollard KJ. Effects of dyslipidaemia on. *Nat Publ Gr.* 2017; 14:387–400.
122. Johnsen SH, Fosse E, Joakimsen O, Mathiesen EB, Stensland-Bugge E,

- Njølstad I, et al. Monocyte count is a predictor of novel plaque formation: A 7-year follow-up study of 2610 persons without carotid plaque at baseline the Tromso study. *Stroke*. 2005; 36:715–9.
123. Van Der Vorst EPC, Weber C. Novel features of monocytes and macrophages in cardiovascular biology and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019; 39:e30–7.
124. Williams JW, Giannarelli C, Rahman A, Randolph GJ, Kovacic JC. Macrophage biology, classification, and phenotype in cardiovascular disease: JACC macrophage in CVD series (Part 1). *J Am Coll Cardiol*. 2018; 72:2166–80.
125. Marsh SA, Arthur HM, Spyridopoulos I. The secret life of nonclassical monocytes. *Cytometry* . 2017; 91:1055–8.
126. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, Seiler S, Binder N, Ege P, et al. CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes independently predict cardiovascular events: A cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Coll Cardiol*. 2012; 60:1512–20.
127. Swirski FK, Nahrendorf M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science*. 2013; 339:161–6.
128. Arnold KA, Blair JE, Paul JD, Shah AP, Nathan S, Alenghat FJ. Monocyte and macrophage subtypes as paired cell biomarkers for coronary artery disease. *Exp Physiol*. 2019; 104:1343–52.
129. Reyes R, Rodríguez JA, Orbe J, Arnau MR, Évora C, Delgado A. Combined sustained release of BMP2 and MMP10 accelerates bone formation and mineralization of calvaria critical size defect in mice. *Drug Deliv*. 2018; 25:750–6.



130. Schloss MJ, Swirski FK, Nahrendorf M. Modifiable cardiovascular risk, hematopoiesis, and innate immunity. *Circ Res.* 2020;126:1242–59.
131. Ridker PM, MacFadyen JG, Everett BM, Libby P, Thuren T, Glynn RJ, et al. Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: a secondary analysis from the CANTOS randomised controlled trial. *Lancet.* 2018; 391:319–28.
132. Andreis A, Imazio M, Casula M, Avondo S, Gaetano -, De Ferrari M. Colchicine efficacy and safety for the treatment of cardiovascular diseases. *Intern Emerg Med.* 2021; 1-10.
133. Abbate A, Toldo S, Marchetti C, Kron J, Van Tassell BW, Dinarello CA. Interleukin-1 and the inflammasome as therapeutic targets in cardiovascular disease. *Circ Res.* 2020; 126:1260–80.
134. Nilsson J, Hansson GK. Vaccination strategies and immune modulation of atherosclerosis. *Circ Res.* 2020; 126:1281–96.



# **ANEXO**



## 9. ANEXOS

### COMUNICACIONES A CONGRESOS

#### Comunicaciones orales

1. **M. Marcos-Jubilar**, J. Orbe, J.C Pastrana, A. Fernández-Montero, I. Colina, R. Rodil, J. A. Rodríguez, C. Roncal, J. A. Páramo. Asociación del eje SDF1/CXCR4 y MMP12 con la aterosclerosis clínica y subclínica: estudio clínico experimental y clínico. LXII SEHH y XXXVI SETH. Online. (Octubre 2020).
2. **M. Marcos-Jubilar**, J. Orbe, J.C Pastrana, A. Fernández-Montero, I. Colina, R. Rodil, J. A. Rodríguez, C. Roncal, J. A. Páramo. La relación neutrófilo/linfocito y la MMP12 como biomarcadores inflamatorios de riesgo cardiovascular. LXI SEHH y XXXV SETH. Valencia. (Octubre 2019).
3. **M. Marcos-Jubilar**, J. Orbe, J.C Pastrana, A. Fernández-Montero, I. Colina, R. Rodil, J. A. Rodríguez, C. Roncal, J. A. Páramo. La presencia de subpoblación de monocitos tipo 2 se asocia con patología vascular aterotrombótica. LX SEHH y XXXIV SETH. Granada. (Octubre 2018).
4. **M. Marcos-Jubilar**, J. Orbe, J.C Pastrana, A. Fernández-Montero, I. Colina, R. Rodil, J. A. Rodríguez, C. Roncal, J. A. Páramo. SDF1 y MMP12, nuevos biomarcadores inflamatorios de enfermedad aterotrombótica. LX SEHH and XXXIV SETH. Granada. (Octubre 2018)
5. **M. Marcos-Jubilar**, J.C Pastrana, J. Orbe, J. A. Rodríguez, C. Roncal, A. Fernández-Montero, R. Rodil, I. Colina, J. A. Páramo. Páramo. CXCR4/SDF1, un nuevo biomarcador inflamatorio de aterosclerosis subclínica y clínica. SEA (Sociedad española de arteriosclerosis). Girona. (Mayo 2018).

#### Póster

1. **M. Marcos-Jubilar**, J.C Pastrana, J. Orbe, , C. Roncal, J. A. Rodríguez, A. Fernández-Montero, R. Rodil, I. Colina, J. A. Páramo. Association of MMP-12 and SDF1 with symptomatic and asymptomatic atherosclerosis. XXVIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH), online (Julio 2020)
2. **M. Marcos-Jubilar**, J.C Pastrana, J. Orbe, A. Fernández-Montero, J. A. Rodríguez, I. Colina, C. Roncal, J. A. Páramo. Análisis de subpoblaciones monocitarias en relación con el riesgo cardiovascular. Sociedad Española de Arteriosclerosis. Girona (Mayo 2018)

## ARTÍCULOS ORIGINALES



Article

# Association of SDF1 and MMP12 with Atherosclerosis and Inflammation: Clinical and Experimental Study

Maria Marcos-Jubilar <sup>1,\*</sup>, Josune Orbe <sup>2,3</sup>, Carmen Roncal <sup>2,3</sup>, Florencio J. D. Machado <sup>2</sup>, José Antonio Rodríguez <sup>2,3</sup>, Alejandro Fernández-Montero <sup>4</sup>, Inmaculada Colina <sup>5</sup>, Raquel Rodil <sup>6,†</sup>, Juan C. Pastrana <sup>5</sup> and José A. Páramo <sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Haematology Service, Clínica Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, Spain

<sup>2</sup> Laboratory of Atherothrombosis, Program of Cardiovascular Diseases, Cima Universidad de Navarra, Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra, 31008 Pamplona, Spain; josuneor@unav.es (J.O.); croncalm@unav.es (C.R.); florenciom@alumni.unav.es (F.J.D.M.); joscan@unav.es (J.A.R.)

<sup>3</sup> CIBERCV, Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain

<sup>4</sup> Preventive Medicine, Clínica Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, Spain; afrmontero@unav.es

<sup>5</sup> Internal Medicine Department, Clínica Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, Spain; icolina@unav.es (I.C.); jpastrana3@unav.es (J.C.P.)

<sup>6</sup> Internal Medicine Department, Complejo Hospitalario de Navarra, 31008 Pamplona, Spain; rakierr@unav.es

\* Correspondence: mmarcos3@unav.es (M.M.-J.); japaramo@unav.es (J.A.P.)

† Current address: Internal Medicine Department, Clínica San Miguel, 31006 Pamplona, Spain.



