

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 475**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2008** **E 15176660 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017** **EP 2995957**

54 Título: **Biomarcadores de futuros eventos cardíacos**

30 Prioridad:

10.09.2007 GB 0717637

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
22.03.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT LEIDEN (50.0%)
Rapenburg 70
2311 EZ Leiden, NL y
ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN ACTING
UNDER THE NAME LEIDEN UNIVERSITY
MEDICAL CENTER (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BIESSEN, ERICUS ANNA LEONARDUS;
VAN BERKEL, THEODORUS JOSEPHUS
CORNELIS y
KRAAIJEVELD, ADRIAAN OTTO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 660 475 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Biomarcadores de futuros eventos cardíacos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la identificación de biomarcadores de quimiocina CCL18 y opcionalmente CCL5 predictivos de futuros síndromes coronarios agudos que incluyen angina de pecho inestable (API).

Antecedentes a la invención

Los síndromes coronarios agudos, que incluyen angina de pecho inestable (API), están asociados a una alta morbilidad y mortalidad. En general, la API resulta de la erosión o rotura de una placa aterosclerótica vulnerable superpuesta por formación oclusiva de trombo e isquemia distal¹. La aterosclerosis se considera cada vez más un trastorno dislipidémico con un fuerte carácter inflamatorio². Estos procesos inflamatorios están en parte orquestados por quimiocinas, que participan en el proceso inflamatorio mediando en el reclutamiento de monocitos a sitios de lesión, proliferación celular de músculo liso vascular, neovascularización y activación de plaquetas³⁻⁵. Además, parece que las quimiocinas también desempeñan una función en la isquemia cardíaca. De hecho, se informó que la isquemia condujo a expresión inducida de quimiocinas en el miocardio o en la circulación, que se traduce en el reclutamiento de subconjuntos de leucocitos y células progenitoras a la zona de lesión para contribuir a la reparación de la lesión⁶. Dado su diverso y profundo impacto en enfermedades cardiovasculares, las quimiocinas podrían no solo servir de biomarcadores de aterosclerosis, rotura de placas o isquemia, sino también representar atractivas dianas terapéuticas⁷.

Hasta la fecha se han caracterizado aproximadamente 50 quimiocinas y se observa que diversas están implicadas en aterosclerosis y aterotrombosis⁸. De hecho, ya se ha mostrado en diversos estudios que los niveles en plasma de Regulada por la activación de linfocitos T normales expresados y secretados (RANTES o CCL5), fractalquina (CX3CL1) y proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1 o CCL2) se alteran en API o infarto de miocardio⁸⁻¹¹. Sin embargo, faltan datos prospectivos sobre los niveles en plasma de quimiocinas y/o la expresión de receptores de quimiocinas por subconjuntos de leucocitos circulantes en síndromes coronarios agudos. Además, no se ha explotado el uso de tales quimiocinas como marcadores de futuros eventos coronarios. Ardigo y col. (2007; Physiol. Genomics vol. 31 p 402-409), Parissis y col. (2002; Int. J. Cardiol, vol. 83 p 13-21) y de Jager y col. (2005; Circulation vol. 112, 17 Suppl. S) desvelan CCL3 como un biomarcador para enfermedad cardíaca aterosclerótica, hipertensión arterial e infarto de miocardio inminente, respectivamente. Kraaijeveld y col. (2007; Current Pharmaceutical Design vol. 13 p 1039-1152) desvelan la expresión de CCL18 en placas.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en un estudio para evaluar los niveles de 11 quimiocinas en angina de pecho inestable resistente. Los inventores examinaron los patrones en plasma de quimiocinas iniciales de una cohorte prospectiva de pacientes con angina de pecho inestable por un ensayo múltiplex de alto rendimiento, que permite la cuantificación simultánea de múltiples quimiocinas en una única muestra de plasma¹². Para el análisis prospectivo, se analizaron quimiocinas diferencialmente expresadas en el nivel inicial en muestras de seguimiento por ELISA. Además, se examinaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) para la expresión de receptores de quimiocinas.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona el uso de la quimiocina CCL18 y opcionalmente CCL5 como un biomarcador para la identificación de si un sujeto de prueba está o no en riesgo elevado de un síndrome o evento cardiovascular agudo.

CCL3 también se conoce como MIP-1 α (proteína alfa inflamatoria de macrófagos) y LD78a/b; CCL18 también se conoce como PARC, DC-CK-1, AMAC-1 o MIP-4; y CCL-5 también se conoce como RANTES regulada por la activación de T normales expresados y secretados y SISd.

El síndrome o evento cardiovascular puede comprender enfermedad de las arterias coronarias, aterosclerosis, infarto agudo de miocardio, arteriosclerosis, angina de pecho inestable (API), embolia, trombosis venosa profunda, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca congestiva o arritmia.

Biomarcador como se usa en la presente invención significa que el nivel de CCL18, y opcionalmente CCL5 como se determina (por ejemplo, detecta y/o cuantifica) en muestra de tejido o una muestra de un líquido corporal de un individuo, es un indicador predictivo para un futuro trastorno cardiovascular agudo como tal y/o para monitorizar el estado y/o progresión de un trastorno. La detección de tales biomarcadores también puede usarse para monitorizar pautas terapéuticas y/o ensayos clínicos con el fin de detectar si un tratamiento particular puede o no ser eficaz.

Las citocinas anteriormente mencionadas pueden identificarse en una muestra de líquido corporal de un sujeto, o en células obtenidas de un sujeto, tales como, por ejemplo, de una placa aterosclerótica. La muestra de un líquido corporal de un individuo puede derivar de sangre, por ejemplo células mononucleares aisladas, o de una fracción de sangre, por ejemplo plasma o suero, especialmente plasma. Para los fines de los aspectos y realizaciones

anteriores, el sujeto puede ser un animal humano o cualquier otro animal. En realizaciones particulares, el sujeto está seleccionado del grupo que consiste en primate humano, no humano, equino, bovino, ovino, caprino, leporino, aviar, felino o canino.

- 5 CCL18 y/o CCL5, como se usan en el presente documento, incluyen proteína de longitud completa, un fragmento de proteína, una proteína mutada, derivados y células secretoras (productoras), por ejemplo leucocitos y receptores de los mismos. Fragmentos, mutantes y derivados de dichas quimiocinas son tales que se retiene la característica de biomarcador de las quimiocinas.

- 10 El uso de las quimiocinas anteriormente mencionadas como biomarcadores según la presente invención significa que una o más de dichas quimiocinas se determina en dicha muestra de un individuo, por ejemplo, con medios de detección que incluyen aquellos que son convencionales en el campo de los ensayos, por ejemplo inmunoensayos, las quimiocinas se detectan por un inmunoensayo tal como inmunoensayos asociados a enzimas (ELISA); ensayos basados en fluorescencia, tales como fluoroinmunoensayo de lantánidos potenciado por disociación (DELFI), ensayos radiométricos, inmunoensayos múltiplex o ensayos de perlas citométricas (CBA); sensores. Los medios de detección de la presente invención incluyen, por ejemplo, una molécula que reconoce específicamente la quimiocina particular, por ejemplo una molécula que es directamente o indirectamente detectable. Medios de detección de la presente invención comprenden preferentemente un anticuerpo, que incluye derivados de anticuerpo o fragmentos de los mismos, por ejemplo un anticuerpo que reconoce dicha(s) quimiocina(s), por ejemplo, un anticuerpo que reconoce quimiocina que lleva marca.

- 20 La marca puede ser una convencional, por ejemplo biotina o una enzima tal como fosfatasa alcalina (AP), peroxidasa de rábano picante (HRP) o peroxidasa (POD), o una molécula fluorescente, por ejemplo un colorante fluorescente, tal como, por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína. La molécula que lleva la marca, por ejemplo el anticuerpo que lleva la marca, puede detectarse según procedimientos convencionales, por ejemplo mediante mediciones de fluorescencia o procedimientos de detección de enzimas.

- 25 Pueden determinarse células secretoras de CCL18 y/o CCL5 en una muestra de un líquido corporal de un individuo, por ejemplo sangre, usando procedimientos convencionales tales como, por ejemplo, como se describen a continuación. Pueden purificarse células, por ejemplo separarse por un gradiente de densidad, de la muestra, por ejemplo sangre, y las células purificadas obtenidas se tiñen. Los anticuerpos anti-CCL 18/5, por ejemplo anticuerpos anti-CCL 18/5 marcados con fluorescencia, pueden añadirse a la preparación de células teñidas, opcionalmente después de la estimulación de las células, por ejemplo con interleucina-4, y determinarse el nivel de secreción de CCL 18/5 por las células o células que secretan CCL 18/5, o determinarse la expresión de receptor(es) de CCL18 y opcionalmente CCL5.

- 35 Opcionalmente, CCL18 y opcionalmente CCL5 comprendidos en la muestra o CCL 18/5 que reconoce, por ejemplo, molécula detectable comprendida en los medios de detección, puede inmovilizarse en una fase sólida. Una fase sólida apropiada incluye, por ejemplo, una convencional, por ejemplo una placa de plástico como una placa de poliestireno o polivinilo, especialmente una placa de microtitulación. También pueden usarse microperlas como fase sólida, por ejemplo microperlas recubiertas. La fase sólida puede recubrirse con un material de recubrimiento cuya naturaleza depende, por ejemplo, de la marca comprendida en los medios de detección. El material de recubrimiento debe ser capaz de unirse a la marca, por ejemplo la marca puede ser biotina y el material de recubrimiento incluye estreptavidina, por ejemplo covalentemente unida a la fase sólida.

- 40 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para predecir si un individuo está o no en riesgo elevado de un futuro síndrome o trastorno cardiovascular agudo, procedimiento que comprende:

- a) proporcionar una muestra de un líquido corporal de un individuo;
b) determinar un nivel de CCL18 y opcionalmente CCL5 en la muestra;
c) comparar el nivel de CCL18 y opcionalmente CCL5 como se determinó en la etapa b) con un nivel de
45 referencia de una muestra de un líquido corporal de un individuo sano de control; y
d) detectar si el nivel de dicha CCL18 y opcionalmente CCL5 como se determinó en la etapa b) es significativamente diferente de dicho nivel de referencia y, por lo tanto, si un individuo está o no en riesgo elevado de un síndrome o trastorno cardiovascular agudo.

- 50 Como se ha mencionado anteriormente, también puede determinarse el receptor de quimiocinas apropiado, por ejemplo por análisis de FACS, usando un anticuerpo, preferentemente marcado, que reconoce específicamente el receptor.

- La determinación de CCL18 y opcionalmente CCL5 se lleva a cabo como se ha descrito anteriormente, por ejemplo usando una molécula que reconoce específicamente el biomarcador, por ejemplo un anticuerpo, un derivado de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, tal como por ejemplo un anticuerpo anti-CCL18, por ejemplo un anticuerpo específico contra CCL18 comercialmente disponible, por ejemplo por un procedimiento de ensayo
55 inmunodiagnóstico.

Con el fin de potenciar adicionalmente la sensibilidad y/o selectividad del potencial de diagnóstico de las quimiocinas anteriormente mencionadas como biomarcadores, pueden usarse los procedimientos descritos en el presente

documento conjuntamente con la evaluación de síntomas clínicos y/o con la determinación del nivel de al menos otro biomarcador en el sujeto, en el que la cantidad del al menos otro biomarcador también puede ser indicativo de enfermedad cardiovascular o una predisposición a la misma. El (Los) biomarcador(es) adicional(es) pueden seleccionarse de otras quimiocinas o citocinas y factores de riesgo que han sido indicados como biomarcadores de enfermedad, tales como CXCL 10 (IP-10), proteína C reactiva, troponina 1, creatina cinasa, creatina cinasa MB, CD40L, HDL, ESR, número de plaquetas, sexo, un índice cardíaco, mioglobina y/o interleucina-6 (realización preferida), o cualquier otro biomarcador más o menos predictivo de trastornos cardiovasculares. Se desvela un procedimiento de monitorización de la eficacia terapéutica del tratamiento de un individuo con una sustancia que se espera tenga un efecto sobre la reducción o cura de un trastorno de SCA o enfermedad, procedimiento que comprende determinar el nivel de CCL3 y/o CCL18 y opcionalmente CCL5 o receptor(es) de los mismos en una muestra de un líquido corporal de dicho individuo y compararlo con el nivel de CCL3 y/o CCL18 y opcionalmente CCL5 antes de la administración de dicha sustancia. Adicionalmente se desvela un procedimiento de modulación de una respuesta de quimiocinas en un vertebrado que padece o predispuesto a padecer un síndrome cardiovascular agudo (SCA) que comprende la etapa de aumentar o disminuir, o alterar de otro modo, la actividad funcional de CCL3 y/o CCL18.

El término "modular una quimiocina" en el contexto de la presente invención también incluye dentro de su alcance prevenir sustancialmente o inducir deliberadamente en un vertebrado la actividad funcional de quimiocinas.

El término "prevenir o inducir deliberadamente la actividad funcional de quimiocinas" en el contexto de la presente invención incluye dentro de su alcance aumentar o disminuir la expresión y/o distribución intracelular o extracelular y/o actividad de al menos una quimiocina como se describe en el presente documento.

El aumentar la expresión puede producirse como resultado de aumentar la expresión de ARNm, o aumentar la transcripción génica usando procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia. Aquellos expertos en la materia apreciarán que hay muchos procedimientos adecuados para aumentar o disminuir la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una quimiocina como se describe en el presente documento.

Un experto en la materia apreciará que la expresión o función de una o más quimiocinas puede aumentarse o disminuirse aumentando o disminuyendo los niveles de ARNm de quimiocina, respectivamente, por modulación post-transcripcional. Por ejemplo, puede usarse ARN interferente como procedimiento para reducir los niveles de ARN de quimiocina.

El aumentar o disminuir la distribución intracelular puede producirse como resultado de la adición de proteínas de unión de quimiocina al entorno intracelular. Alternativamente, la distribución intracelular puede aumentarse, disminuirse o alterarse mediante la adición o eliminación de secuencias señal y/o secuencias conductoras a la quimiocina. Técnicas usadas en tales procedimientos serán familiares para aquellos expertos en la materia.

El aumentar o disminuir la actividad de las quimiocinas puede provocarse poniendo las quimiocinas en contacto con inhibidores de quimiocinas, o activadores de quimiocinas y/o moléculas de unión de quimiocina. Ejemplos incluyen anticuerpo, fragmento de anticuerpo o nanocuerpo; quimiocina genéticamente/químicamente modificada o porción de quimiocina con actividad de agonista o antagonista; una entidad molecular pequeña sintética; o cualquier otra proteína (de mamífero, viral o bacteriana) con capacidad de modificar la actividad de CCL3, CCL5 o CCL18. El término "contacto" en el contexto de la presente invención significa que no requiere un contacto físico. Es suficiente un contacto funcional, que es donde la presencia del inhibidor o activador o proteína de unión de quimiocina afecta la actividad de la quimiocina. Esto puede producirse cuando, por ejemplo, una tercera proteína media en la interacción/contacto entre la molécula de unión de quimiocina y la quimiocina. Es decir, la interacción es indirecta.

Inhibidores y activadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de receptores de quimiocina. Un experto en la materia conocerá inhibidores o activadores adecuados. Además, co-factores o moléculas de unión de quimiocina pueden afectar su actividad. Ejemplos incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos (por ejemplo Fab, F(Ab')₂, Fv, Fv unido por disulfuro, scFv, diacuerpo). Se apreciará que esta lista no es ni mucho menos exhaustiva.

En un aspecto adicional se proporciona un cribado para identificar un modulador de CCL3 y/o CCL18 para posible uso en el tratamiento de SCA, tal como API, comprendiendo el cribado las etapas de:

proporcionar *in vitro* una célula capaz de expresar CCL3 y/o CCL18;
poner en contacto una molécula de modulador de prueba con dicha célula;
someter dicha célula a condiciones por las que la célula normalmente expresaría CCL3 y/o CCL18 en ausencia de la molécula de prueba y;
detectar si la molécula de prueba tiene o no un efecto modulador sobre la actividad de CCL3 y/o CCL18.

El efecto modulador es preferentemente un efecto inhibidor sobre la actividad de CCL3 y/o CCL18 y puede, por ejemplo, referirse a niveles de expresión de ARNm que codifican dichas quimiocinas, o a niveles de proteína observados. Tales niveles pueden ser fácilmente determinados por el destinatario experto, usando técnicas muy conocidas para el experto y como se describen en el presente documento. Normalmente, puede realizarse un control, comprendiendo el control una célula a la que la molécula de prueba no se ha añadido, con el fin de obtener

un nivel de referencia de CCL3 y/o CCL18.

Células convenientes para su uso en un procedimiento tal incluyen leucocitos o neutrófilos.

Según los aspectos anteriores, la actividad funcional de CCL3 y/o CCL18 se modula ventajosamente usando uno cualquiera o más de los procedimientos seleccionados del grupo que consiste en: administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de dicha/s quimiocina/s al vertebrado; administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de uno o más inhibidor/es de dicha(s) quimiocina(s) al vertebrado; modular la transcripción de dicha(s) quimiocina(s) en el vertebrado; modular la traducción de quimiocina(s) en el vertebrado; modular la modificación post-traduccional de quimiocina(s) en el vertebrado y modular la distribución intracelular o extracelular de dicha(s) quimiocina(s) en el vertebrado. La actividad funcional de dicha(s) quimiocina(s) se modula administrando una cantidad farmacéuticamente eficaz de uno o más inhibidor/es de dicha(s) quimiocina(s) al vertebrado. Ventajosamente, los uno o más inhibidor/es de quimiocinas están seleccionados del grupo que consiste en: inhibidores químicos de quimiocinas, anticuerpos anti-quimiocinas y mutantes negativos dominantes de aquellas una o más quimiocinas descritas en el presente documento.

Puede modularse la actividad funcional de una o ambas quimiocinas. Un experto en la materia apreciará que estas quimiocinas pueden actuar en aislamiento o sinérgicamente. Además, puede haber redundancia funcional en la actividad de quimiocinas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá ahora adicionalmente a modo de ejemplo y con referencia a las figuras que muestran:

Figura 1: Niveles en plasma de CCL5 y CCL18 como se ha determinado por múltiplex en pacientes estabilizados y resistentes con angina de pecho inestable a $t=0$ (A). Se usó ELISA para la distribución temporal a $t=0$, $t=2$ y $t=180$ días. Los niveles de CCL5 disminuyeron significativamente a $t=2$ y estuvieron al mismo nivel a $t=180$ (B), mientras que los niveles de CCL18 siguieron elevados a $t=2$ y disminuyeron de nuevo a $t=180$ (C). Niveles de CD40L soluble alcanzaron un máximo a $t=0$ y disminuyeron a $t=2$ y $t=180$ (D). Los niveles de CRP mostraron un pico a $t=2$, y disminuyeron a valores inferiores a los iniciales ($t=0$) a $t=180$ (E). Los valores representan media $\pm$ EEM, * $P<0,05$, ** $P<0,001$ y N. S. = no significativo.

Figura 2: Los niveles en plasma de cuartiles superiores de CCL5 y CCL18 estuvieron significativamente asociados a la aparición de síntomas isquémicos resistentes en angina de pecho inestable, mientras que los niveles de cuartiles de sCD40L y CRP no mostraron ninguna correlación significativa (A). Los niveles de cuartiles superiores de CCL5 en el día 0 son predictivos de la necesidad de futuros procedimientos de revascularización (B), mientras que los niveles de cuartiles superiores de CCL18 fueron predictivos de síndromes coronarios agudos o síntomas recurrentes de angina de pecho inestable en el plazo de los siguientes 18 meses (C,D). * $P=0,02$, ** $P=0,01$, # $P<0,01$ y N.S. = no significativo.

Figura 3: Análisis de PCR cuantitativa mostraron una expresión notablemente desregulada por disminución de CCL5 y CCL18 en CMSP no estimuladas de pacientes con síntomas isquémicos a $t=0$ en comparación con CMSP a $t=180$ (A). A diferencia de la expresión de proteínas superficiales del receptor de quimiocinas en CMSP, la expresión de ARNm de los receptores de CCL5 y CCL18 CCR1, CCR3, CCR4 y CCR5 también fue aproximadamente al menos 2 veces desregulada por disminución en el nivel inicial (B). Los valores representan media $\pm$ EEM, * $P<0,05$ y ** $P<0,001$.

Figura 4: La expresión de proteínas en CMSP de CCR3 y CCR5 mostró una clara regulación por incremento de ambos receptores en células CD14⁺ (A,B) y células CD3⁺ (C,D) en el nivel inicial. La triple modulación para CD14, CD3 y CCR3/5 reveló la misma tendencia, aunque las células CD14⁺ presentaron regulación por incremento más prominente de la expresión de CCR3 y CCR5 que las células CD3⁺ (E,F). El análisis de la expresión superficial total de CCR3 y CCR5 en todas las CMSP también mostró una espectacular regulación por incremento de la expresión de CCR3 y CCR5, que indica que el aumento en la expresión de CCR3 y CCR5 es solo parcialmente producido por células CD3⁺ y CD14⁺ positivas (G,H,I). * $P<0,05$, ** $P<0,01$ y # $P<0,001$.

Figura 5: La estimulación de CMSP durante 6 horas con rCCL5 y sCCL18 no mostró diferencias significativas en la expresión de ARNm de CCR1 (A), CCR4 (C) y CCR5 (D). La expresión de CCR3 fue notablemente desregulada por disminución después de la estimulación con sCCL18, pero no con rCCL5 (B). Los valores representan media $\pm$ EEM, * $P<0,01$, N.S. = no significativo, rCCL5 = CCL5 recombinante, sCCL18 = CCL18 sintético.

Figura 6: Evaluación de la interacción heterófila entre CCL5 y CCL18 en PAGE (18 %). Los carriles 1 y 2 muestran la movilidad de referencia de rCCL5 (7.851 kDa) y sCCL18 (7.855 kDa), ambas quimiocinas mostraron una mala tendencia a formar homodímeros de 15,6 kDa. Los carriles 3 y 4 se cargaron con mezclas de rCCL5 y sCCL18 a una relación 1:1 y 1:5 (p:p), a la que los dímeros han sido reticulados por incubación durante 30 min a TA con paraformaldehído 25 mM. Obsérvese la movilidad electroforética ligeramente más alta y la tinción ligeramente más amarillenta del monómero y dímero de CCL18. No se alteró el grado de formación de dímero después de la co-incubación y posterior reticulación de CCL5 y CCL18, que indica que CCL5 y CCL18 no están probablemente empleadas en ninguna interacción cruzada heterófila significativa incluso a concentraciones supra-fisiológicas. La carga de proteína total por carril fue constante (2 μ g)(A).

Figura 7: Se corroboró el análisis de PAGE por análisis de EM MALDI-TOF: CCL5 y CCL18 (10 pmol/ μ l) dieron

picos de masa a aproximadamente 7.860 Da (M^+ ; masa teórica de CCL5 y CCL18 7.851 y 7.855 Da, respectivamente), con solo picos menores a aproximadamente 15.730 Da, que ilustran la baja tendencia para formar homodímeros (M_2^+) (A,B). La espectrometría de masas MALDI-TOF de CCL18 que había sido pre-incubada con CCL5 a una relación 1:1 y 1:5 p:p (concentración total 10 pmol/μl) en HEPES 50 mM / EDTA 0,1 mM con paraformaldehído dio un patrón esencialmente similar y la formación de dímeros fue igualmente mínima a ambas relaciones (C,D).

Figura 8: Los niveles totales de células CD14⁺ (monocitos y neutrófilos) no se diferenciaron entre $t=0$ y $t=180$, mientras que células CD3⁺ mostraron una disminución pequeña (11,8 %), aunque significativa, en el nivel inicial (A). Al nivel de ARNm, se observó un aumento de neutrófilos HNP-3+, que sugiere la liberación potenciada de neutrófilos post-isquémica. Sin embargo, la relación de expresión de CCR2: CX3CR1, una medida del perfil de subconjunto de monocitos, no estuvo diferencialmente regulada (B). Los valores representan media $\pm$ EEM, * $P=0,01$, ** $P<0,001$ y N.S.= no significativo.

Figura 9: Demuestra que una exposición transitoria de ratones a niveles elevados de CCL18 en la circulación (como se efectúa por la administración repetida de proteína CCL18 recombinante) agravará el desarrollo de aterosclerosis y así potenciará el riesgo de enfermedad cardiovascular.

Figura 10: Demuestra que el desarrollo de placas ateroscleróticas en el seno aórtico de ratones hiperlipidémicos (LDLr^{-/-}) con una deficiencia de CCL3 es bruscamente reducida.

Figura 11: Niveles de CCL3 circulantes en APRAS fueron comparables a aquellos observados en pacientes de la cohorte MISSION! (A). La monitorización de CCL3 temporal muestra claramente el aumento transitorio de CCL3 durante la isquemia, ya que los niveles fueron significativamente reducidos a $t=180$ en comparación con $t=0$ (B). * $P=0,03$ y ** $P<0,001$.

Figura 12: Niveles de cuartiles superiores de CCL3 en el nivel inicial son predictivos de la aparición de síndromes coronarios agudos durante el seguimiento (A). Además, los niveles de cuartiles superiores también fueron indicativos de síntomas isquémicos recurrentes durante o directamente después de la hospitalización (B). * $P=0,01$ y ** $P<0,01$.

Figura 13: Niveles en plasma de CCL3 (A), CCL5 (B) y CXCL8 (C) fueron significativamente elevados en pacientes con IAM (●) frente a controles (○), mientras que CXCL10 (D) mostraron el patrón opuesto. * $P=0,025$, ** $P=0,006$, *** $P=0,02$ y # $P=0,004$.

Figura 14: Evaluación de los niveles de IL-6, CCL3 y CXCL10 en ratones ligados en LAD o con operación simulada. La isquemia cardíaca indujo niveles significativamente elevados de IL-6, y CCL3, (A,B). Por otra parte, CXCL10 presentó un patrón invertido (C). * $P=0,007$, ** $P=0,02$, y *** $P=0,03$.

Figura 15: Ratones ligados presentaron un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos T circulantes con un enriquecimiento concomitante en los subconjuntos CCR5⁺ y CXCR3⁺ (A-C). El aumento en linfocitos T circulantes estuvo acompañado de una disminución en los linfocitos T esplénicos CCR5⁺, mientras que no fueron evidentes efectos sobre linfocitos T esplénicos totales o CXCR3⁺ (D-F). * $P=0,04$, ** $P=0,02$, *** $P=0,04$ y $P=0,004$.

La Figura 16 muestra que la distribución temporal de la expresión de CCL3 en placas de la arteria carótida inducidas por collar mostró elevada producción de CCL3 2 semanas después de la colocación del collar (A). Se observó inducción rápida y estacionaria para el marcador de macrófagos CD68 (B), mientras que la inducción de CD36 fue algo retardada (C). ** $p<0,01$ en comparación con el nivel inicial ($t=0$).

La Figura 17 muestra que la expresión de CCL3 en macrófagos está fuertemente regulada por incremento tras la estimulación con LPS (50 ng/ml) (A) pero no ox-LDL (10 μg/ml) (B). La respuesta de CCL3 inducida por LPS *in vivo* se suprime en quimeras CCL3^{-/-} (C, barras negras) *** $p<0,001$.

La Figura 18 muestra que las lesiones ateroscleróticas fueron significativamente más pequeñas en quimeras CCL3^{-/-} en comparación con controles WT (A con imágenes representativas). El contenido de macrófagos (B), colágeno (C) y linfocitos T (D) fue similar entre WT y quimeras CCL3^{-/-}. Se atenuó significativamente la entrada de neutrófilos (E) y la adhesión (F) en quimeras CCL3^{-/-}. Las barras negras representan controles WT y las barras blancas quimeras CCL3^{-/-}. * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

La Figura 19 muestra que el número total de glóbulos blancos (A) y monocitos (B) no era diferente en ratones CCL3^{-/-}, mientras que los números de neutrófilos (C) fueron significativamente reducidos. Barras negras representan WT y barras blancas quimeras CCL3^{-/-}. ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

La Figura 20 muestra la cinética de la leucopenia transitoria inducida por ciclofosfamida (A) y neutropenia (B) en ratones de control (barras blancas) y CCL3^{-/-} (barras negras). La eliminación de neutrófilos es acelerada en las quimeras CCL3^{-/-} (C), mientras que la repoblación es similar (D). Las barras negras representan ratones WT y las barras blancas representan ratones CCL3^{-/-}. * $p<0,05$. ** $p<0,01$.