**Citation:** Marcos-Jubilar, M.; Orbe, J.; Roncal, C.; Machado, F.J.D.; Rodríguez, J.A.; Fernández-Montero, A.; Colina, I.; Rodil, R.; Pastrana, J.C.; Páramo, J.A. Association of SDF1 and MMP12 with Atherosclerosis and Inflammation: Clinical and Experimental Study. *Life* **2021**, *11*, 414. <https://doi.org/10.3390/life11050414>

**Academic Editor:**  
Antonella Argjollilo

**Received:** 11 April 2021  
**Accepted:** 29 April 2021  
**Published:** 1 May 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** BACKGROUND: Atherosclerosis is the main etiology of cardiovascular diseases (CVD), associated to systemic inflammation. Matrix metalloproteinases (MMPs) are related to atherosclerosis progression through the SDF1/CXCR4 axis promoting macrophages recruitment within the vascular wall. The goal was to assess new circulatory inflammatory markers in relation to atherosclerosis. METHODS: Measurement of SDF1, MMP12 and CRP in blood samples of 298 prospective patients with cardiovascular risk. To explore atherosclerosis progression, CXCR4/SDF1 axis and MMP12 expression were determined by RT-qPCR and by immunohistochemistry in the aorta of accelerated and delayed atherosclerosis mice models (*ApoE*<sup>-/-</sup> and *ApoE*<sup>-/-</sup>*Mmp10*<sup>-/-</sup>). RESULTS: SDF1, MMP12 and CRP were elevated in patients with clinical atherosclerosis, but after controlling by confounding factors, only SDF1 and CRP remained increased. Having high levels of both biomarkers showed 2.8-fold increased risk of presenting clinical atherosclerosis ( $p = 0.022$ ). Patients with elevated SDF1, MMP12 and CRP showed increased risk of death in follow-up (HR = 3.2, 95%CI: 1.5–7.0,  $p = 0.004$ ). Gene and protein expression of CXCR4 and MMP12 were increased in aortas from *ApoE*<sup>-/-</sup> mice. CONCLUSIONS: The combination of high circulating SDF1, MMP12 and CRP identified patients with particular inflammatory cardiovascular risk and increased mortality. SDF1/CXCR4 axis and MMP12 involvement in atherosclerosis development suggests that they could be possible atherosclerotic targets.

**Keywords:** SDF1/CXCR4; MMP-12; atherosclerosis; inflammation; multimarker approach; cardiovascular risk

## 1. Introduction

In 2018, around 18.6 million deaths were attributed to cardiovascular disease (CVD) globally, representing the main cause of mortality around the world [1]. Atherosclerosis, a chronic inflammatory disease of the vessel wall, plays a main role in the pathogenesis of CVD [2]. From its earliest asymptomatic phase up to the late clinical stages, atherosclerosis promotes leukocyte activation, cytokine release, and infiltration of leukocytes, mainly macrophages, into the arterial wall. Indeed, recent results from the CANTOS trial have identified inflammation as an important and independent factor in CVD. Specifically, an IL-1 $\beta$  inhibitor with anti-inflammatory effects, was associated with significantly lower

rates of recurrent cardiovascular events [3], providing a strong evidence to support the inflammation hypothesis.

Collected data from the general population and clinical cohorts have demonstrated a strong association of some inflammatory markers, such as C-reactive protein (CRP) and CVD [4,5]. Nowadays, new systemic and imaging biomarkers are being studied as surrogate markers of cardiovascular (CV) risk and CVD [6,7]. Among them, stromal cell derived factor-1 (SDF1), located in smooth muscle cells (SMCs), endothelial cells and macrophages and present in atherosclerotic plaques, has been described as an important player in the monocytes arrest in vascular lesion and in platelet activation [8]. SDF1 and its receptor (CXCR4) are implicated in the activation of intracellular signaling pathways that promotes angiogenesis, vascular inflammatory response and neointimal hyperplasia [9]. Moreover, SDF1 has been recently identified as a causal mediator in coronary artery disease (CAD) [10,11]. The blockage of the CXCR4/SDF1 axis decreases the expression of proteolytic mediators such as MMP-12 [12], a metalloelastase secreted by macrophages and platelets, with a key role in leukocytes recruitment [13,14]. Furthermore, MMP12 has been proposed as a potential biomarker of CVD in patients with type 2 diabetes [15], while its deficiency reduced atherosclerosis development and macrophage infiltration in murine models [16].

Finally, our group has recently demonstrated a causal role of matrix metalloproteinase-10 (MMP-10) in atherosclerosis progression, macrophage infiltration and plaque calcification, using a double knock-out (2KO) mouse model (*Apoe<sup>-/-</sup>Mmp10<sup>-/-</sup>*). In addition, MMP-10 expression is induced by CRP in human endothelial cells [17] and both parameters positively correlated with subclinical atherosclerosis in asymptomatic subjects with CV risk factors [18]. Besides, MMP-10 activity modulates CXCR4/SDF1 signaling in skeletal muscle regeneration after experimental vascular ischemia [19].

The purpose of this study was to evaluate prospectively the circulating levels of MMP12 and SDF1 in a cohort of patients with clinical and subclinical atherosclerosis and its role as biomarkers of high risk of CVD and worse outcome. Moreover, we confirmed the association of these proteins in atherosclerosis development by assessing their expression in aortas of murine models with various degrees of atherosclerosis.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Patients

We performed a prospective study including 298 consecutive patients who presented more than one CV risk factor with clinical or subclinical atherosclerosis evaluated in two tertiary hospitals in Navarra (Spain), between April 2017 and June 2019. Subjects were screened with a detailed medical history, physical examination and biochemical profile. All patients underwent routine blood tests and vascular echography of carotid, abdominal aorta and femoral territories. The inclusion criteria were: (1) age > 45 years-old and (2) presence of at least two cardiovascular risk factors: hypertension (blood pressure >140/90 mmHg) or treatment with anti-hypertensive medications; diabetes mellitus (DM) or antidiabetic use, dyslipidaemia [total cholesterol >200 mg/dL, low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) > 130 mg/dL or non-HDL-C > 160 mg/dL, hypertriglyceridemia (>150 mg/dL) or on cholesterol lowering drugs]; body mass index (BMI) > 30 Kg/m<sup>2</sup> or abdominal perimeter (>80 cm female or 94 cm male) and/or current smoker. Exclusion criteria were active cancer, inflammation or infection and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) or steroids two weeks before blood sampling.

We calculated the PREDIMED (PREVención con Dieta MEDiterránea) score, which is a 14-item tool that reflects increasing adherence to Mediterranean diet [20].

Those patients who presented CAD, stroke or transient ischemic attack (TIA), peripheral artery disease (PAD) or nephropathy were considered as suffering clinical atherosclerosis manifestations.

Medical history of patients was reviewed in February 2021 to assess the presence of recurrence or new cardiovascular events and mortality.

Samples and data from studied patients were provided by the Biobank of the University of Navarra and processed following standard operating procedures approved by the Ethical and Scientific Committees. The Ethics Review board of the Clínica Universidad de Navarra approved the protocol (2017/240) and the study was conducted in accordance with the declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from each patient.

### 2.1.1. Vascular Imaging

In order to analyze the presence of atherosclerotic plaques, an expert radiologist manually traced a line on frozen B-mode images between the far wall of the lumen-intima and the media-adventitia interfaces. All subjects were examined in the supine position. A linear array transducer (frequency of 4–9 MHz) was employed, using high-resolution B-mode system (Siemens ACUSON S2000 and S3000 devices, Siemens Healthcare, Duisburg Germany). Gain settings were optimally adjusted to facilitate edge detection.

### 2.1.2. Blood Samples and Biochemical Analysis

Fasting serum and plasma samples were collected by venipuncture, centrifuged (20 min at 1200 g twice) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Serum total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), triglycerides and glucose were measured by standard laboratory techniques with Cobas 8000 (Roche Diagnostic). LDL-C was estimated using the Friedewald equation. Non-HDL cholesterol was calculated by Total Cholesterol—HDL-C. We evaluated high-sensitivity (hs)-CRP by immunoassay (Immulyte; Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, USA).

Inflammatory biomarkers, SDF1 (SDF1; Quantikine, R&D Systems, Abingdon, UK) and MMP12 (MMP12; LSBIO, lifespan Bioscience, SEA, USA), were determined by ELISA following the manufacturer instructions. Double centrifuged plasma EDTA samples were undiluted or diluted 1:300 for SDF1 and MMP12 measures, respectively. The mean coefficients of variance for intra- and inter-assay variation were 3.6% and 10.3% for SDF1 and <4.7% and <7.3% for MMP12. The detection limits were 18 pg/mL for SDF1 and 0.156 ng/mL for MMP12.

## 2.2. Experimental Mouse Model

Aorta sections were obtained from *Apoe*<sup>-/-</sup> mice which develop spontaneous atherosclerosis and from delayed atherosclerosis mouse model (*Apoe*<sup>-/-</sup>*Mmp10*<sup>-/-</sup> mice) developed by Purroy et al. [17] by crossing *Mmp10*<sup>-/-</sup> mice (B6.129P2-*Mmp10*<sup>tm1Jkn</sup>) with *Apoe*<sup>-/-</sup> mice (B6.129P2-*Apoetm1Unc*/J; Charles River Laboratories, L'Arbresle Cedex, France). Animals followed a standard chow diet throughout the experiment until sacrificed at 6, 10, 12 and 16 months.

All experiments were conducted according to the European Community guidelines for ethical animal care and use of laboratory animals (Directive 86/609) and were approved by the University of Navarra Animal Research Review Committee.

### 2.2.1. Quantitative Analysis at mRNA Level (qRT-PCR)

Aortas frozen in liquid nitrogen ( $n = 5$ /group) of 10 and 16 months of age were used to extract RNA using MagMAX-96 Total RNA Isolation Kit (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Reverse transcription was performed with 1  $\mu\text{g}$  of total RNA, random primers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Real-time quantitative PCR was performed on an VIIA-7 sequence detector (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) using TaqMan gene expression assays (IDT) for murine SDF1 (Mm.PT.58.32677664), CXCR4 (Mm.PT.58.41597935), and MMP12 (Mm.PT.58.31615472). Murine  $\beta$ -actin (Mm.PT.39a.22214843.g) was used to normalize results.

### 2.2.2. Histological and Immunohistochemical Analysis

Immunohistochemistry was performed on 3  $\mu\text{m}$  sections from the frozen aortas of 6 and 12 months of age mice. The slides were deparaffinized, and rehydrated, using



antigen retrieval solution (Dakocytomation, ref S1699) diluted 1× at 95 °C for 20 min. Next, the samples were incubated with anti-CXCR4 (orb 74308, Biorbyt, dilution 1:50) and anti-MMP12 (orb36364, Biorbyt, dilution 1:100) antibodies for 24 h in moist chamber at 4 °C, washed appropriately and visualized by 3,3′-diaminobenzidine chromogen (DAB, Dako, ref K3468). Slides were then mounted with distyrene plasticizer and xylene mixture (DPX, VWR Chemicals).

Immunostained slides were subsequently scanned (Aperio ImageScope, Leica ByoSystems) and the percentage of positively stained area in total tissue area was quantified with Image-J software [21].

### 2.3. Statistical Analysis

Shapiro-Wilk test was used to evaluate normality. Normal values were expressed as mean and standard deviation (SD) and those without a normal distribution with median and interquartile range. MMP12 and CRP were logarithmic transformed to achieve a normal distribution. Association between two continuous variables was assessed by Pearson's correlation test. Differences between two groups were analyzed by Student's *t*-test or Welch-test as required by data distribution. Differences between more than two groups were assessed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test (two conditions). The Pearson's  $\chi^2$ -test was used to compare frequency distribution of categorical variables. Univariate and multivariate logistic regression were used to establish association between SDF1, MMP12, and CRP with clinical atherosclerosis manifestations, atherosclerotic plaques and other CV risk factors. The best discriminatory cut-off for SDF1 and CRP in association with clinical atherosclerosis manifestations was determined using the Youden's index (Sensitivity – (1 – specificity)) from the Receiver Operating Characteristic (ROC). A combined variable using SDF1 high/low and CRP high/low was created, to evaluate the association with clinical atherosclerosis manifestations. In the follow-up study, SDF1, MMP12 and CRP were stratified in tertiles and a new variable combining them was created, considering high risk those who had SDF1, MMP12 and CRP in the highest tertile, low risk those with SDF1, MMP12 and CRP in the lowest tertile and medium risk any other combination. Time to the outcomes of interest was plotted using Kaplan–Meier curves for the combined variable, with statistical significance assessed using Cox-regression, controlled by age and sex. Statistical significance was set at  $p < 0.05$  from two-sided test. Analyses were performed with STATA (version 12; StataCorp LP, College Station, TX, USA).

## 3. Results

### 3.1. Patients' Characteristics

This is a prospective study including 298 patients (71% males) with median age of 66 years (interquartile range (IQR) 59–76) that were followed-up for 33.6 months (1 day–57.5 months). Frequency of risk factors was as follows: hypertension 72%, DM 40%, dyslipidaemia 82% and active smoking 45.6%. As shown in Table 1 our cohort was then divided according to the presence or absence of clinical atherosclerosis: PAD (11.1%), CAD (19.5%), stroke/TIA (11.4%) and nephropathy (22.9%). Patients with clinical atherosclerosis manifestations ( $n = 120$ ) were older ( $p < 0.001$ ) and had higher abdominal perimeter ( $p = 0.04$ ), hypertension ( $p = 0.003$ ), DM ( $p < 0.001$ ) and dyslipidaemia ( $p = 0.016$ ) than the remaining group. Moreover, these patients presented reduced levels of total cholesterol ( $p < 0.001$ ), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) ( $p < 0.001$ ) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) ( $p < 0.001$ ), probably due to the effect of lipid lowering drugs, but increased levels of glycosylated haemoglobin ( $p < 0.001$ ), triglycerides ( $p = 0.01$ ) and creatinine ( $p < 0.001$ ). Adherence to a Mediterranean diet was poorer in these patients ( $p = 0.05$ ).

**Table 1.** Demographic characteristics of studied population according to the presence or absence of clinical atherosclerosis manifestations.

	No Clinical Atherosclerosis (n = 178)	Clinical Atherosclerosis (n = 120)	p
Sex (male)	123 (69.1)	88 (73.3)	0.43
Age (years)	61 (56–68)	74 (68–82)	<0.001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.7 (25.7–31.5)	28.6 (26.4–32.3)	0.39
Abdominal perimeter (cm)	102.2 ± 11.8	105.1 ± 11.5	0.04
Hypertension (yes)	117 (65.7)	98 (81.7)	0.003
Diabetes (yes)	46 (25.8)	73 (60.8)	<0.001
Dyslipidaemia (yes)	136 (76.4)	106 (88.3)	0.016
Systolic BP (mmHg)	136 ± 18	137 ± 20	0.75
Diastolic BP (mmHg)	84 ± 10	72 ± 16	<0.001
HbA1c (yes)	5.6 (5.4–5.9)	6 (5.5–6.8)	<0.001
Cholesterol (mg/dL)	184 (158–207)	154 (130–175)	<0.001
HDL-C (mg/dL)	57 (44–68)	45 (36.5–56)	<0.001
LDL-C (mg/dL)	107 (80–134)	79 (59–99)	<0.001
Triglycerides (mg/dL)	100 (72–136)	110 (81–193)	0.01
Creatinine (mg/dL)	0.9 (0.8–1)	1.16 (0.9–1.5)	<0.001
Smoking (yes)	32 (18)	15 (12.5)	0.2
Alcohol (yes)	38 (21.3)	14 (11.9)	0.031
PREDIMED score	9 (7–11)	8 (7–10)	0.05
SDF1 (ng/mL)	2.30 ± 0.49	2.72 ± 0.94	<0.001
MMP12 (pg/mL) *	358.5 (241.5–553.5)	501 (282–768)	0.002
CRP (mg/dL) *	0.12 (0.07–0.31)	0.24 (0.13–1)	<0.001

Continuous parametric variables are shown as mean (standard deviation), non-parametric as median (Interquartile range) and qualitative variables as number (%). \* Logarithmically transformed variables. BMI: Body mass index, BP: Blood pressure, HbA1c: Glycosylated haemoglobin, HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol, LDL-C: Low-density lipoprotein cholesterol, PREDIMED: Prevención con Dieta Mediterránea, SDF1: Stromal derived factor 1, MMP12: Matrix metalloproteinase 12, CRP: C-reactive protein.