La Figura 21 muestra que la inyección intraperitoneal de KC no afectó los números de neutrófilos CD11b⁺ CD71⁺ Gr1^{alt} circulantes en ratones WT y CCL3^{-/-} (A). KC provocó que la inducción de la entrada de neutrófilos a la cavidad peritoneal fuera $\approx 2,5$ veces más baja en ratones CCL3^{-/-} en comparación con ratones WT (B). Las barras negras representan ratones WT y las barras blancas representan ratones CCL3^{-/-}. ** $p=0,003$,

Ejemplo 1: CCL5 (RANTES) y CCL18 (PARC) son marcadores específicos de angina de pecho inestable resistente y aumentan transitoriamente durante síntomas isquémicos graves.

Procedimientos

Población del estudio

Se determinaron todas las quimiocinas y parámetros inflamatorios en muestras de plasma de una cohorte de pacientes, derivada del estudio bien definido APRAIS (Reacción de fase aguda y síndromes isquémicos)¹³. En resumen, se incluyeron 54 pacientes que fueron ingresados en el servicio de urgencias del Centro médico de la Universidad de Leiden entre marzo y septiembre de 1995 con angina de pecho inestable Braunwald clase IIIB y fueron seguidos durante hasta 18 meses. Se obtuvieron muestras de sangre venosa al ingreso ($t=0$), después de 2 ($t=2$) y 180 días después del ingreso ($t=180$), se centrifugaron y se almacenaron alícuotas de plasma a -80°C hasta el posterior análisis. Todos los pacientes habían recibido terapia médica convencional, es decir, aspirina 300 mg por vía oral, nitroglicerina por vía intravenosa e infusión de heparina basada ajustada al tiempo de tromboplastina parcial activado. Un punto final clínico del estudio APRAIS fue la aparición de angina de pecho inestable resistente durante la hospitalización. La angina de pecho inestable se consideró resistente si la angina en reposo, a pesar del tratamiento médico, siguió o volvió a aparecer, provocando evaluación coronaria invasiva y posterior terapia de revascularización. Aunque la cohorte de estudio fue relativamente pequeña, constituyó una población bien documentada claramente definida con un punto de partida similar. Todos los sujetos dieron el consentimiento informado por escrito y el protocolo del estudio fue autorizado por el Comité ético del Centro médico de la Universidad de Leiden.

Aislamiento de células

Se aislaron CMSP de pacientes ($t=0$ y $t=180$), además de 6 voluntarios sanos de la misma edad de muestras de sangre venosa con EDTA mediante centrifugación de densidad en Histopaque (Sigma, St. Louis, MO). Las CMSP se recogieron de la interfase y se lavaron dos veces con medio de cultivo, que consistía en medio Dulbecco modificado con Iscove que contenía Glutamax (Gibco, Paisly, RU) y complementado con 10 % de FCS. Las CMSP se crioconservaron en medio de cultivo que contenía 20 % de FCS y 10 % de sulfóxido de dimetilo hasta uso adicional.

Ensayo múltiple de quimiocinas

Se determinaron los niveles circulantes de las quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5, CCL11, CCL17, CCL18, CCL22, CXCL8, CXCL9, CXCL10 y el factor de tipo quimiocina MIF, las citocinas OSM, IFN- γ y OPG y moléculas de adhesión sRankl, sVCAM y sICAM en muestras a $t=0$ con un bioensayo múltiple hecho a medida usando el sistema Bio-Plex Suspension Array (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA). Se filtraron muestras de plasma y posteriormente se diluyeron con 10 % de suero de rata y ratón normal (Rockland, Gilbertsville, PA) para bloquear la unión de anticuerpo no específico residual. Se añadieron 1000 microesferas por quimiocina (10 μl /pocillo) en un volumen total de 60 μl , junto con muestras estándar y de blanco, y la suspensión se incubó durante 1 hora en una placa filtrante de 96 pocillos a temperatura ambiente (TA). Entonces, se añadieron 10 μl de mezcla de anticuerpo biotinilado (16,5 $\mu\text{g/ml}$) y se incubó durante 1 hora a TA. Después de lavar con PBS-1 % de BSA-0,5 % de Tween 20, se incubaron perlas con 50 ng/pocillo de estreptavidina R-ficoeritrina (BD Biosciences, San Diego, CA) durante 10 minutos. Finalmente, las perlas se lavaron otra vez con PBS-1 % de BSA-0,5 % de Tween 20, y la intensidad de fluorescencia se midió en un volumen final de 100 μl de tampón de ELISA de alto rendimiento (Sanquin, Ámsterdam, Los Países Bajos). Las mediciones y análisis de datos se realizaron con el sistema Bio-Plex Suspension Array en combinación con el software Bio-Plex Manager versión 3.0 (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA) (véase también la ref. N.º: 14)

ELISA y otros ensayos

Para el análisis temporal de niveles de CCL5 y CCL18 humana en plasma durante el seguimiento, se ensayaron las muestras a $t=0$, $t=2$ y $t=180$ por un kit de ELISA instantáneo de CCL5 (Bender MedSystems, Viena, Austria) y un ELISA de CCL18 (RayBiotech, Norcross, GA), respectivamente, según el protocolo del fabricante. Se determinaron parámetros inflamatorios del nivel inicial tales como proteína C reactiva, fibrinógeno, tasa de sedimentación eritrocítica (ESR) e inhibidor 1 del activador de plasminógeno (PAI-1) como se ha descrito en detalle previamente¹³. Se determinaron ligando CD40 soluble (sCD40L) e interleucina 6 (IL-6) mediante un inmunoensayo altamente sensible (Quantakine HS, R&D Systems, Minneapolis, MN), muestras de CRP a $t=180$ mediante un ensayo turbidimétrico en una unidad Modular P800 completamente automática (Roche, Almere, Los Países Bajos).

Evaluación de la interacción heterófila de CCL5 y CCL18

Se usó electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) para evaluar si CCL5 recombinante (7,8 kDa) y CCL18 sintético (7,8 kDa) interaccionaban en interacciones heterófilas. Se incubaron proteínas (rCCL5, sCCL18, rCCL5/sCCL18 a una relación de peso 1:1 y a 1:5 (p:p); 2 μg de proteína total por carril) durante una hora a TA en tampón HEPES 50 mM / EDTA 0,1 mM (pH=7,4), después de que se añadieran 25 mM de paraformaldehído para reticular cualquier homo- o heterodímero formado. Después de 30 minutos, se desnaturalizaron mezclas de proteína en tampón de carga y se sometieron a SDS-PAGE (18 %; 2 μg de proteína por carril, una hora a 70 mV y 30 minutos a 150 mV), las proteínas se visualizaron por tinción con plata. También se analizaron mezclas de proteína en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Voyager-DE Pro (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA).

Análisis de RT-PCR

Para evaluar la expresión de CCL5, CCL18, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CX3CR1 y péptido-3 de neutrófilo

humano (HNP-3) en CMSP, se aisló ARNm y se analizó. Se usó tiocianato de guanidio-fenol para extraer ARN total de CMSP, las muestras se sometieron a tratamiento con DNasa I (Promega, Madison, WS) después de que el ADNc se generara usando transcriptasa inversa RevertAid M-MuLV (Fermentas, Burlington, Canadá) según el protocolo del fabricante². Se realizó expresión génica semicuantitativa usando el procedimiento de SYBR-Green (Eurogentec, Lieja, Bélgica) en una máquina ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) con cebadores para CCL5, CCL18, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CX3CR1, CD11b y péptido-3 de neutrófilo humano (HNP-3). Se usaron ciclofilina e hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HPRT) como genes de mantenimiento (véase la Tabla 1 para secuencias de cebadores).

Tabla 1. Secuencias de cebadores usadas para el análisis por RT-PCR.

Nombre de gen	Directo	Inverso
HPRT	GAAATGTCAGTTGCTGCA	ACAATCCGCCCAAAGGGAAC
Ciclofilina	TTCCT AGTCTTGGCAGTGCAGAT	GAAGATGAGAACTTCATCCTAAA
CCR1	GAA TCCTGCTGACGATTGACA	GCATA GTGCCCCGAAGGCAAAC
CCR2	GGTA TTCGGCCTGAGTAACTGT	TGAGTCATCCCAAGAGTCTCTGTC
CCR3 CCR4	GAAA CTGCTGCATGAACCCGGT ACTGTGGGCTCCTCCAAA	GGAAGAAGTGGCGAGGTACT TCCATGGTGGACTGCGTG
CCR5	TTT AGACATCCGTTCCCCTAC	CAGGGCTCCGATGTATAATAATT
CX3CR1	AAGAA GTCCACGTTGATTTCTCCT	GA CGTGTGGTAAGTAAAATTGCTGC
HNP-3	CATC CCCAGAAGTGGTTGTTTC	T TTTCCTTGAGCCTGGATGCT
CCL5 CCL18	CCT TCTGCGCTCCTGCATCTG CCTGGAGGCCACCTCTTC	CAGTGGGCGGGCAATG TGCAGCTCAACAATAGAAATCAA
	TAA	TT

Se calculó la expresión génica relativa restando el número de ciclos umbral (Ct) del gen diana del Ct promedio de ciclofilina y HPRT y elevando dos a la potencia de esta diferencia.

Citometría de flujo

Se evaluó la expresión superficial de CCR3 y CCR5 sobre CMSP CD3⁺ y CD14⁺ por citometría de flujo. Se descongelaron CMSP crioconservadas, se lavaron tres veces en RPMI 1640 que contenía 20 % de FCS y posteriormente se tiñeron usando anticuerpos anti-CD3 y anti-CD14 conjugados con APC (BD Biosciences, San Jose, CA), además de anticuerpos anti-CCR3 y anti-CCR5 conjugados con FITC (R&D Systems). Se usaron anticuerpos IgG2a de rata conjugada con FITC e IgG2b de ratón conjugados con FITC de isotipos no específicos (eBiosciences, San Diego, CA) como controles negativos. Las muestras se analizaron con un citómetro de flujo activado por fluorescencia (FACSCalibur) y posteriormente se analizaron usando el software CELLQuest (BD Biosciences), se contaron 50.000 células para cada muestra.

Ensayo de estimulación de CMSP

Se descongelaron especímenes de CMSP crioconservados, obtenidos de seis voluntarios sanos, como se ha descrito anteriormente, se sembraron en una placa de 96 pocillos de fondo redondo en forma de U (Greiner Bio-one) y se estimularon durante 6 horas a 37 °C con medio puro (control) o medio complementado con 50 ng/ml de CCL5 recombinante (Peprotech, Rocky Hill, NJ), 50 ng/ml del péptido de CCL18 sintético SM-1 (sCCL18), o una combinación de rCCL5 y sCCL18 (25 ng/ml por péptido)³. Después de la incubación, se aisló ARN total de las células, se preparó ADNc y se determinó la expresión de receptores de quimiocinas.

Análisis estadístico

Se examinaron diferencias entre las poblaciones de estudio de los presentes inventores y la cohorte original por la

prueba exacta de Fisher y la prueba de la t de Student para datos independientes. Se probaron los niveles en plasma de quimiocinas y marcadores inflamatorios para distribución gaussiana normal y los valores se transformaron logarítmicamente en el caso de una distribución sesgada cuando conviniera. Con respecto a lo último, se dan medias geométricas en lugar de aritméticas. Las medias se compararon por la prueba de la t de Student bilateral para datos independientes o la prueba de la U de Mann-Whitney cuando conviniera. Con el fin de evaluar el valor predictivo de CCL5 y CCL18 para la aparición de síntomas resistentes, independientes de factores posiblemente confusos, se realizó un análisis multivariante, que corregía para la edad, niveles de HDL y ESR, además de para otros factores de riesgo cardiovascular establecidos (por ejemplo, hipertensión, hipercolesterolemia, uso de lípido y medicación hipotensora, diabetes mellitus, comportamiento de fumar, IMC e historia de enfermedad cardiovascular) y biomarcadores sCD40L y CRP. Se evaluó la distribución de cuartiles y se usó para el coeficiente de correlación de Spearman y la prueba de la chi-cuadrado de Pearson para determinar la asociación de niveles en plasma de quimiocinas, además de niveles de sCD40L y CRP para la aparición de API resistente. Se generaron curvas de rendimiento diagnóstico para evaluar valores de quimiocinas predictivos para síntomas isquémicos resistentes. Se realizaron análisis de correlación entre valores de múltiplex y ELISA y entre quimiocinas y parámetros inflamatorios por la prueba de correlación ordinal de Spearman. Los resultados se analizaron por FACS mediante la prueba de la t para datos emparejados, el ensayo de estimulación se analizó mediante ANOVA. Se consideró significativo un valor de P bilateral < 0,05. Todos los análisis se realizaron usando el software SPSS versión 14.0 (SPSS, Chicago, IL).

Resultados

Población del estudio

Se realizaron análisis de plasma en quimiocinas en una subcohorte de muestras de plasma previamente no congeladas de 54 pacientes consecutivos, excluyendo el sesgo de selección. Esta subcohorte, que consiste en 31 pacientes con síntomas isquémicos establecidos y 23 con resistentes, se correspondió con la cohorte original en factores de riesgo cardiovascular, historia de infarto de miocardio o PTCA/CABG y parámetros de laboratorio (Tablas 2A y B).

Tabla 2A. Características de pacientes iniciales y parámetros de laboratorio.