### 3.2. Association of Inflammatory Biomarkers with Cardiovascular Risk Factors

Univariate analysis showed an association between SDF1 levels and DM [OR (95%CI) = 0.63 (0.45–0.89),  $p = 0.008$ ] and alcohol intake [OR (95%CI) = 0.82 (0.39–0.97),  $p = 0.035$ ]. Likewise, MMP12 was associated with DM [OR (95%CI) = 1.56 (1.13–2.15),  $p = 0.007$ ] and hypertension [OR (95%CI) = 1.56 (1.12–2.17),  $p = 0.008$ ] (Table 2). Moreover, higher levels of CRP were found in patients with hypertension [OR (95%CI) = 1.22 (1.04–1.41),  $p = 0.012$ ], DM [OR (95%CI) = 1.34 (1.17–1.52),  $p < 0.001$ ] and dyslipidaemia [OR (95%CI) = 1.4 (1.08–1.82),  $p = 0.012$ ] (Table 2).

On the other hand, all inflammatory biomarkers correlated positively with creatinine, and negatively with HDL-C and PREDIMED score. In addition, we found a significant correlation between circulating levels of CRP and SDF1 ( $r = 0.42$ ,  $p < 0.001$ ) and CRP and MMP12 ( $r = 0.31$ ,  $p < 0.001$ ), although no correlation between SDF1 and MMP12 was observed (Table 3).

### 3.3. Inflammatory Biomarkers in Relation to Clinical Atherosclerosis Manifestations

Patients with clinical atherosclerosis showed increased levels of SDF1 (2.7 ± 0.9 ng/mL vs. 2.3 ± 0.5 ng/mL,  $p < 0.001$ ), MMP12 (501 [282–768] pg/mL vs. 358.5 [241.5–553.5] pg/mL,  $p = 0.002$ ) and CRP (0.24 [0.13–1] mg/dL vs. 0.12 [0.07–0.31] mg/dL,  $p < 0.001$ ). In the multivariate analysis, after adjusting for age, sex, DM, hypertension, dyslipidaemia, smoking, obesity, alcohol intake, and PREDIMED score (Table 4), both SDF1 [OR (95%CI): 2.4 (1.5–3.9),  $p < 0.001$ ] and CRP [OR (95%CI): 1.6 (1.3–2.0),  $p < 0.001$ ] remained independently associated with clinical atherosclerosis. However, the association of MMP-12 and clinical manifestations was lost in the multivariate model.

**Table 2.** Association of inflammatory biomarkers with cardiovascular risk factors in univariate analysis.

	SDF1	MMP12 *	CRP *
	OR (95%IC), <i>p</i>	OR (95%IC), <i>p</i>	OR (95%IC), <i>p</i>
Hypertension	1.23 (0.85–1.76) 0.26	1.56 (1.12–2.17) 0.008	1.22 (1.04–1.41) 0.012
Diabetes mellitus	0.63 (0.45–0.89) 0.008	1.56 (1.13–2.15) 0.007	1.34 (1.17–1.52) <0.001
Dyslipidaemia	0.96 (0.64–1.44) 0.856	1.29 (0.9–1.86) 0.17	1.4 (1.08–1.82) 0.012
Obesity (BMI > 35)	0.82 (0.54–1.25) 0.36	1.35 (0.91–2) 0.13	1.09 (0.97–1.23) 0.14
Smoking (current)	0.54 (0.33–0.87) 0.54	0.75 (0.51–1.1) 0.14	0.9 (0.76–1.1) 0.29
Alcohol (>5/week)	0.82 (0.39–0.97) 0.035	0.84 (0.58–1.22) 0.37	0.81 (0.67–0.98) 0.028

\* Logarithmically transformed variables. BMI: Body mass index, SDF1: Stromal derived factor 1, MMP12: Matrix metalloproteinase 12, CRP: C-reactive protein.

**Table 3.** Correlation between cardiovascular risk factors and inflammatory biomarkers in patients with CV risk (*n* = 298) \*.

	SDF1 (ng/mL)		MMP12 (pg/mL) *		CRP (mg/dL) *	
	R	P	R	P	R	P
Cholesterol (mg/dL)			0.12	0.03		
HDL-C (mg/dL)	−0.17	0.003	−0.26	<0.001	−0.42	<0.001
HbA1c (%)	−0.12	0.035	0.25	<0.001	0.28	<0.001
Diastolic BP (mmHg)	0.24	<0.001	−0.17	0.004	−0.49	<0.001
Waist (cm)			0.16	0.008	0.14	0.024
BMI			0.17	0.003	0.17	0.005
Creatinine (mg/dL)	0.27	<0.001	0.26	<0.001	0.53	<0.001
CRP (mg/dL) *	0.42	<0.001	0.31	<0.001	-	-
SDF1 (ng/mL)	-	-	0.1	NS	-	-
PREDIMED score	−0.013	0.024	−0.13	0.03	−0.14	0.019

\* Logarithmically transformed variables. \* Pearson correlation test. HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol, LDL-C: Low-density lipoprotein cholesterol, HbA1c: Glycosylated haemoglobin, BP: Blood pressure, BMI: Body mass index, PREDIMED: PREvención con Dieta MEDiterránea, CRP: C-reactive protein, SDF1: Stromal derived factor 1, MMP12: Matrix metalloproteinase 12.

ROC curves rendered an area under the curve (AUC):  $0.66 \pm 0.04$  (95%CI: 0.59–0.73) and  $0.68 \pm 0.03$  (95%CI: 0.62–0.73), for SDF1 and CRP respectively. The SDF1 ROC curve for clinical atherosclerosis manifestations was significantly improved when CRP was included in the model [AUC (95%CI): 0.70 (0.62–0.73);  $p = 0.005$ ]. The cut-off values for SDF1 and CRP (2.46 ng/mL and 0.24 mg/dL, respectively) showed a sensitivity of 60.2% and a specificity of 65.3% for SDF1 and sensitivity of 63.9% and specificity of 68.2% for CRP. In multivariate analysis, patients with higher levels of SDF1 ( $\geq 2.46$  ng/mL) were 2 times more likely to have presented clinical atherosclerosis than patients with lower SDF1 levels [OR (95%CI): 2.3 (1.2–4.4),  $p = 0.012$ , Table 5]. A similar multivariate analysis for CRP rendered a non-significant association with previous clinical atherosclerosis (Table 5). Furthermore, using these cut-off values we stratified our cohort into 3 groups. Group 1:

low SDF1 and low CRP, group 2: either high SDF1 or high CRP, and group 3: high SDF1 and high CRP (Table 5). According to this distribution, the association of inflammation with clinical atherosclerosis manifestations was increased when evaluating SDF1 and CRP as a combined variable, regardless of the tested model (Table 5). In fact, model 3, including all confounding factors, showed an OR of 2.8 (95%CI: 1.2–6.8;  $p = 0.022$ ) for the combination of SDF1 and CRP with clinical atherosclerosis.

**Table 4.** Multivariate logistic regression model to assess the association of inflammatory biomarkers and clinical atherosclerosis manifestations in patients with CV risk.

		OR (IC 95%)	<i>p</i>
SDF1	Crude	2.4 (1.6–3.5)	<0.001
	Model 1	1.6 (1.1–2.4)	0.018
	Model 2	2.3 (1.4–3.6)	<0.001
	Model 3	2.4 (1.5–3.9)	0.001
MMP12 *	Crude	1.6 (1.2–2.3)	0.002
	Model 1	1.5 (1.1–2.2)	0.027
	Model 2	1.4 (0.9–2.0)	0.1
	Model 3	1.3 (0.9–2.3)	0.17
CRP *	Crude	1.9 (1.6–2.3)	<0.001
	Model 1	1.6 (1.3–2.0)	<0.001
	Model 2	1.6 (1.3–1.9)	<0.001
	Model 3	1.6 (1.3–1.9)	<0.001

SDF1: Stromal derive factor, MMP12: Matrix metalloproteinase 12, CRP: C-reactive protein. \* Logarithmically transformed variables. Model 1 includes age and sex, Model 2 includes hypertension, diabetes mellitus, dyslipidaemia and obesity, Model 3: Age, sex, hypertension, diabetes, dyslipidaemia, abdominal perimeter, smoking, alcohol, and PREDIMED score (Prevención con Dieta Mediterránea).

**Table 5.** Association of clinical atherosclerosis manifestations and inflammatory biomarkers stratified by cut-off points for SDF1 and CRP alone and in combination.

		SDF1		<i>p</i>
		<2.46 ng/mL OR (95% CI)	>2.46 ng/mL OR (95% CI)	
N		162	136	
Crude		1 (ref)	2.8 (1.8–4.6)	<0.001
Model 1		1 (ref)	1.6 (0.9–2.9)	0.088
Model 2		1 (ref)	2.4 (1.3–4.5)	0.006
Model 3		1 (ref)	2.3 (1.2–4.4)	0.012
		CRP		<i>p</i>
		<0.24 mg/dL OR (95% CI)	>0.24 mg/dL OR (95% CI)	
N		184	114	
Crude		1 (ref)	2.2 (1.3–3.5)	0.002
Model 1		1 (ref)	1.3 (0.7–2.3)	0.4
Model 2		1 (ref)	1.2 (0.6–2.1)	0.62
Model 3		1 (ref)	1.3 (0.7–2.5)	0.37

Table 5. Cont.

	Categories of Combination Inflammatory Biomarker			
	G1 OR (95% CI)	G2 OR (95% CI)	G3 OR (95% CI)	p
N	115	116	67	
Crude	1 (ref)	1.8 (1.0–3.1)	4.9 (2.5–9.3)	<0.001
Model 1	1 (ref)	1.2 (0.7–2.3)	2.0 (0.9–4.3)	0.09
Model 2	1 (ref)	1.5 (0.8–3.0)	2.5 (1.1–5.6)	0.032
Model 3	1 (ref)	1.7 (0.8–3.4)	2.8 (1.2–6.8)	0.022

SDF1: Stromal derived factor 1, CRP: C-Reactive protein, CV: Cardiovascular. Model 1 includes age and sex, Model 2 includes hypertension, diabetes mellitus, dyslipidaemia and abdominal perimeter, Model 3: Age, sex, hypertension, diabetes, dyslipidaemia, abdominal perimeter, smoking, alcohol, and PREDIMED score (PREvención con Dieta MEDiterránea). G1: SDF1 < 2.46 ng/mL and CRP < 0.24 mg/dL; G2: SDF1 > 2.46 ng/mL and CRP < 0.24 mg/dL. cut-off or SDF1 < 2.46 ng/mL and CRP > 0.24 mg/dL; G3: SDF1 > 2.46 ng/mL and CRP > 0.24 mg/dL.

### 3.4. Association of Inflammatory Biomarkers with Atherosclerotic Plaques

A total of 234 patients presented atherosclerotic plaques at the time of the analysis, although no differences in CV risk factors or demographic characteristics were observed when patients with or without plaques were compared (Table 6).

Table 6. Clinical and demographic characteristics of patients with CV risk according to the presence or absence of atherosclerotic plaques.

	Without Plaque (n = 64)	With Plaque (n = 234)	p
Sex (male)	36 (53)	175 (76)	0.32
Age (years)	63 (55–76)	67 (60–76)	0.15
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.3 (25.7–30.4)	28.6 (26.1–32.0)	0.13
Abdominal perimeter (cm)	101.5 ± 13.6	104.0 ± 11.1	0.13
Hypertension (yes)	50 (73.5)	165 (71.7)	0.64
Diabetes (yes)	23 (33.8)	96 (41.7)	0.28
Dyslipidaemia (yes)	49 (72.1)	193 (83.9)	0.07
Systolic BP (mmHg)	135.6 ± 18.3	136.3 ± 19	0.77
Diastolic BP (mmHg)	77.6 ± 13.3	79.1 ± 13.9	0.43
HbA1c (%)	5.7 (5.4–6.3)	5.7 (5.5–6.3)	0.81
Cholesterol (mg/dL)	168 (147–203)	169 (148–198)	0.74
HDL-C (mg/dL)	55 (39–67)	50 (42–62)	0.71
LDL-C (mg/dL)	94 (70–127)	91 (72–120)	0.52
Triglycerides (mg/dL)	98 (70–130)	108 (78–149.5)	0.16
Creatinine (mg/dL)	1 (0.8–1.18)	1 (0.8–1)	0.8
Smoking (yes)	9 (13.2)	38 (16.5)	0.51
Alcohol (yes)	7 (10.3)	45 (6.5)	0.08
PREDIMED score	9 (8–10)	9 (7–10)	0.98
SDF1 (ng/mL)	2.5 ± 0.9	2.5 ± 0.7	0.85
MMP12* (pg/mL)	381 (228–591)	424 (261–666)	0.11
CRP* (mg/dL)	0.18 (0.07–0.54)	0.17 (0.08–0.4)	0.16

Continuous parametric variables are shown as mean (standard deviation), non-parametric as median (Interquartile range) and qualitative variables as number (%). \* Logarithmically transformed. BMI: Body mass index, BP: Blood pressure, HbA1c: Glycosylated haemoglobin, HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol, LDL-C: Low-density lipoprotein cholesterol, PREDIMED: PREvención con Dieta MEDiterránea, SDF1: Stromal derived factor 1, MMP12: Matrix metalloproteinase 12, CRP: C-reactive protein.

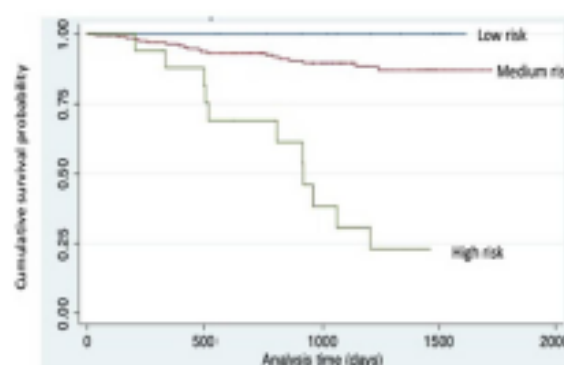
Likewise, no association between the number of territories affected by atherosclerotic plaques and the levels of SDF1, MMP12 and CRP were observed.

### 3.5. Follow-Up Analysis

Patients were followed up for 33.6 months (range 1 day–57.5 months) and 6 patients were lost in follow up (2%). We registered 22 new cardiovascular events and 31 deaths,

being 51.6% directly linked to atherosclerosis, 12.9% associated with cancer, 16.1% related to infections, 6.4% related to haemorrhage and 12.9% due to unknown reasons.