	Cohorte de quimiocinas (N=54)	APRAIS (N=211)	Valor de P
Edad, años	65,4 ± 11,0	62,7 ± 10,2	0,08
Resistentes (%)	43	36	0,43
Sexo masculino (%)	73,8	71,1	0,75
Fumador actual (%)	24,6	30,5	0,45
IMC (kg/m ²)	25,2 ± 6,0	25,9 ± 3,36	0,23
Diabetes (%)	16,4	14,6	0,98
Hipertensión (%)	23	23,5	0,99
Uso de estatinas (%)	8,2	12,2	0,48
<i>Historia de:</i>			
Infarto de miocardio (%)	45	43,2	0,88
PTCA (%)	26	29,1	0,75
CABG (%)	23	21,6	0,86
<i>Parámetros de laboratorio:</i>			
Colesterol total, mmol/l	6,00 ± 1,5	6,18 ± 1,2	0,38
HDL, mmol/l	1,14 ± 0,4	1,14 ± 0,3	0,97
CRP, mg/l *	2,36	2,66	0,50
ESR, mm/h *	16,44	14,88	0,30
Fibrinógeno, g/l *	3,56	3,42	0,34

Tabla 2B. Características de pacientes iniciales de la cohorte de quimiocinas y parámetros de laboratorio

	Estabilizados (N=31)	Resistentes (N=23)	Valor de P
Edad, años	67,3 ± 10,2	64,5 ± 11,4	0,30
Sexo masculino (%)	87	63	0,05
Fumador actual (%)	22	25	0,69
IMC (kg/m ²)	24,9	26,7	0,78
Diabetes (%)	9	19	0,16
Hipertensión (%)	17	38	0,39
<i>Historia de :</i>			
Infarto de miocardio (%)	48	47	0,89
PTCA (%)	30	25	0,57
CABG (%)	35	16	0,19
<i>Parámetros de laboratorio:</i>			
Hemoglobina, mmol/l	8,27 ± 2,1	8,51 ± 0,8	0,61
Hematocrito (%)	47	41	0,26
Leucocitos, 10 ⁹ /l	7,49 ± 2,9	7,68 ± 2,2	0,79
Número de plaquetas, 10 ⁶ /l	186,5 ± 66	223,9 ± 75	0,07
Glucosa, mmol/l	7,37 ± 2,7	6,49 ± 1,4	0,15
Creatinina, µmol/l	99,2 ± 52,3	108,7 ± 32,1	0,44
Colesterol, mmol/l	5,92 ± 1,8	6,16 ± 1,0	0,56
HDL, mmol/l	1,23 ± 0,4	0,99 ± 0,2	0,02
ESR, mm/h *	14,15	20,70	0,03
Fibrinógeno, g/l *	3,42	3,78	0,26
CRP, mg/l *	2,14	2,77	0,47
sCD40L, pg/ml	23,6	20,3	0,32

Como no todos los 54 pacientes respondieron a donar sangre después de 180 días, el análisis de ELISA en este momento se realizó para 47 pacientes (29 estabilizados frente a 18 resistentes), pero las características iniciales de esta subcohorte se correspondieron con las de la cohorte original (datos no mostrados). La comparación para los datos demográficos iniciales en la cohorte de quimiocinas no mostró diferencias notables entre pacientes resistentes frente a estabilizados, excepto por una pequeña diferencia, pero significativa, en la composición del sexo (87 % frente a 67 % masculino; P=0,05); la edad media de todos los pacientes fue 65 años (41 a 85 años). Con respecto a los parámetros clínicos y de lípidos en plasma en el nivel inicial, no se diferenciaron niveles de colesterol total en pacientes estabilizados y resistentes (5,92 frente a 6,16 mmol/l; P=0,56), mientras que los niveles de HDL fueron más bajos (1,23 frente a 0,99 mmol/l; P=0,02) en la última población. Este grupo también presentó una elevada tendencia hacia un mayor estado inflamatorio, como se ilustra por niveles elevados de ESR (14,15 frente a 20,7 mm/h; P=0,03), a pesar que los niveles de fibrinógeno y CRP fueron esencialmente similares. No se observaron diferencias en los niveles de sCD40L iniciales entre grupos.

Análisis múltiple: Regulación por incremento de CCL5 y CCL18

Todos los datos de quimiocinas y citocinas como se han determinado por análisis múltiple (muestras a t=0) fueron logarítmicamente transformados antes del análisis estadístico adicional debido a sus perfiles de distribución sesgada, excepto por OPG. Los niveles en plasma de la mayoría de las quimiocinas y citocinas no se diferenciaron entre pacientes estabilizados y resistentes. Los niveles de CCL5 (23,1 frente a 32,7 ng/ml; P=0,018) y CCL18 (53,7 frente a 104,4 ng/ml; P=0,011), sin embargo, parecieron ser significativamente elevados en pacientes resistentes, mientras que hubo un aumento significativo limítrofe en aquellos de CCL3 (53,6 frente a 73,7 pg/ml; P=0,09) (Tabla 3 y Figura 1A).

Tabla 3. Concentraciones plasmáticas de quimiocinas analizadas mediante la técnica múltiplex.

Variable	Estabilizados	Resistentes	Valor de P
CCL5, pg/ml	23158	32704	0,018
CCL18, pg/ml	53678	104399	0,011
CCL2, pg/ml	154	146	0,77
CCL3, pg/ml	53,6	73,7	0,09
CCL11, pg/ml	63,7	65,8	0,88
CCL17, pg/ml	40,3	51,2	0,34
CCL22, pg/ml	527	546	0,79
CXCL8, pg/ml	12,4	13,4	0,84
CXCL9, pg/ml	158	156	0,96
CXCL10, pg/ml	221	157	0,12
MIF, pg/ml	330	439	0,45
OPG, pg/ml *	937	1096	0,25
OSM, pg/ml	456	690	0,25
sRankL, pg/ml	5,0	5,7	0,83
sVCAM, pg/ml	681082	735190	0,45
sICAM, pg/ml	106340	117625	0,28
Los valores son medias geométricas			
* indica media aritmética			

Además, las diferencias observadas en los niveles de CCL5 siguieron siendo significativas después del análisis multivariante ajustando para los factores de riesgo de cardiovascular y niveles de sCD40L y CRP ($P=0,023$), mientras que los niveles de CCL18 fueron limítrofes significativos ($P=0,06$). Sin embargo, diferencias en los niveles de CCL18 alcanzaron significancia después del análisis multivariante para todos los factores confusos, excepto HDL ($P=0,021$). Por tanto, CCL5, además de CCL18, parecen ser factores pronósticos independientes de la aparición de síntomas isquémicos resistentes, incluso cuando se ajusta para niveles de sCD40L y CRP. Además, los niveles de CCL5 y CCL18 no mostraron correlación mutua ($R=0,05$; $P=0,7$), reflejando que estas quimiocinas están reguladas u operan de una manera independiente. Todavía, aunque no se observaron interacciones heterófilas significativas entre CCL5 y CCL18, es concebible que ambas quimiocinas, que comparten CCR3 como receptor de diana común, interaccionarán funcionalmente (Figuras 6 y 7). CXCL10 tuvo una tendencia a aumentar en pacientes estabilizados, aunque no fue bastante significativa (221,6 frente a 157,5 pg/ml; $P=0,12$), que podría indicar hacia un efecto protector de esta quimiocina específica. Los niveles de IFN- γ fueron simplemente indetectables y, por tanto, no se muestran.

A continuación, los presentes inventores buscaron evaluar si los niveles de CCL5 y CCL18 tenían potencial de diagnóstico. Dado el tamaño de la cohorte, los niveles de CCL5 y CCL18 se clasificaron en cuartiles y se analizaron para la correlación con la aparición de futuros síntomas isquémicos resistentes (Tabla 4A).

Tabla 4A. Niveles de cuartiles de CCL5 y CCL18 en el nivel inicial como se ha determinado por análisis múltiplex

Cuartiles	CCL5	CCL18
1	< 15,1	< 39,3
2	> 15,1 y < 25,5	> 39,3 y < 66,0
3	> 25,5 y < 40,3	> 66,0 y < 130,0
4	> 40,3	> 130,0

Todos los valores son en ng/ml

Se observó que aumentó el riesgo de síntomas isquémicos resistentes en los cuartiles superiores de CCL5 ($R=0,32$; $P=0,017$; chi-cuadrado de asociación lineal por lineal 5,53; $P=0,019$), mientras que esta tendencia fue incluso más pronunciada para CCL18 ($R=0,392$; $P=0,003$; chi-cuadrado de asociación lineal por lineal 8,105; $P=0,004$) (Figura 2A). Niveles de CCL18 elevados fueron ligeramente más predictivos que aquellos de CCL5 como se indica por la

curva de rendimiento diagnóstico (área bajo la curva 0,71 frente a 0,69). Los valores de corte de > 40 ng/ml para CCL5 y > 130 ng/ml para CCL18 dieron una sensibilidad del 73,9 % y 65,2 %, respectivamente, además de una especificidad del 67,7 % y 61,3 %. El análisis combinado de los dos cuartiles superiores de CCL5 y CCL18 para la aparición de síntomas isquémicos resistentes revelaron una relación muy significativa (χ^2 con corrección de continuidad 8,12; $P < 0,01$). Aunque la sensibilidad alcanzó el 47,8 %, la especificidad del análisis combinado fue un 90,3 % sorprendentemente alto. El valor predictivo positivo de análisis combinado para los niveles de CCL5 y CCL18 fue del 78,5 % con un valor predictivo negativo concomitante del 70,0 %. Añadir sCD40L o niveles de CRP al análisis no dio ningún aumento adicional en la sensibilidad, especificidad o valor predictivo (datos no mostrados).

Análisis de verificación y seguimiento de ELISA de CCL5 y CCL18

Se correspondieron excelentemente el ELISA medio e individual y los niveles de CCL5 múltiplex ($P < 0,001$). Además, también se observaron que aumentaron los niveles en plasma de CCL5 en pacientes resistentes en comparación con estabilizados en el día 0 cuando se evaluaron por ELISA (36,4 frente a 26,5 ng/ml). De forma interesante, ya después de dos días, se observó una marcada disminución en los niveles de CCL5 en plasma en la cohorte completa (12,1 frente a 30,3 ng/ml; $P < 0,001$) y también se observaron niveles de CCL5 reducidos a $t=180$, que muestra que CCL5 aumenta transitoriamente durante un evento de angina de pecho inestable (Figura 1B). Los presentes inventores no observaron ninguna diferencia entre los grupos estabilizados y resistentes 2 y 180 días después de la inclusión. Los niveles en plasma de CCL18 mostraron un patrón temporal diferente después de los síntomas isquémicos. El análisis de ELISA confirma la expresión diferencial de CCL18 en el día 0 entre pacientes resistentes y estabilizados (56,2 frente a 41,1 ng/ml; $P = 0,02$). Aunque valores absolutos fueron ligeramente más bajos en el ELISA en comparación con el ensayo múltiplex, los análisis estadísticos revelaron una excelente correlación entre los dos ensayos (prueba de Spearman; $P < 0,001$). De forma interesante, los niveles de CCL18 de la cohorte total en el día 2 no se diferenciaron de los niveles iniciales (día 0), sugiriendo que los niveles de CCL18 y CCL5 podrían ser regulados mediante mecanismos separados. A los 180 días, los niveles de CCL18 estuvieron significativamente desregulados por disminución en comparación con los valores del día 2 (48,4 frente a 34,5 ng/ml; $P < 0,001$), que sugiere una función de CCL18 en los procedimientos relacionados con la isquemia-reperusión cardíaca (Figura 1C).

Ligando CD40 soluble y CRP

Los niveles de tanto sCD40L, además de CRP, fueron significativamente elevados a $t=0$ en comparación con $t=180$ (sCD40L 2,04 frente a 0,69 ng/ml; $P < 0,001$, CRP 2,36 frente a 0,96 mg/l; $P < 0,001$) (Figura 1D,E). Sin embargo, los niveles de sCD40L empezaron a disminuir ya a $t=2$ (1,35 ng/ml; $P < 0,05$), que indica que los niveles elevados en el nivel inicial reflejan una respuesta de fase aguda relacionada con la activación de plaquetas. Como los niveles de CD40L soluble a $t=0$ y $t=2$ se correlacionaron significativamente con los niveles de CCL5 a $t=0$ y $t=2$ ($t=0$ $R=0,40$; $P < 0,01$, $t=2$ $R=0,35$; $P=0,01$), niveles de CCL5 elevados también pueden ser principalmente causados por activación de plaquetas. Sin embargo, sCD40L mostró una correlación negativa significativa con niveles de CCL18 a $t=0$ ($R=-0,36$; $P=0,01$), sugiriendo que lo último representa una respuesta de retroalimentación a la activación de plaquetas. Los niveles de CRP fueron incluso adicionalmente elevados a $t=2$ (6,43 mg/l; $P < 0,001$), que está de acuerdo con informes previos^{15,16}, y es supuestamente indicativo de un estado inflamatorio sistémico post-isquémico potenciado en estos pacientes dos días después de la isquemia y/o intervención coronaria. Niveles de CRP no mostraron correlaciones con niveles de CCL5 o CCL18. Los niveles de cuartiles de sCD40L, además de CRP, no tuvieron ningún potencial para predecir síntomas isquémicos resistentes ($R=0,043$ y $R=-0,034$; N.S) (Figura 2A: para la distribución de cuartiles, véase la Tabla 4B).

Tabla 2B. Niveles de cuartiles de CRP y sCD40L en el nivel inicial.

Cuartiles	CRP mg/l	sCD40L ng/ml
1	< 1,2	< 14,2
2	> 1,2 y < 2,6	> 14,2 y < 26,4
3	> 2,6 y < 6,5	> 26,4 y < 33,7
4	> 6,5	> 33,7

Todos los valores son en ng/ml

Inflamación y seguimiento clínico

El análisis de correlación para las quimiocinas con los parámetros inflamatorios sistémicos fibrinógeno, IL-6, PAI-1 y ESR no reveló asociación, excepto por una débil correlación entre los niveles de CXCL10 e IL-6 ($R=0,29$; $P=0,02$, otros datos no mostrados). Y, lo que es más importante, se observó que los niveles de cuartiles superiores iniciales de CCL5 como se han determinado por múltiplex se correlacionaron con la necesidad de procedimientos de revascularización en el plazo de los siguientes 18 meses ($R=0,35$; $P=0,01$). Además, niveles de cuartiles superiores iniciales de CCL18 se correlacionaron con la re-manifestación de angina de pecho inestable (API) durante la hospitalización ($R=0,36$; $P=0,007$), además de con la aparición de un síndrome coronario agudo (SCA) durante el

periodo de seguimiento de 18 meses ($R=0,31$; $P=0,02$) (Figuras 2B-D). Niveles iniciales de sCD40L y CRP no se correlacionaron con ninguno de los parámetros de seguimiento (datos no mostrados).