Patients who died during follow up presented increased levels of SDF1 (3.1 (2.6–3.7) ng/mL vs. 2.4 (2.1–2.8) ng/mL,  $p = 0.001$ ), MMP12 (612 (441–951) pg/mL vs. 384 (243–597) pg/mL,  $p = 0.001$ ) and CRP (1.11 (0.35–2.10) mg/dL vs. 0.15 (0.07–0.33) mg/dL,  $p < 0.001$ ). After adjusting by age and sex, those with increased levels of MMP12 or CRP presented an increased risk of death (HR = 3.2 (95%CI: 1.2–9.1),  $p = 0.026$ ; and OR = 8.7 (95%CI: 2–37.9),  $p = 0.004$ ; respectively). Additionally, those with SDF1, MMP12 and CRP in the highest tercile presented an increased risk of death, controlled by age and sex (HR = 3.2 (95%CI: 1.5–7),  $p = 0.004$ ) with a Harrell's-C index of 0.88 (Figure 1).

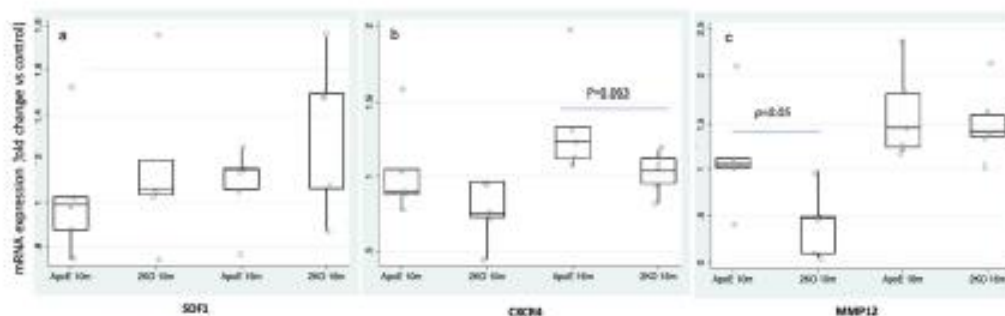


**Figure 1.** Survival according to combined risk variable. Combine risk variable established by the combination of SDF1, MMP12 and CRP. High risk: 3rd tercile SDF1 & MMP12 & CRP ( $n = 27$ ), low risk: 1st tercile SDF1 & MMP12 & CRP ( $n = 15$ ) and medium risk: any other combination ( $n = 256$ ). Kaplan-Meier survival plots are unadjusted for covariates. A log-rank test of survival across risk levels of the combined variable is highly significant ( $p < 0.001$ ).

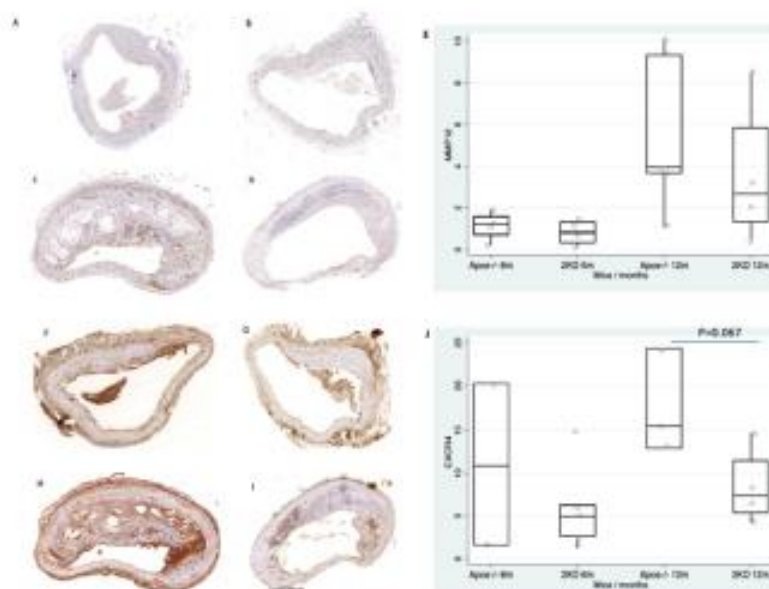
### 3.6. Aortic Expression of SDF1, CXCR4 and MMP12

To further assess the role of inflammatory markers on the atherosclerotic process we analyzed the SDF1/CXCR4 signaling and assessed the SDF1, CXCR4 and MMP12 expression in the aortas of *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Mmp10*<sup>-/-</sup> (2KO) mice. SDF1 expression was similar at 10 and 16 months in both genotypes (Figure 2a), whereas CXCR4 was increased in *Apoe*<sup>-/-</sup> aortas at 16 months (1.4 ± 0.4-fold change vs. 1.0 ± 0.1-fold change,  $p = 0.063$ ) vs. 2KO (Figure 2b). MMP12 in *Apoe*<sup>-/-</sup> was significantly increased earlier, at 10 months (0.4 ± 0.3 vs. 1.1 ± 0.6,  $p = 0.05$ ), while at 16 months no differences between genotypes were found (Figure 2c). These results indicate that animals with higher atherosclerosis have increased aortic expression of CXCR4 and MMP12 genes.

Next, we determined the CXCR4 and MMP12 protein expression in the aortas of *Apoe*<sup>-/-</sup> and 2KO mice at 6 and 12 months of age. Both CXCR4 and MMP12 increased with atherosclerotic progression (Figure 3E,J) but only CXCR4 expression showed a tendency at 12 months (17.6 ± 6 vs. 8.4 ± 4.5,  $p = 0.067$ ) in *Apoe*<sup>-/-</sup> mice as compared with 2KO (Figure 3J).



**Figure 2.** SDF1, CXCR4 and MMP12 expression in murine atherosclerotic aortas. (a) mRNA levels of SDF1 in aortas of *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Mmp10*<sup>-/-</sup> (2KO) mice at 10 and 16 months of age (*n* = 5/time point). (b) Aortic expression of CXCR4 was decreased in 2KO mice (*n* = 5/time point) vs. *Apoe*<sup>-/-</sup> at 16 months. (c) 2KO presented a reduction of MMP12 (*n* = 5/time point) vs. *Apoe*<sup>-/-</sup> at 10 months. \* *p* < 0.05.



**Figure 3.** CXCR4 and MMP12 expression in murine atherosclerotic aortas. Expression of MMP12 in *Apoe*<sup>-/-</sup> mice (A) and 2KO mice (B) at 6 months. Expression of MMP12 in *Apoe*<sup>-/-</sup> mice (C) and 2KO mice (D) at 12 months. (E) Box plot showing the quantification of MMP12 expression in atherosclerotic plaques. Expression of CXCR4 in *Apoe*<sup>-/-</sup> mice (F) and 2KO mice (G) at 6 months. Expression of CXCR4 in *Apoe*<sup>-/-</sup> mice (H) and 2KO mice (I) at 12 months. (J) Box plot showing the quantification of CXCR4 expression in atherosclerotic plaques.

#### 4. Discussion

There is an unmet medical need to search for residual inflammatory risk in patients with atherosclerosis. We report herein that SDF1 may be a good marker of inflammation in CVD as it is significantly elevated in patients with clinical atherosclerosis. Additionally,

higher levels of MMP12 and SDF1 were associated with increased risk of death after 33.6 months of follow up. Moreover, in experimental mice models of atherosclerosis (*Apoe*<sup>-/-</sup>) we confirmed increased expression of CXCR4 and MMP12 in aorta of accelerated atherosclerosis progression as compared with mice with delayed atherosclerosis (*Apoe*<sup>-/-</sup>*Mmp10*<sup>-/-</sup>), suggesting a pathogenic role for these inflammatory markers in atherosclerosis development.

SDF1 is an homeostatic chemokine playing a central role in the hematopoietic cell trafficking [22]. To date, SDF1 levels demonstrated to have prognosis impact for CV recurrence in patients with acute CV events; while we report the novel finding of increased levels in stable CVD, likely related with tissue remodeling and vascular dysfunction [23,24]. Our cohort presented elevated circulating SDF1 levels in patients with previous clinical atherosclerosis manifestations after adjusting for CV risk and other confounding factors.