Análisis de expresión de quimiocinas de CMSP y receptores de quimiocinas

Aunque la interacción de CCL5 con CCR1, CCR3, CCR4 y CCR5 está bien descrita, el actual receptor para CCL18 es hasta ahora desconocido, que hace de CCL18 actualmente un ligando huérfano¹⁷. Sin embargo, se ha informado que CCL18 es un inhibidor competitivo de unión de CCL11 (eotaxina) a CCR3¹⁸. Por tanto, los presentes inventores examinaron la expresión de ARNm de receptores de quimiocinas CCR1, CCR3, CCR4 y CCR5, además de la de CCL5 y CCL18 en CMSP. Los presentes inventores observaron una sorprendente regulación por disminución altamente significativa de los cuatro receptores de quimiocinas implicados en el nivel inicial ($t=0$) en comparación con CMSP a $t=180$ (Figura 3B). Se observó un patrón temporal similar para CCL5 y CCL18, siendo CCL5 abundantemente expresado en CMSP y CCL18 a solo niveles menores (Figura 3A). El posterior análisis de FACS para detectar la expresión de CCR3 y CCR5 en linfocitos T $CD3^+$ y monocitos $CD14^+$ reveló, para sorpresa de los presentes inventores, una elevada expresión significativa de proteínas de CCR3 y CCR5 en tanto células $CD3^+$ como $CD14^+$ a $t=0$ en comparación con $t=180$ (Figura 4A-D) (véase el comentario p. 28). La tinción triple para $CD3$ o $CD14$ con CCR3 y CCR5 mostró una elevada expresión de receptores de quimiocinas en la población $CD3^+$ (3,1 % triple de células positivas a $t=0$ frente a 2,3 % a $t=180$; $P=0,007$) e incluso más prominentemente en las células $CD14^+$ (32,1 % frente al 5,1 % a $t=0$ y $t=180$, respectivamente; $P<0,001$). Se observó un patrón idéntico para el porcentaje de células $CCR3^+$ y $CCR5^+$, además de las células $CCR3^+/CCR5^+$ combinadas en la población de CMSP total (Figura 4G-I).

Para evaluar si el patrón de expresión génica reducido en el nivel inicial fue producido por desplazamientos transitorios en el perfil de distribución de leucocitos, los presentes inventores han monitorizado el porcentaje total de células $CD14^+$ (monocitos) y $CD3^+$ (linfocitos T) en CMSP. Los números de monocitos no fueron diferentes entre los dos momentos de tiempo, mientras que las células $CD3^+$ disminuyeron ligeramente a $t=0$ (54,2 frente a 66,6%; $P=0,01$) (Figura 8A) véase p. 28. Un estudio adicional no reveló diferencias en la relación de expresión de CCR2: CX3CR1, una medida de la distribución del subconjunto de monocitos¹⁹, en CMSP también. Los presentes inventores observaron, sin embargo, niveles de expresión significativamente elevados de HNP-3, un marcador de neutrófilos selectivo, a $t=0$, que indica una liberación potenciada de neutrófilos durante API (Figura 8B) véase p. 28. Posiblemente, los cambios observados en la expresión de receptores de quimiocinas a $t=0$ pueden atribuirse al menos parcialmente a los elevados números de neutrófilos. A diferencia de los niveles en plasma de quimiocinas, no se observaron diferencias en el nivel de expresión para los receptores de quimiocinas entre pacientes estabilizados y resistentes a $t=0$ (datos no mostrados).

Ensayo de estimulación de CMSP

En parte, sin embargo, la regulación por disminución de receptores de quimiocinas puede reflejar una respuesta de retroalimentación al estallido inmunomodulador después de API. Para verificar si la regulación de expresión observada de CCR1, CCR3, CCR4 y CCR5 en CMSP está relacionada con los elevados niveles de CCL5 y CCL18 durante los eventos isquémicos, los presentes inventores estimularon CMSP con rCCL5 y/o sCCL18. Después de 6 horas de estimulación, los presentes inventores no observaron efecto diferencial sobre la expresión de ARNm de CCR1, CCR4 y CCR5. A diferencia, sin embargo, sCCL18 causó una espectacular regulación por disminución en la expresión de CCR3, y este efecto se amplificó adicionalmente por la co-incubación con rCCL5 ($P<0,01$, Figura 5A-D). Por tanto, la regulación por disminución de ARNm de CCR3 en CMSP observadas *in vivo* podría producirse por los elevados niveles de CCL18. La regulación por disminución de CCR1, CCR4 y CCR5 *in vivo* podría ser bien regulada por ligandos distintos de CCL5 y CCL18.

Discusión

A conocimiento de los presentes inventores, este es el primer estudio para describir el perfilado de un amplio panel de quimiocinas por ensayo múltiple en plasma de pacientes con API de una manera prospectiva. De todas las quimiocinas probadas, se observó que solo los niveles de CCL5 y CCL18, independientes de otros marcadores inflamatorios y sCD40L, fueron transitoriamente elevados en pacientes resistentes frente a estabilizados en el nivel inicial y que disminuyeron en el plazo de 6 meses después de la aparición de los síntomas de API. Estos fenómenos fueron acompañados de una disminución brusca, probablemente inducida por CCL18, en la expresión de ARNm de los receptores de quimiocinas relacionados CCR3 y CCR5 en CMSP en el día 0 frente al día 180. Concomitantemente, se encontró que la expresión superficial de CCR3 y CCR5 aumentaba en el nivel inicial, reflejando posiblemente una rápida exposición del receptor por CMSP durante síntomas isquémicos. Tanto CCL5 como CCL18 también muestran características predictivas referentes al desenlace clínico.

El panel múltiple contuvo diversas quimiocinas, que han sido previamente asociadas a la aterosclerosis o enfermedad cardiovascular, tales como CCL2, CCL5, CCL11, CXCL8 y CXCL10⁵. CCL5 y CCL18 fueron las dos únicas quimiocinas que fueron diferencialmente reguladas al nivel inicial entre pacientes resistentes y estabilizados. Pacientes resistentes tuvieron graves quejas isquémicas sostenidas a pesar de la medicación antianginosa que garantizaba angiografía coronaria con o sin intervención coronaria percutánea. Por tanto, mientras que los niveles de otras quimiocinas que participan en CVD fueron relativamente inalterados y mientras que pacientes resistentes

generalmente no se diferencian de estabilizados en el grado de inflamación sistémica general, CCL5 y CCL18 podrían ser marcadores de quimiocina exclusivos de la gravedad de la isquemia en pacientes con API.

Se seleccionaron CCL5 y CCL18 para análisis temporal adicional para un seguimiento de 180 días. Como se menciona previamente, la función de CCL5 como mediador inflamatorio en la enfermedad cardiovascular es ampliamente reconocida, y, de hecho, se observaron niveles de CCL5 que estaban elevados en pacientes con síndromes coronarios agudos^{9,20}. Sin embargo, estos estudios examinaron niveles de CCL5 en la hospitalización y, con una única excepción, no incluyeron un diseño prospectivo del estudio. Solo Nomura y col. mostraron una disminución en los niveles de CCL5 a los 30 días en pacientes con API después de PCI, a niveles comparables a los niveles de 180 días en el estudio de los presentes inventores⁹. Los datos de los presentes inventores extienden esta observación, ya que demuestran que la disminución en los niveles de CCL5 no es una consecuencia de PCI, sino una característica intrínseca de pacientes con API estabilizados. Aunque todavía faltan datos sobre los niveles de referencia de CCL5, CCL5 2 y 180 días después de la inclusión, fueron muy comparables a valores informados en controles sanos por Parissis y col., sugiriendo que los niveles de CCL5 habían vuelto al nivel inicial en el plazo de 2 días después de la aparición de los síntomas isquémicos²¹.

Para conocer más sobre la contribución de plaquetas activadas a los niveles pico de CCL5, los presentes inventores realizaron una evaluación temporal de sCD40L²². Los presentes inventores observaron niveles significativamente elevados de sCD40L en el nivel inicial, que está en concordancia con estudios previos y refleja el potenciado estado de activación de plaquetas en API^{23,24}. Sin embargo, la progresiva disminución observada en los niveles de sCD40L a $t=2$ y $t=180$ después de API nunca ha sido documentada en pacientes con API y puede ilustrar la rápida restauración de la homeostasis de sCD40L después de API. Además, los niveles de $t=0$ y $t=2$ se correlacionaron con niveles de CCL5, sugiriendo que plaquetas activadas pueden, directamente o indirectamente, ser una fuente importante de CCL5. Aparte de su secreción masiva por plaquetas activadas, también pueden surgir niveles elevados de CCL5 durante API de linfocitos T activados y como resultado de homeostasis alterada en el tejido distal isquémico a la oclusión^{25,26}. Como Rothenbacher y col. observaron reducidos niveles de CCL5 en pacientes con enfermedad cardíaca coronaria estable en comparación con controles, es poco probable que la inflamación aguda en sí pueda ser responsabilizada del aumento transitorio en CCL5 durante API²⁷. Esto es enfatizado por los hallazgos de los inventores, ya que los presentes inventores observaron una regulación por disminución de la expresión de ARNm de CCL5 en CMSP en el nivel inicial en comparación con 180 días después de la aparición de la isquemia. Queda por determinar si la elevada respuesta en pacientes resistentes refleja una activación más amplia de plaquetas (o linfocitos T) o una mayor capacidad de las plaquetas y linfocitos T para elaborar CCL5.

De forma interesante, CCL18 todavía no ha sido asociado a trastornos cardiovasculares en cohortes de pacientes. CCL18 está presente a altos niveles en sangre y es producido por células presentadoras de antígenos y por eosinófilos. Se cree que actúa en el funcionamiento de la respuesta inmunitaria primaria como atrayente para linfocitos T, linfocitos B y monocitos¹⁷. Como se ha mencionado previamente, sin embargo, su receptor no ha sido identificado, a pesar de que se informó que CCL18 funcionaba como antagonista de CCR3 neutro¹⁸. Evidencia sobre una función directa de CCL18 en la enfermedad cardiovascular no es concluyente y está limitada a dos estudios descriptivos que documentan la expresión de CCL18 en placas ateroscleróticas y en particular en sitios de estabilidad reducida^{28,29}. Los presentes inventores muestran ahora que los niveles de CCL18 en plasma son elevados en pacientes con API e incluso más en pacientes con síntomas resistentes. La elevación de CCL18 es transitoria sostenida, pero los niveles son reducidos después de 180 días. La fuente actual del aumento de CCL18 persistente después de API es menos clara. La expresión de CCL18 se reguló por disminución en CMSP en el nivel inicial, descalificando la abundante producción por estas células como la principal fuente de CCL18 de plasma. Posiblemente, los niveles en plasma pueden reflejar una liberación de CCL18 que contiene placas vulnerables²⁸. Los niveles de CCL18 estuvieron negativamente correlacionados con los niveles de sCD40L, indicando posiblemente a una respuesta de retroalimentación negativa tras la activación de plaquetas. Investigación adicional tendrá que aclarar su función en los síndromes coronarios agudos.

Se ha sugerido que varias quimiocinas pueden actuar en la patogénesis de la cardiomiopatía isquémica no infartada, ya que la generación de oxígeno reactivo predominante e hipoxia en el tejido isquémico inducirán una respuesta de quimiocinas³⁰. Ilustrativamente, se observó que MCP-1 se regulaba por incremento en el miocardio al menos 7 días después de la isquemia en ratones y se asoció a fibrosis intersticial y disfunción ventricular izquierda en ausencia de infarto de miocardio⁶. Los niveles de CCL18 persistieron a un alto nivel durante al menos dos días también, y dada su capacidad para activar los fibroblastos y aumentar la producción de colágeno, es tentador proponer una función similar de CCL18 en la curación de lesiones³¹. Puede no solo modular la atracción de subconjuntos de leucocitos sino, como se muestra por Wimmer y col., CCL18 también puede desempeñar una función facilitadora en la función de células madre hematopoyéticas de médula ósea³². Por tanto, elevados niveles de CCL18 podrían contribuir en la respuesta inflamatoria, pero también en la movilización de células progenitoras hacia áreas de isquemia miocárdica en anticipación del procedimiento de reparación miocárdica.

Para enfatizar además la función de CCL5 y CCL18 en la patofisiología de la isquemia miocárdica, los presentes inventores observaron un aumento significativo en la exposición superficial de CCR3 y CCR5 por linfocitos T CD3⁺ y monocitos CD14⁺ y una regulación por disminución paradójica de ARNm de CCR1, CCR3, CCR4 y CCR5 en el nivel inicial. Esto es una observación interesante y contradictoria, a pesar de que los presentes inventores no son los primeros en observar una discrepancia tal entre la expresión de proteína y de receptores de quimiocinas de ARNm

en CMSP de pacientes con API. De hecho, Damas y col. han informado de un efecto similar, pero opuesto, para CXCR4, es decir, regulación por disminución en la proteína, pero regulación por incremento al nivel de ARNm en API en comparación con sujetos sanos de control, mientras que los niveles de su ligando CXCL12 fueron reducidos en pacientes con API en comparación con controles³³. El rápido aumento en la exposición de proteína superficial puede resultar de la movilización aguda de receptores intracelulares en respuesta a potenciados niveles en plasma de los ligando relacionados o de otros actores que son liberados en angina inestable. La relativa regulación por disminución de ARNm de receptores de quimiocinas en CMSP puede reflejar parcialmente un perfil de leucocitos desplazados en API con una rápida movilización de neutrófilos HNP-3+ como se juzga a partir de la expresión de HNP-3 potenciada en ARNm de CMSP a $t=0$ ³⁴, y una disminución menor en células CD3+, mientras que los niveles de CD14+ totales siguieron sin afectar. Parcialmente, sin embargo, también puede ser atribuible a una respuesta de retroalimentación negativa para normalizar los niveles de receptor expuestos como se muestra de nuevos estudios de regulación de CCL18 *in vitro* (Figura 5). La retroalimentación transcripcional puede efectuarse en respuesta directa a la exposición de los receptores superficiales a CCL18, ya que los niveles de ARNm de CCR3 fueron espectacularmente reducidos después de la exposición a sCCL18, identificando así una nueva función moduladora de CCL18 en isquemia cardíaca.