MMP12 is produced by macrophages and it has been associated with plaque progression and instability [15]. Increased circulating levels of MMP12 have been reported in asymptomatic patients with high CV risk linked to carotid intima media thickness and cerebrovascular events during the follow up [25] as well as with the presence of CAD [26]. In our cohort, MMP12 was elevated in patients with previous atherosclerosis, although the association was lost after adjusting for confounding factors.

In line with previous studies assessing the relevance of a multimarker approach for atherosclerotic risk assessment [27–29], our data indicate that high SDF-1 alone or even better when combined with high CRP levels were strongly associated with prevalent clinical atherosclerosis manifestations. Together, these data, emphasize that beyond the acute event, a residual inflammatory risk can be detected in these patients even if they are treated according to established guidelines.

In addition, the prospective analysis showed that higher levels of SDF1, MMP12 and CRP were associated with death, rendering significantly elevated after adjusting for age and sex MMP12 and CRP. Additionally the risk of death was increased in those with highest levels of all biomarkers, suggesting a potential link between increased residual inflammation and worse prognosis.

Since the underlying mechanism in CVD includes plaque formation, we analyzed the presence of atherosclerosis plaques and their association with the studied biomarkers. However, we did not find an association neither with the extension nor with the localization of the atherosclerotic plaques and any of the studied biomarkers. Previous studies reported association between CRP [30] and atherosclerosis, and MMP12 and atherosclerotic burden [15]. However, the different findings can be related to the heterogeneous characteristic of the populations.

Finally, to assess a possible pathogenic role of these proteins in atherosclerosis development we studied the aortic expression of MMP-12 and CXCR4, the main receptor of SDF1 in an experimental model of atherosclerosis (*Apoe*<sup>-/-</sup> mice) as compared with a model of delayed atherosclerosis (*Apoe*<sup>-/-</sup>*Mmp10*<sup>-/-</sup> mice). We found that the aortic gene and protein expression of CXCR4 was increased in *Apoe*<sup>-/-</sup> mice compared to 2KO. The exact role of CXCR4/SDF1 in atherosclerosis is yet unknown. Some studies have reported that the expression of CXCR4 on macrophages was upregulated by pro-atherosclerotic factors [31,32], whereas other studies found a possible protective role of the CXCR4 in experimental atherosclerosis [33]. Moreover, Merckelbach et al. showed an increase of both CXCR4 and SDF1 in carotid atherosclerotic plaques, mainly in macrophages. Our results are in line with studies showing a proatherogenic role of CXCR4 and strengthened our previous findings of greater macrophage presence and larger atherosclerotic lesions in *Apoe*<sup>-/-</sup> [17,34]. Likewise, MMP-12 gene expression was significantly increased in *Apoe*<sup>-/-</sup> mice compared to 2KO. Interestingly, this MMP has been localized in macrophages associated with elastin and extracellular matrix degradation in atherosclerotic stroke patients [25].

There are some limitations of the study. The modest sample size and the low number of new events during a median follow up of 33 months are important methodological shortcomings. However, these results can be the basis for additional studies in larger



cohorts to confirm these findings. The association between inflammatory markers and death during follow-up does not allow to establish a cause-effect relationship. Despite these limitations, the study shows that individuals with previous clinical atherosclerosis manifestations remain at increased CV risk with persistent elevations of inflammatory biomarkers associated with death during follow-up. Moreover, it is also remarkable that both SDF1 and MMP12 may be targeted by monoclonal antibodies, so they may represent new therapeutic targets in atherosclerotic disease.

## 5. Conclusions

In summary, the present study demonstrates that increased levels of SDF1, MMP12 and CRP identified a subgroup of patients with particularly high inflammatory cardiovascular and mortality risks. Multimarker model assessment and cost-effectiveness analysis are required for these markers in order to be integrated in daily clinical practice. In addition, the association of CXCR4 with atherosclerosis progression suggest that SDF1/CXCR4 signaling could be a possible atherosclerotic target.

**Author Contributions:** M.M.-J. and J.O. designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. F.J.D.M. performed and analyzed immunohistochemistry. A.F.-M. provided patients and analyzed data. I.C., R.R. and J.C.P. provided patients. C.R. and J.A.R. designed experiments and analyzed data and. J.A.P. wrote the manuscript and supervised this study. All authors revised the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work is partially funded by a grant of the “Sociedad Española de Arteriosclerosis” (SEA), Varto S.A. Company and Centro de investigación biomédica en red—enfermedades cardiovasculares (CIBERCV), Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain (CB16/11/00371).

**Institutional Review Board Statement:** The Ethics Review board of the Clinica Universidad de Navarra approved the protocol for human study (2017/240) and the study was conducted in accordance with the declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from each patient. All animal experiments were conducted according to the European Community guidelines for ethical animal care and use of laboratory animals (Directive 86/609) and were approved by the University of Navarra Animal Research Review Committee.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available in accordance with consent provided by participants on the use of confidential data.

**Acknowledgments:** We particularly acknowledge the patients for their participation and the Biobank of the University of Navarra for its collaboration. We want to thank Lara Montori for her technical assistance (Laboratory of Atherothrombosis, CIMA).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The sponsors had no role in the design, execution, interpretation, or writing of the study.

## References

1. Virani, S.S.; Alonso, A.; Aparicio, H.J.; Benjamin, E.J.; Bittencourt, M.S.; Callaway, C.W.; Carson, A.P.; Chamberlain, A.M.; Cheng, S.; Delling, E.N.; et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report from the American Heart Association. *Circulation* **2021**, *143*, e254–e743. [CrossRef] [PubMed]
2. Moore, K.J.; Tabas, I. The Cellular Biology of Macrophages in Atherosclerosis. *Cel* **2011**, *145*, 341–355. [CrossRef] [PubMed]
3. Ridker, P.M.; MacFadyen, J.G.; Everett, B.M.; Libby, P.; Thuren, T.; Glynn, R.J. Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: A secondary analysis from the CANTOS randomised controlled trial. *Lancet* **2018**, *391*, 319–328. [CrossRef]
4. Emerging Risk Factors Collaboration. C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *367*, 1310–1320. [CrossRef] [PubMed]
5. Folsom, A.R.; Pankow, J.S.; Tracy, R.P.; Arnett, D.K.; Peacock, J.M.; Hong, Y.; Djousse, L.; Eckfeldt, J.H.; Investigators of the NHLBI Family Heart Study. Association of C-reactive protein with markers of prevalent atherosclerotic disease. *Am. J. Cardiol.* **2001**, *88*, 112–117. [CrossRef]