El examen de la distribución de cuartiles de CCL5 y CCL18 muestra una clara relación con la aparición de síntomas resistentes. Además, los niveles de cuartiles superiores también se correlacionaron con futuros eventos cardiovasculares y procedimientos de revascularización, mientras que sCD40L y CRP, que se ha mostrado que tienen una fuerte potencia pronóstica en otros estudios³⁵⁻³⁷, no hicieron esto a este tamaño de cohorte. Dadas las principales fuentes celulares de CCL5 y CCL18, plaquetas activadas y tejido isquémico, el aumento de niveles en API resistente puede reflejar una trombosis más pronunciada e inducción relacionada con la isquemia en estos pacientes. Todavía queda por aclarar si es o no causal en la progresión de la enfermedad resistente. Con respecto a las capacidades de pronóstico de CCL5 y CCL18, la sensibilidad y especificidad de los niveles de cuartiles superiores de las quimiocinas por separado no superaron el 80 %. La combinación de los dos cuartiles superiores de ambas quimiocinas dio una especificidad viable del 90,3 %, que así descarta bastante eficazmente síntomas resistentes para bajos niveles de CCL5 y CCL18. Sin embargo, aunque CCL5 y CCL18 pueden tener potencial como biomarcadores prospectivos independientes para enfermedad, las correlaciones que los presentes inventores observaron entre estas quimiocinas y la gravedad clínica de los síntomas, además de diversos parámetros de seguimiento, a pesar de ser muy significativos, no son actualmente lo suficientemente fuertes por sí mismos. Por tanto, la determinación de niveles de CCL5 y CCL18 en plasma, en combinación con otros parámetros de diagnóstico clínico, podría añadir características de pronóstico a la evaluación de pacientes con API. Esta cuestión necesita ser tratada en el futuro de estudios a mayor escala.

Deben observarse algunos problemas y limitaciones de este estudio. Primero, la configuración de los presentes inventores descartó principalmente estudiar los niveles de control de estas quimiocinas antes de API. Sin embargo, los presentes inventores creen que, como los análisis prospectivos se realizaron en los mismos pacientes, están justificadas las conclusiones sobre el perfil temporal de CCL5 y CCL18. Como todos los pacientes están en gran medida libres de síntomas a los 180 días después de API, los presentes inventores pueden suponer de forma segura que los últimos valores se aproximarán a los niveles pre-API de pacientes de CAD. Segundo, se ha mostrado recientemente que las estatinas pueden influir en los niveles en suero de quimiocinas, además de la expresión de receptores de quimiocinas en CMSP^{8,38}. Como los presentes inventores estuvieron en la afortunada circunstancia de que el muestreo de cohortes había tenido lugar cuando acababa de empezar a aparecer la terapia con estatinas, solo el 8,2 % de los pacientes de la cohorte de los presentes inventores estuvieron en terapia con estatinas. Como los datos de los presentes inventores se corrigieron para este uso minoritario de estatinas, los presentes inventores creen que sus resultados no están sesgados por la terapia con estatinas. Finalmente, el panel múltiple también comprendió quimiocinas que habían sido previamente asociadas a aterosclerosis o isquemia miocárdica, que incluyen CCL2, CCL3, CXCL8 y CXCL10^{21,39,40}. En el estudio de los presentes inventores, pacientes con angina inestable resistente no mostraron diferencias significativas para estas quimiocinas ni para los otros inmunomoduladores que habían sido ensayados. Así, estas citocinas no han sido seleccionadas para análisis temporal adicional, sino que los presentes inventores no pueden descartar a priori que estas citocinas puedan afectar la angina de pecho inestable y la isquemia miocárdica.

Además, datos preliminares en ratones ApoE-/- propensos a aterosclerosis que ya habían desarrollado placas de la arteria carótida inducidas por collar mostraron que una pauta de administración intraperitoneal de 3 semanas de CCL18 recombinante agravó la progresión de la lesión un significativo 50 % (Figura 9), sugiriendo que CCL18 puede no solo ser un prometedor marcador de enfermedad cardiovascular, sino también un candidato válido para intervención terapéutica en enfermedad cardiovascular.

Para finalizar, los presentes inventores identificaron CCL5 y particularmente CCL18 como quimiocinas relevantes en API. Si desempeñan una función causante en la patogénesis o están más indirectamente implicadas mediante otros mecanismos, si estos marcadores alojan cualquier potencial de diagnóstico adicional y si son dianas terapéuticas adecuadas, necesita ser tratados en futuros estudios.

Referencias

1. Bertrand ME, Simoons ML, Fox KA, Wallentin LC, Hamm CW, McFadden E, De Feyter PJ, Specchia G, Ruzyllo W. Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2002;23:1809-40.
2. Hansson GK. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-1695.
3. Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res*. 2004;95:858-66.
4. Weber C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res*. 2005;96:612-6.
5. Kraaijeveld AO, de Jager SC, van Berkel TJ, Biessen EA, Jukema JW. Chemokines and Atherosclerotic Plaque Progression: Towards Therapeutic Targeting? *Curr Pharm Des*. 2007;13:1039-1052.
6. Dewald O, Frangogiannis NG, Zoerlein M, Duerr GD, Klemm C, Knuefermann P, Taffet G, Michael LH, Crapo JD, Welz A, Entman ML. Development of murine ischemic cardiomyopathy is associated with a transient inflammatory reaction and depends on reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:2700-5.
7. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*. 2006;354:610-21.
8. Damas JK, Boullier A, Waehre T, Smith C, Sandberg WJ, Green S, Aukrust P, Quehenberger O. Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, is elevated in coronary artery disease and is reduced during statin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2567-72.
9. Nomura S, Uehata S, Saito S, Osmni K, Ozeki Y, Kimura Y. Enzyme immunoassay detection of platelet-derived microparticles and RANTES in acute coronary syndrome. *Thromb Haemost*. 2003;89:506-12.
10. McDermott DH, Yang Q, Kathiresan S, Cupples LA, Massaro JM, Keaney JF, Jr., Larson MG, Vasan RS, Hirschhorn JN, O'Donnell CJ, Murphy PM, Benjamin EJ. CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2005;112:1113-20.
11. de Lemos JA, Morrow DA, Sabatine MS, Murphy SA, Gibson CM, Antman EM, McCabe CH, Cannon CP, Braunwald E. Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2003;107:690-5.
12. de Jager W, te Velthuis H, Prakken BJ, Kuis W, Rijkers GT. Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10:133-9.
13. Verheggen PW, de Maat MP, Cats VM, Haverkate F, Zwinderman AH, Kluft C, Bruschke AV. Inflammatory status as a main determinant of outcome in patients with unstable angina, independent of coagulation activation and endothelial cell function. *Eur Heart J*. 1999;20:567-74.
14. de Jager W, Prakken BJ, Bijlsma JW, Kuis W, Rijkers GT. Improved multiplex immunoassay performance in human plasma and synovial fluid following removal of interfering heterophilic antibodies. *J Immunol Methods*. 2005.
15. Cusack MR, Marber MS, Lambiase PD, Bucknall CA, Redwood SR. Systemic inflammation in unstable angina is the result of myocardial necrosis. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:1917-23.
16. Kennon S, Price CP, Mills PG, Ranjadayan K, Cooper J, Clarke H, Timmis AD. The effect of aspirin on C-reactive protein as a marker of risk in unstable angina. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37:1266-70.
17. Schutyser E, Richmond A, Van Damme J. Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes. *J Leukoc Biol*. 2005;78:14-26.
18. Nibbs RJ, Salcedo TW, Campbell JD, Yao XT, Li Y, Nardelli B, Olsen HS, Morris TS, Proudfoot AE, Patel VP, Graham GJ. C-C chemokine receptor 3 antagonism by the beta-chemokine macrophage inflammatory protein 4, a property strongly enhanced by an amino-terminal alanine-methionine swap. *J Immunol*. 2000;164:1488-97.
19. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, van Rooijen N, Lira SA, Habenicht AJ, Randolph GJ. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 2007;117:185-94.
20. Steppich BA, Moog P, Matissek C, Wisniewski N, Kuhle J, Joghetaei N, Neumann FJ, Schomig A, Ott I. Cytokine profiles and T cell function in acute coronary syndromes. *Atherosclerosis*. 2007;190:443-51.
21. Parissis JT, Adamopoulos S, Venetsanou KF, Mentzifok DG, Karas SM, Kremastinos DT. Serum profiles of C-C chemokines in acute myocardial infarction: possible implication in postinfarction left ventricular remodeling. *J Interferon Cytokine Res*. 2002;22:223-9.
22. Andre P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation*. 2002;106:896-9.
23. Aukrust P, Muller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, Solum NO, Forfang K, Froland SS, Gullestad L. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation*. 1999;100:614-20.
24. Garlachs CD, Eskafi S, Raaz D, Schmidt A, Ludwig J, Herrmann M, Klinghammer L, Daniel WG, Schmeisser A. Patients with acute coronary syndromes express enhanced CD40 ligand/CD154 on platelets. *Heart*. 2001;86:649-55.
25. Nelson PJ, Kim HT, Manning WC, Goralski TJ, Krensky AM. Genomic organization and transcriptional regulation of the RANTES chemokine gene. *J Immunol*. 1993;151:2601-12.
26. Weber C, Schober A, Zernecke A. Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1997-2008.

27. Rothenbacher D, Muller-Scholze S, Herder C, Koenig W, Kolb H. Differential expression of chemokines, risk of stable coronary heart disease, and correlation with established cardiovascular risk markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:194-9.
28. Reape TJ, Rayner K, Manning CD, Gee AN, Barnette MS, Burnand KG, Groot PH. Expression and cellular localization of the CC chemokines PARC and ELC in human atherosclerotic plaques. *Am J Pathol.* 1999;154:365-74.
29. Papaspyridonos M, Smith A, Burnand KG, Taylor P, Padayachee S, Suckling KE, James CH, Greaves DR, Patel L. Novel candidate genes in unstable areas of human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1837-44.
30. Frangogiannis NG, Entman ML. Chemokines in myocardial ischemia. *Trends Cardiovasc Med.* 2005;15:163-9.
31. Atamas SP, Luzina IG, Choi J, Tsybalyuk N, Carbonetti NH, Singh IS, Trojanowska M, Jimenez SA, White B. Pulmonary and activation-regulated chemokine stimulates collagen production in lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29:743-9.
32. Wimmer A, Khaldoyanidi SK, Judex M, Seroby N, Discipio RG, Schraufstatter IU. CCL18/PARC stimulates hematopoiesis in long-term bone marrow cultures indirectly through its effect on monocytes. *Blood.* 2006;108:3722-9.
33. Damas JK, Waehre T, Yndestad A, Ueland T, Muller F, Eiken HG, Holm AM, Halvorsen B, Froland SS, Gullestad L, Aukrust P. Stromal cell-derived factor-1alpha in unstable angina: potential antiinflammatory and matrix-stabilizing effects. *Circulation.* 2002;106:36-42.
34. Hansen PR. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation.* 1995;91:1872-85.
35. Kinlay S, Schwartz GG, Olsson AG, Rifai N, Sasiela WJ, Szarek M, Ganz P, Libby P. Effect of atorvastatin on risk of recurrent cardiovascular events after an acute coronary syndrome associated with high soluble CD40 ligand in the Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study. *Circulation.* 2004;110:386-91.
36. Varo N, de Lemos JA, Libby P, Morrow DA, Murphy SA, Nuzzo R, Gibson CM, Cannon CP, Braunwald E, Schonbeck U. Soluble CD40L: risk prediction after acute coronary syndromes. *Circulation.* 2003;108:1049-52.
37. Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. *Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease.* *N Engl J Med.* 2000;343:1139-47.
38. Veillard NR, Brauersreuther V, Arnaud C, Burger F, Pelli G, Steffens S, Mach F. Simvastatin modulates chemokine and chemokine receptor expression by geranylgeranyl isoprenoid pathway in human endothelial cells and macrophages. *Atherosclerosis.* 2006;188:51-8.
39. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, Jr., Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature.* 1999;398:718-23.
40. Heller EA, Liu E, Tager AM, Yuan Q, Lin AY, Ahluwalia N, Jones K, Koehn SL, Lok VM, Aikawa E, Moore KJ, Luster AD, Gerszten RE. Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells. *Circulation.* 2006;113:2301-12.
- Ejemplo de referencia 2: Los niveles de CCL3 (MIP-1α) son elevados durante síndromes coronarios agudos y muestran fuerte potencia de pronóstico para futuros eventos isquémicos.

Procedimientos

Cohortes de pacientes

MISSION

- Se reunieron poblaciones de estudio del estudio de intervención MISSION! ¹². El grupo de pacientes con IAM consistió en 44 pacientes (54,5 % hombres; edad media 61,8 ± 11,6 años) diagnosticados con IAM basándose en ECG y parámetros químicos clínicos (elevados niveles de troponina y creatina cinasa). El grupo de control representó 22 sujetos de la misma edad y sexo no sintomáticos (54,5 % hombres; edad media 61,7 ± 12,8), que no padecían la manifestación de la enfermedad de las arterias coronarias (Tabla 5). Se tomaron muestras de sangre iniciales de pacientes con IAM en el plazo de 2 horas después de la hospitalización y en el plazo de 6 horas tras la aparición de IAM. Pacientes que padecen enfermedad autoinmunitaria, tumores malignos, enfermedades inflamatorias crónicas como artritis reumatoide o que recibieron inmunosupresor o quimioterapia se excluyeron del estudio. Este estudio fue autorizado por el comité ético local y todos los pacientes y voluntarios sanos dieron el consentimiento informado antes de ser reclutados. La investigación se adaptó a los principios resumidos en la Declaración de Helsinki.

APRAIS

- Se usaron muestras de plasma de pacientes con angina inestable, derivadas del estudio bien definido APRAIS (Reacción de fase aguda y síndromes isquémicos), para determinar los niveles de CCL3 circulantes ¹³. En resumen, se incluyeron 54 pacientes que fueron ingresados en el servicio de urgencias del Centro médico de la Universidad de Leiden entre marzo y septiembre de 1995 con angina de pecho inestable Braunwald clase IIIB y fueron seguidos

durante hasta 18 meses. Se obtuvieron muestras de sangre venosa al ingreso ($t=0$) después de 2 ($t=2$) y 180 días después del ingreso ($t=180$), se centrifugaron y se almacenaron alícuotas de plasma a -80°C hasta el posterior análisis. Todos los pacientes habían recibido terapia médica convencional, es decir, aspirina 300 mg por vía oral, nitroglicerina por vía intravenosa e infusión de heparina basada ajustada al tiempo de tromboplastina parcial activado. Todos los sujetos dieron el consentimiento informado por escrito y el protocolo del estudio fue autorizado por el Comité ético del Centro médico de la Universidad de Leiden.

Ensayo múltiple de quimiocinas

Se determinaron niveles de quimiocinas circulantes de CCL2, CCL3, CCL5, CCL11, CCL17, CCL18, CCL22, CXCL8, CXCL9 y CXCL10, además de cuatro citocinas de referencia en la cohorte MISSION!, además de niveles de CCL3 en la cohorte APRAIS, usando una lectura basada en microesferas fluorescentes altamente sensibles como se describe después^{14,15}. Brevemente, se filtraron muestras de plasma y posteriormente se diluyeron con 10 % de suero de rata y ratón normal (Rockland, Gilbertsville, PA) para bloquear la unión de anticuerpo no específico residual. Se añadieron 1000 microesferas por quimiocina (10 μl /pocillo) en un volumen total de 60 μl , junto con muestras estándar y de blanco, y la suspensión se incubó durante 1 hora en una placa filtrante de 96 pocillos a temperatura ambiente (TA). Entonces, se añadieron 10 μl de mezcla de anticuerpo biotinilado (16,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubó durante 1 hora a TA. Después de lavar con PBS-1 % de BSA-0,5 % de Tween 20, se incubaron perlas con 50 ng/pocillo de estreptavidina R-ficoeritrina (BD Biosciences, San Diego, CA) durante 10 minutos. Finalmente, las perlas se lavaron otra vez con PBS-1 % de BSA-0,5 % de Tween 20, y la intensidad de fluorescencia se midió en un volumen final de 100 μl de tampón de ELISA de alto rendimiento (Sanquin, Ámsterdam, Los Países Bajos). Las mediciones y análisis de datos se realizaron con el sistema Bio-Plex Suspension Array en combinación con el software Bio-Plex Manager versión 3.0 (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA).

Infarto de miocardio murino

Se anestesiaron ratones y se ventilaron artificialmente con una mezcla de oxígeno y N_2O [1:2 (vol/vol)] usando un respirador para roedores (Harvard Apparatus, Holliston, MA) al que se añadió 2-2,5 % de isoflurano (Abbott Laboratories, Hoofddorp, Los Países Bajos) para anestesia. Se indujo infarto de miocardio por ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda proximal con una sutura de seda 7/0 estéril (Ethicon, Johnson & Johnson, Amersfoort, Los Países Bajos). Tres horas después de la ligadura, los ratones se sacrificaron, se aislaron CMSP y bazos para el análisis de citometría de flujo y se recogió plasma para la detección de quimiocinas. Todos los procedimientos en animales fueron autorizados por el animal Comité ético de la Universidad de Leiden.

ELISA y otros ensayos

Se determinaron niveles de CCL3 humanas, además de murinas (Biosource, Carlsbad, CA), CXCL10 murina (R&D Systems, Minneapolis, MN) e IL-6 murina (eBioscience, San Diego, CA) por ensayos de ELISA de sándwich como se describe por el protocolo del fabricante. Se determinaron parámetros inflamatorios iniciales en la cohorte de APRAIS, tales como proteína C reactiva, fibrinógeno y tasa de sedimentación eritrocítica (ESR), como se ha descrito previamente¹³. Se determinó ligando CD40 soluble (sCD40L) mediante un inmunoensayo altamente sensible (Quantakine HS, R&D Systems, Minneapolis, MN).

Citometría de flujo

Se aislaron CMSP de sangre completa por destrucción de los eritrocitos. Se aislaron esplenocitos triturando bazos a través de un filtro de células de 70 μm (BD falcon, BD Biosciences, San Jose, CA). Después de la recogida, se incubaron glóbulos sanguíneos totales y esplenocitos con tampón de lisis de eritrocitos durante 5 minutos sobre hielo. Las células se centrifugaron durante 5 minutos y se resuspendieron en tampón de lisis. Se lisaron eritrocitos residuales por incubación de 5 minutos sobre hielo. Las células se lavaron dos veces con PBS y se contaron. Por consiguiente, las células se tiñeron para marcadores superficiales CD4, CCR3, CCR5 (BD Biosciences), CD8, F4/80 (eBioscience) y CXCR3 (US biological, Swampscott, MA) añadiendo 0,25 μg de anticuerpo por muestra. Después de 45 minutos de incubación sobre hielo, las células se lavaron con PBS y posteriormente se analizaron por citometría de flujo (FACScalibur, BD biosciences).

Procedimientos estadísticos

Se realizó el análisis estadístico usando SPSS versión 13.0 (SPSS, Chicago, IL). Todos los valores se expresan como media $\pm$ error estándar de la media. Se analizaron diferencias en la distribución de factores de riesgo entre los grupos de control y de IAM con una prueba de probabilidad exacta de Fisher. Se probaron los datos de quimiocinas para distribución normal por el uso de un análisis de Kolmogorov-Smirnov. Se analizaron datos distribuidos no gaussianos por una prueba de la U de Mann-Whitney, mientras que variables normalmente distribuidas se analizaron por la prueba de la t de Student. Se realizó el análisis de correlación con parámetros inflamatorios por la prueba de correlación de rangos de Spearman. Se realizó el ajuste de covariables para factores de riesgo por una prueba de regresión lineal univariante. Se evaluó la distribución de cuartiles de CCL3 y se usó para la prueba de la chi-cuadrado para asociar niveles elevados de CCL3 con futuros eventos cardiovasculares. Se consideró significativo un valor de $P < 0,05$.

Resultados

Estadística de pacientes de MISSION

Se compilaron dos sub-cohortes a una relación 2:1, ya que un estudio piloto reveló que la desviación estándar en niveles de citocina en la población de IAM era en promedio 1,5 veces superior a la de los sujetos de control. Se correspondieron sub-cohortes de IAM y de control para sexo, edad y factores de riesgo conocidos por asociarse al estado inflamatorio (diabetes de tipo 2 mellitus, hipertensión y hiperlipidemia). La cohorte de IAM englobó una fracción más alta de fumadores y ex-fumadores que la cohorte de control (56,8 % en IAM en comparación con 22,7 % en controles; $P=0,01$; tabla 5). Por tanto, todos los valores de quimiocinas se ajustaron para fumar por análisis univariante. Todas las proteínas estuvieron perfectamente dentro del intervalo detectable del ensayo usado.

Tabla 5. Características de los pacientes de MISSION!

	Controles	Infarto agudo de miocardio	Valor de P
Edad (años)	61,7 ± 2,6	61,8 ± 1,8	0,96
Hombres / mujeres	12/10	24/20	1,00
Diabetes mellitus	3 (13,6 %)	6 (13,6 %)	1,00
Hipertensión	8 (36,3 %)	11 (25 %)	0,39
Colesterol total	5,6 ± 0,3 mmol/l	6,0 ± 0,1 mmol/l	0,14
Tabaquismo	5 (22,7 %)	25 (56,8 %)*;	0,01
	4 (18,1 %) ex-fumadores	4 (9,1 %) ex-fumadores	

Panel de referencia

Como control para la validez del ensayo múltiplex se incluyó un panel de citocinas de referencia y marcadores de adhesión celular en el análisis. En cumplimiento con hallazgos previos, niveles en plasma de IL-2 ($0,07 \pm 0,06$ pg/ml en controles frente a $0,65 \pm 0,28$ en IAM; $P=0,003$), TNF- α ($1,05 \pm 0,32$ pg/ml en controles frente a $2,4 \pm 0,72$ en IAM; $P=0,03$), sICAM-1 ($476,1 \pm 80,7$ ng/ml en controles frente a $713,0 \pm 49,9$ en IAM; $P=0,04$) e IL-6 ($9,8 \pm 4,1$ en controles en comparación con $23,7 \pm 8,0$ pg/ml en IAM; $P=0,04$) fueron significativamente elevados en pacientes con IAM (Tabla 6). Otros marcadores de inflamación general como IL-1 α , IFN- γ y sVCAM-1 siguieron invariables (datos no mostrados), así que muestran que la cohorte de pacientes con IAM no se enriqueció en sujetos con un estado hiperinflamatorio general.

Tabla 6. Niveles de cuartiles a $t=0$ de CCL3 de APRAIS como se ha determinado por múltiplex

Cuartiles	CCL3 (pg/ml)
1	<41
2	> 41 y < 53
3	> 53 y < 83
4	> 83

Quimiocinas

Niveles en plasma de la quimiocina CC CCL3 ($39,8$ pg/ml, 21,3-50,3 IQR en controles en comparación con $47,8$ pg/ml, 39,6-67,2 IQR en IAM; $P=0,01$; Figura 13A) y CCL5 ($13,4$ ng/ml, 6,4 -29,2 IQR en controles en comparación con $33,3$ ng/ml, 19,1-45,3 en IAM; $P=0,001$; Figura 14B) estuvieron significativamente regulados por incremento en IAM en comparación con pacientes de control (Tabla 7). Después de la corrección para factores de riesgo cardiovascular, CCL3 y CCL5 siguieron significativamente elevados durante IAM ($P=0,025$ y $P=0,006$, respectivamente). De las quimiocinas CXCL solo CXCL8 ($4,2 \pm 0,50$ pg/ml en controles en comparación con $6,8 \pm 0,56$ en IAM; $P=0,01$; Figura 13C) estuvo significativamente regulado por incremento, mientras que CXCL10 ($255,1 \pm 47,2$ pg/ml en control frente a $162,6 \pm 20,3$ en IAM; $P=0,002$; Figura 13D) se reguló por disminución en IAM en comparación con los controles. Después del ajuste covariable, tanto CXCL8 como CXCL10 siguieron significativamente cambiados ($P=0,02$ y $P=0,04$ respectivamente). Todas las otras quimiocinas medidas no fueron diferencialmente reguladas durante IAM (Tabla 7).

Tabla 7. Valores medios de citocinas y quimiocinas

	Control	IAM		P	P*
IL-2	0,07 ± 0,06 pg/ml	0,65 ± 0,28 pg/ml	↑	0,003	0,047
IL-6	9,8 ± 4,1 pg/ml	23,8 ± 8,0 pg/ml	↑	0,04	0,07
TNFα	0,6 pg/ml, (0-1,6)	1,4 pg/ml, (0,5-2,4)	↑	0,03	0,01
sICAM-1	476 ± 80,7 ng/ml	714 ± 50,0 ng/ml	↑	0,045	<0,001
CCL2	305 ± 81 pg/ml	522 ± 77 pg/ml	=	0,08	0,14
CCL3	49,8 pg/ml (21,3-50,6)	47,7 pg/ml, (39,6-67,2)	↑	0,02	0,025
CCL5	13,4 ng/ml (6,4-29,2)	33,3 ng/ml, (19,8-45,3)	↑	0,001	0,006
CCL11	15,9 pg/ml, (12,7-22,0)	21,2 pg/ml, (13,6-29,8)	=	0,27	0,33
CCL17	16,4 pg/ml, (10,5-21,4)	16,6 pg/ml, (8,6-28,9)	=	0,46	0,26
CCL18	555 ± 186 ng/ml	681 ± 160 ng/ml	=	0,18	0,85
CCL22	356 pg/ml, (264-409)	371 pg/ml, (296-549)	=	0,11	0,08
CXCL8	3,5 pg/ml, (1,9-4,3)	5,1 pg/ml, (3,5-7,4)	↑	0,004	0,02
CXCL9	163 ± 51 pg/ml	155 ± 25 pg/ml	=	0,16	0,87
CXCL10	255 ± 47,4 pg/ml	120 ± 20,3 pg/ml	↓	0,001	0,004

Panel de referencia (IL-2, IL-6, TNF-α y sICAM-1) y de quimiocinas de parámetros medidos que contienen valor de P y valor de P corregido (P*) después del ajuste para tabaquismo. Los valores se expresan como media ± EEM o mediana con IQR cuando convenga.

APRAIS

Para verificar esta observación, los presentes inventores compararon los niveles de CCL3 de la cohorte de MISSION! con los de la cohorte de APRAIS como se ha descrito antes, refiérase al Ejemplo 1. El análisis entre estudios mostró que los pacientes con API también presentaron niveles en plasma de CCL3 elevados similares en comparación con los pacientes con IAM de MISSION! (Figura 11A). A continuación, los presentes inventores realizaron un análisis temporal de niveles de CCL3 circulantes en la cohorte APRAIS de pacientes con angina de pecho inestable. Muestras de plasma desde el nivel inicial ($t=0$), $t=2$ y $t=180$, como se analizaron por ELISA, revelaron una disminución significativa de los niveles de CCL3 a $t=180$ en comparación con $t=0$, además de $t=2$ ($t=0$ 7,57 pg/ml; $t=2$ 26,49 pg/ml; $t=180$ 4,31 pg/ml, $P<0,001$) (Figura 11B). Aunque niveles de CCL3 absolutos en plasma detectados por ELISA fueron más bajos, la comparación de ambas técnicas reveló una correlación altamente significativa ($R=0,92$, $P<0,001$). A continuación, los presentes inventores buscaron evaluar si los niveles en plasma de CCL3 tenían algún potencial para predecir el desenlace clínico. Dado el tamaño de la cohorte, los niveles en plasma a $t=0$ de CCL3 múltiplex fueron, por tanto, clasificados en cuartiles y analizados para la correlación con la aparición de síntomas isquémicos durante o inmediatamente después de la hospitalización y/o síndromes coronarios agudos (para la distribución de cuartiles, véase la Tabla 6). Los niveles de cuartiles superiores de CCL3 fueron altamente predictivos de la aparición de síndromes coronarios agudos durante el seguimiento (cociente de verosimilitudes 11,52; $P<0,01$) y angina de pecho inestable recurrente durante la hospitalización (cociente de verosimilitudes 14,63; $P<0,01$) (Figura 12A,B). La muerte cardíaca durante el seguimiento también mostró una asociación significativa, aunque menos fuerte (cociente de verosimilitudes 7,92; $P<0,05$) (datos no mostrados). Finalmente, CCL3 no se correlacionó con ninguno de los parámetros inflamatorios (datos no mostrados). Sin embargo, los niveles de sCD40L revelaron una correlación negativa significativa con niveles de CCL3 ($R=-0,44$; $P=0,001$), que sugiere una respuesta de retroalimentación tras la activación de plaquetas.

A diferencia de CCL5 y CCL18, los niveles de CCL3 no fueron predictivos de una naturaleza resistente de API (etapa temprana), sino altamente significativa de que más eventos a medio plazo se producen en el plazo de 180 días después de API.