6. Páramo, J.A.; Rodríguez Ja, J.A.; Orbe, J. Integrating soluble biomarkers and imaging technologies in the identification of vulnerable atherosclerotic patients. *Biomark. Insights* **2007**, *1*, 165–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Martínez, P.J.; Baldán-Martín, M.; López, J.A.; Martín-Lorenzo, M.; Santiago-Hernández, A.; Agudiez, M.; Cabrerad, M.; Calvo, E.; Vázquez, J.; Ruiz-Hurtado, G.; et al. Identification of six cardiovascular risk biomarkers in the young population: A promising tool for early prevention. *Atherosclerosis* **2019**, *282*, 67–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Braunersreuther, V.; Mach, E.; Steffens, S. The specific role of chemokines in atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* **2007**, *97*, 714–721. [[CrossRef](#)]
9. Gao, J.H.; Yu, X.H.; Tang, C.K. CXCL12 in atherosclerosis: An underlying therapeutic target. *Clin. Chim. Acta* **2019**, *495*, 538–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Ferdousi, V.T.; Mohammadi, M.; Hassanshahi, G.; Khorramdelazad, H.; Falahati-Pour, S.K.; Mizasi, M.; Tavakoli, M.A.; Kamiab, Z.; Ahmadi, Z.; Vazirinejad, R.; et al. Serum CXCL10 and CXCL12 chemokine levels are associated with the severity of coronary artery disease and coronary artery occlusion. *Int. J. Cardiol.* **2017**, *233*, 23–28. [[CrossRef](#)]
11. Sjaarda, J.; Gerstein, H.; Chong, M.; Yusuf, S.; Meyne, D.; Anand, S.S.; Hess, S.; Paré, G. Blood CSF1 and CXCL12 as Causal Mediators of Coronary Artery Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2018**, *72*, 300–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Michineau, S.; Franck, G.; Wagner-Ballon, O.; Dai, J.; Allain, E.; Gervais, M. Chemokine (C-X-C Motif) receptor 4 blockade by AMD3100 inhibits experimental abdominal aortic aneurysm expansion through anti-inflammatory effects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2014**, *34*, 1747–1755. [[CrossRef](#)]
13. Dean, R.A.; Cox, J.H.; Bellac, C.L.; Doucet, A.; Starr, A.E.; Overall, C.M. Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR + CXC chemokines and generates CCL2, -7, -8, and -13 antagonists: Potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx. *Blood* **2008**, *112*, 3455–3464. [[CrossRef](#)]
14. Liu, S.L.; Bajpai, A.; Hawthorne, E.A.; Bae, Y.; Castagnino, P.; Monslow, J.; Puré, E.; Spiller, K.L.; Assoian, R.K. Cardiovascular protection in females linked to estrogen-dependent inhibition of arterial stiffening and macrophage MMP12. *JCI Insight.* **2019**, *4*, e122742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Goncalves, I.; Bengtsson, E.; Colhoun, H.M.; Shone, A.C.; Palombo, C.; Natali, A.; Edsfieldt, A.; Danéç, P.; Færdriksen, G.N.; Björkbacka, H.; et al. Elevated plasma levels of MMP-12 are associated with atherosclerotic burden and symptomatic cardiovascular disease in subjects with type 2 diabetes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2015**, *35*, 1723–1731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Johnson, J.L.; George, S.J.; Newby, A.C.; Jackson, C.L. Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15375–15380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Purnog, A.; Roncal, C.; Orbe, J.; Meilhac, O.; Belzunce, M.; Zalba, G.; Villa-Bellocosa, R.; Andrés, V.; Parks, W.C.; Páramo, J.A.; et al. Matrix metalloproteinase-10 deficiency delays atherosclerosis progression and plaque calcification. *Atherosclerosis* **2018**, *278*, 124–134. [[CrossRef](#)]
18. Orbe, J.; Montero, I.; Rodríguez, J.A.; Belouqui, O.; Roncal, C.; Páramo, J.A. Independent association of matrix metalloproteinase-10, cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis. *J. Thromb. Haemost.* **2007**, *5*, 91–97. [[CrossRef](#)]
19. Bobadilla, M.; Sainz, N.; Abizanda, G.; Orbe, J.; Rodríguez, J.A.; Páramo, J.A.; Prósper, E.; Pérez-Ruiz, A. The CXCR4/SDF1 axis improves muscle regeneration through MMP-10 activity. *Stem. Cells Dev.* **2014**, *23*, 1417–1427. [[CrossRef](#)]
20. Martínez-González, M.A.; García-Arellano, A.; Toledo, E.; Salas-Salvadó, J.; Buil-Cosiales, P.; Corella, D.; Covas, M.I.; Schröder, H.; Arós, F.; Gómez-Gracia, E.; et al. A 14-item mediterranean diet assessment tool and obesity indexes among high-risk subjects: The PREDIMED trial. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e43134. [[CrossRef](#)]
21. Schindelin, J.; Arganda-Carrera, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Püschel, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Teicher, B.A.; Fricker, S.P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 2927–2931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Tong, G.; Wang, N.; Zhou, Y.; Leng, J.; Gao, W.; Tong, X.; Shen, Y.; Yang, J.; Ye, X.; Zhou, L.; et al. Role of Stromal Cell-Derived Factor-1 in Patients With Non-ST Elevation Acute Coronary Syndrome. *Int. Heart J.* **2014**, *55*, 219–227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Matsuoka, S.; Uematsu, M.; Nakamura, T.; Shimizu, T.; Futamata, M.; Obata, J.-E.; Fujioka, D.; Nakamura, K.; Yoshizaki, T.; Kugiyama, K. High levels of stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  predict secondary cardiac events in stable patients with a history of myocardial infarction. *J. Cardiol.* **2017**, *69*, 320–325. [[CrossRef](#)]
25. Mahdavian, H.; Perisic Matic, L.; Lennquist, M.; Gertow, K.; Senoblad, B.; Baldassarre, D.; Veglia, E.; Humphries, S.E.; Rauramaa, R.; de Faire, U.; et al. Integrative studies implicate matrix metalloproteinase-12 as a culprit gene for large-artery atherosclerotic stroke. *J. Intern. Med.* **2017**, *282*, 429–444. [[CrossRef](#)]
26. Jguirim-Souissi, I.; Jelassi, A.; Addad, E.; Hassine, M.; Najah, M.; Ben Hamda, K.; Maatouk, F.; Ben Farhat, M.; Bouskema, A.; Rouis, M.; et al. Plasma Metalloproteinase-12 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Levels and Presence, Severity, and Outcome of Coronary Artery Disease. *Am. J. Cardiol.* **2007**, *100*, 23–27. [[CrossRef](#)]
27. Cummings, D.M.; King, D.E.; Mainous, A.G.; Geesey, M.E. Combining serum biomarkers: The association of C-reactive protein, insulin sensitivity, and homocysteine with cardiovascular disease history in the general US population. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **2006**, *13*, 180–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Vassalle, C. New biomarkers and traditional cardiovascular risk scores: Any crystal ball for current effective advice and future exact prediction? *Clin. Chem. Lab. Med.* **2018**, *56*, 1803–1805. [[CrossRef](#)]
29. Wang, J.; Tan, G.-J.; Han, L.-N.; Bai, Y.-Y.; He, M.; Liu, H.-B. Novel biomarkers for cardiovascular risk prediction. *J. Geriatr. Cardiol.* **2017**, *14*, 135–150.

30. Cozlea, D.; Farcas, D.; Nagy, A.; Keresztesi, A.; Tifnea, R.; Cozlea, L.; Carasca, E. The impact of C reactive protein on global cardiovascular risk on patients with coronary artery disease. *Curr. Heal Sci. J.* **2013**, *39*, 225–231.
31. Döring, Y.; Pawig, L.; Weber, C.; Noels, H. The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. *Front Physiol.* **2014**, *5*, 212. [[PubMed](#)]
32. Irvine, K.M.; Andrews, M.R.; Fernandez-Rojo, M.A.; Schroder, K.; Burns, C.J.; Su, S.; Wilks, A.F.; Parton, R.G.; Hume, D.A.; Sweet, M.J. Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) delivers a proatherogenic signal to human macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **2009**, *85*, 278–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Döring, Y.; Noels, H.; van der Vorst, E.P.C.; Neideck, C.; Egge, V.; Drochak, M.; Mandl, M.; Pawig, L.; Jansen, Y.; Schröder, K.; et al. Vascular CXCR4 Limits Atherosclerosis by Maintaining Arterial IntegrityClinical Perspective. *Circulation* **2017**, *135*, 388–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Merckelbach, S.; Van Der Vorst, E.P.C.; Kallmayer, M.; Rischpler, C.; Burgkart, R.; Döring, Y.; de Boer, G.J.; Schwaiger, M.; Eckstein, H.-H.; Weber, C.; et al. Expression and Cellular Localization of CXCR4 and CXCL12 in Human Carotid Atherosclerotic Plaques. *Thromb. Haemost.* **2018**, *118*, 195–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Marcos-Jubilar M et al. Análisis de subpoblaciones monocitarias en relación con los factores de riesgo cardiovascular. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*. July-August 2019; 31(4): 152-159. doi: 10.1016/j.arteri.2019.02.003