Infarto de miocardio murino

Los resultados obtenidos en seres humanos sugieren una función importante para CCL3 en la lesión miocárdica isquémica. Para determinar si las quimiocinas potenciadas estuvieron relacionadas con la isquemia, los presentes inventores realizaron experimentos de infarto de miocardio en ratones. Como las quimiocinas CCL5 y CXCL8 han sido ampliamente estudiadas con respecto a la aterotrombosis e IAM, los presentes inventores dirigieron su interés a CCL3 y CXCL10. Para inducir infarto agudo de miocardio, se ligó la arteria coronaria descendente anterior izquierda en ratones C57B16. Los niveles de CCL3 fueron, en coincidencia con los hallazgos anteriores de MISSION!, significativamente elevados después de IAM ($33,2 \pm 1,5$ frente a $76,4 \pm 37,4$ pg/ml en animales ligados; $P=0,02$)

(Figura 14B). Como control para el modelo de IAM, se midieron niveles de la citocina IL-6 relacionada con isquemia^{16,17}. Los niveles de IL-6 estuvieron significativamente regulados por incremento después de la ligadura ($0,67 \pm 0,26$ en animales simulados frente a $1,34 \pm 0,46$ ng/ml en ligados; $P=0,007$, Figura 14A). Sorprendentemente, los niveles de CXCL10 estuvieron, a diferencia de los hallazgos MISSION!, significativamente potenciados después de IAM ($157,3 \pm 64,8$ en animales con operación simulada en comparación con $310,6 \pm 86,6$ pg/ml en ligados; $P=0,03$) (Figura 14C). Además, se recogieron CMSP y se analizaron para la expresión de receptores de quimiocinas en diferentes subconjuntos de células. Como era de esperar, se potenció la población de linfocitos T total en la circulación después de la ligadura ($14,1 \pm 3,8$ % en controles frente a $32,8 \pm 14,4$ % en ratones ligados; $P=0,038$), aunque no se observaron efectos en linfocitos T esplénicos ($P=0,9$, Figura 15A y D, respectivamente). Además, el número de tanto macrófagos circulantes, además de esplénicos, no estuvo regulado por lesión isquémica (datos no mostrados). Análisis más amplios de la población de linfocitos T reveló un enriquecimiento específico de linfocitos T CCR5⁺ ($8,0 \pm 2,0$ % en controles en comparación con $11,4 \pm 1,4$ % en animales ligados; $P=0,02$) (Figura 15B). El enriquecimiento en linfocitos T CCR5⁺ circulatorios estuvo acompañado por una reducción en los linfocitos T CCR5⁺ esplénicos ($19,95 \pm 0,5$ % frente a $14,1 \pm 3,1$ %; $P=0,004$) (Figura 15E). CCR3 es el receptor conocido para la quimiocina relacionada con CCL3 CCL4. Como CCL3 y CCL4 están normalmente co-regulados, los presentes inventores también analizaron CMSP y esplenocitos para la expresión de CCR3. Los números de linfocitos T CCR3⁺ circulantes fueron muy bajos. Los análisis mostraron un aumento ligero, aunque no significativo ($P=0,24$), en los linfocitos T CCR3⁺ circulantes (datos no mostrados). No fueron evidentes diferencias en los linfocitos T CCR3⁺ esplénicos (datos no mostrados). Tomados conjuntamente, estos datos sugieren una migración específica de CCL3 de linfocitos T de los órganos linfoides secundarios hacia el sitio de lesión isquémica. Además, también se determinó la expresión del receptor de quimiocinas CXCR3 en los linfocitos T circulantes. En coincidencia con los potenciados niveles de CXCL10, el número de linfocitos T CXCR3⁺ circulantes fue significativamente elevado después de la ligadura de LAD ($29,1 \pm 1,9$ % frente a $43,5 \pm 5,7$ %; $P=0,04$) (Figura 15C). Sin embargo, no fueron evidentes efectos sobre los linfocitos T esplénicos CXCR3⁺ ($P=0,78$) (Figura 15F).

Datos preliminares sugieren que los niveles de CCL3 no son predictivos del riesgo de futuros eventos cardiovasculares, pero también pueden estar causalmente implicados en el desarrollo de la enfermedad ya que el crecimiento de placas ateroscleróticas en el seno aórtico de ratones inactivados en el receptor de LDL hiperlipidémicos con una deficiencia de leucocitos en CCL3 es significativamente más bajo (-60 %) que aquél en ratones con producción de leucocitos normal de CCL3 (Figura 10).

Referencias

1. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-95.
2. Laing KJ, Secombes CJ. Chemokines. *Dev Comp Immunol*. 2004;28:443-60.
3. Weber C. Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. *J Mol Med*. 2003;81:4-19.
4. Weber C, Schober A, Zernecke A. Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1997-2008.
5. Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;283:R7-28.
6. Kraaijeveld AO, de Jager SC, van Berkel TJ, Biessen EA, Jukema JW. Chemokines and atherosclerotic plaque progression: towards therapeutic targeting? *Curr Pharm Des*. 2007;13:1039-52.
7. Mause SF, von Hundelshausen P, Zernecke A, Koenen RR, Weber C. Platelet Microparticles. A Transcellular Delivery System for RANTES-Promoting Monocyte Recruitment on Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005.
8. Simeoni E, Winkelmann BR, Hoffmann MM, Fleury S, Ruiz J, Kappenberger L, Marz W, Vassalli G. Association of RANTES G-403A gene polymorphism with increased risk of coronary arteriosclerosis. *Eur Heart J*. 2004;25:1438-46.
9. Boger CA, Fischereder M, Deinzer M, Aslanidis C, Schmitz G, Stubanus M, Banas B, Kruger B, Riegger GA, Kramer BK. RANTES gene polymorphisms predict all-cause and cardiac mortality in type 2 diabetes mellitus hemodialysis patients. *Atherosclerosis*. 2005.
10. Frangogiannis NG. The role of the chemokines in myocardial ischemia and reperfusion. *Curr Vasc Pharmacol*. 2004;2:163-74.
11. Tarzami ST, Miao W, Mani K, Lopez L, Factor SM, Berman JW, Kitsis RN. Opposing effects mediated by the chemokine receptor CXCR2 on myocardial ischemia-reperfusion injury: recruitment of potentially damaging neutrophils and direct myocardial protection. *Circulation*. 2003;108:2387-92.
12. Liem SS, van der Hoeven BL, Oemrawsingh PV, Bax JJ, van der Bom JG, Bosch J, Viergever EP, van Rees C, Padmos I, Sedney MI, van Exel HJ, Verwey HF, Atsma DE, van der Velde ET, Jukema JW, van der Wall EE, Schalij MJ. MISSION!: optimization of acute and chronic care for patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 2007;153:14 e1-11.
13. Verheggen PW, de Maat MP, Cats VM, Haverkate F, Zwinderman AH, Kluft C, Bruschke AV. Inflammatory status as a main determinant of outcome in patients with unstable angina, independent of coagulation activation and endothelial cell function. *Eur Heart J*. 1999;20:567-74.
14. de Jager W, te Velthuis H, Prakken BJ, Kuis W, Rijkers GT. Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10:133-9.

15. de Jager W, Prakken BJ, Bijlsma JW, Kuis W, Rijkers GT. Improved multiplex immunoassay performance in human plasma and synovial fluid following removal of interfering heterophilic antibodies. *J Immunol Methods*. 2005;300:124-35.
16. LaFramboise WA, Bombach KL, Dhir RJ, Muha N, Cullen RF, Pogozielski AR, Turk D, George JD, Guthrie RD, Magovern JA. Molecular dynamics of the compensatory response to myocardial infarct. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;38:103-17.
17. Shu J, Ren N, Du JB, Zhang M, Cong HL, Huang TG. Increased levels of interleukin-6 and matrix metalloproteinase-9 are of cardiac origin in acute coronary syndrome. *Scand Cardiovasc J*. 2007;41:149-54.
18. Miyao Y, Yasue H, Ogawa H, Misumi I, Masuda T, Sakamoto T, Morita E. Elevated plasma interleukin-6 levels in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 1993;126:1299-304.
19. Mizia-Stec K, Gasior Z, Zahorska-Markiewicz B, Janowska J, Szulc A, Jastrzebska-Maj E, Kobielski-Gembala I. Serum tumour necrosis factor-alpha, interleukin-2 and interleukin-10 activation in stable angina and acute coronary syndromes. *Coron Artery Dis*. 2003;14:431-8.
20. Wang YN, Che SM, Ma AQ. Clinical significance of serum cytokines IL-1beta, sIL-2R, IL-6, TNF-alpha, and IFN-gamma in acute coronary syndrome. *Chin Med Sci J*. 2004;19:120-4.
21. de Lemos JA, Hennekens CH, Ridker PM. Plasma concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:423-6.
22. Zhou RH, Shi Q, Gao HQ, Shen BJ. Changes in serum interleukin-8 and interleukin-12 levels in patients with ischemic heart disease in a Chinese population. *J Atheroscler Thromb*. 2001;8:30-2.
23. Hashmi S, Zeng QT. Role of interleukin-17 and interleukin-17-induced cytokines interleukin-6 and interleukin-8 in unstable coronary artery disease. *Coron Artery Dis*. 2006;17:699-706.
24. Parissis JT, Adamopoulos S, Venetsanou KF, Mentziko DG, Karas SM, Kremastinos DT. Serum profiles of C-C chemokines in acute myocardial infarction: possible implication in postinfarction left ventricular remodeling. *J Interferon Cytokine Res*. 2002;22:223-9.
25. Nomura S, Uehata S, Saito S, Osumi K, Ozeki Y, Kimura Y. Enzyme immunoassay detection of platelet-derived microparticles and RANTES in acute coronary syndrome. *Thromb Haemost*. 2003;89:506-12.
26. Mause SF, von Hundelshausen P, Zernecke A, Koenen RR, Weber C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1512-8.
27. Guan E, Wang J, Norcross MA. Identification of human macrophage inflammatory proteins 1alpha and 1beta as a native secreted heterodimer. *J Biol Chem*. 2001;276:12404-9.
28. Vandervelde S, van Luyn MJ, Rozenbaum MH, Petersen AH, Tio RA, Harmsen MC. Stem cell-related cardiac gene expression early after murine myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2007;73:783-93.
29. Hou Y, Plett PA, Ingram DA, Rajashekhar G, Orschell CM, Yoder MC, March KL, Clauss M. Endothelial-monocyte-activating polypeptide II induces migration of endothelial progenitor cells via the chemokine receptor CXCR3. *Exp Hematol*. 2006;34:1125-32.
30. Waeckel L, Mallat Z, Potteaux S, Combadiere C, Clergue M, Duriez M, Bao L, Gerard C, Rollins BJ, Tedgui A, Levy BI, Silvestre JS. Impairment in postischemic neovascularization in mice lacking the CXC chemokine receptor 3. *Circ Res*. 2005;96:576-82.

Materiales y procedimientos

Animales

Se obtuvieron ratones LDL^{-/-} de la instalación de cría de animales local. Los ratones se mantuvieron con pienso regular esterilizado (RM3; Special Diet Services, Essex, R.U.). Se suministró agua potable con antibióticos (83 mg/l de ciprofloxacino y 67 mg/l de sulfato de polimixina B) y 6,5 g/l de sacarosa y se proporcionó a voluntad. Se realizaron experimentos en animales en los animalarios de los laboratorios Gorlaeus de la Universidad de Leiden. Todos los protocolos experimentales fueron autorizados por el comité ético para experimentos en animales de la Universidad de Leiden.

Perfil de expresión temporal

Se alimentaron ratones LDL^{-/-} macho con una dieta de tipo occidental que contenía 0,25 % de colesterol y 15 % de manteca de cacao (Special Diet Services, Sussex, RU) dos semanas antes de la cirugía y durante todo el experimento. Para determinar los niveles de expresión génica en placas de ratón (n=20), se indujeron lesiones de la arteria carótida aterosclerótica por colocación de collar perivascular como se ha descrito previamente¹. Se anestesiaron ratones mediante inyección subcutánea de ketamina (60 mg/kg, Eurovet Animal Health, Bladel, Los Países Bajos), citrato de fentanilo y fluanisóna (1,26 mg/kg y 2 mg/kg, respectivamente, Janssen Animal Health, Sauterton, RU). De 0 a 8 semanas después de la colocación del collar, cada dos semanas se sacrificó un subconjunto de 4 ratones. Los animales fueron anestesiados como se ha descrito anteriormente y se perfundieron a través del ventrículo cardíaco izquierdo con PBS y se desangraron por transección de la arteria femoral. Posteriormente, se extirparon ambas arterias carótidas comunes y se ultracongelaron en nitrógeno líquido para la óptima conservación del ARN. Los especímenes se almacenaron a -80 °C hasta uso adicional.

Aislamiento de ARN

Se reunieron dos o tres carótidas por muestra y se homogeneizaron triturando en nitrógeno líquido con un pistilo. Se extrajo ARN total del tejido usando reactivo Trizol según las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Breda, Los Países Bajos). El ARN se transcribió de forma inversa usando transcriptasa inversa M-MuLV (RevertAid, MBI Fermentas, Leon-Roth) y se usó para el análisis cuantitativo de la expresión génica con un aparato ABI PRISM 7700 Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA) como se ha descrito previamente², usando hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT) murina y ciclofilina A (CypA) como genes de mantenimiento estándar (Tabla 8).

Trasplante de médula ósea

Para inducir aplasia de la médula ósea, se expusieron ratones receptores LDLr^{-/-} macho a una dosis única de 9 Gy (0,19 Gy/min, 200 kV, 4 mA) de irradiación de cuerpo total usando una fuente Andrex Smart 225 Röntgen (YXLON International) con un filtro de aluminio de 6 mm 1 día antes del trasplante. Se aisló la médula ósea de CCL3^{-/-} macho o compañeros de camada lavando los fémures y las tibias. Los receptores irradiados recibieron 0,5x10⁷ células de la médula ósea mediante inyección en la vena de la cola y se dejaron recuperar durante 6 semanas. Los animales se pusieron en una dieta de tipo occidental que contenía dieta de 0,25 % de colesterol y 15 % de manteca de cacao (SDS) durante 12 semanas y posteriormente se sacrificaron. Veinticuatro horas antes del sacrificio, un subconjunto de animales se inyectó por vía intraperitoneal con lipopolisacárido (LPS) (*Salmonella minnesota* R595 (Re) (List Biological Laboratories Inc., Campbell, CA)). Se determinaron los niveles en plasma por ELISA de sándwich (Biosource, Carlsbad, CA, según el protocolo del fabricante) para confirmar la producción de CCL3 alterada de leucocitos.

Análisis histológico

Se recogieron secciones de criostato de la raíz aórtica (10 µm) y se tiñeron con Oil-red-O. Se determinó el tamaño de lesión en 5 secciones del área de la valva de la válvula aórtica. Se tiñeron inmunohistoquímicamente secciones correspondientes sobre portaobjetos separados con un anticuerpo dirigido contra un antígeno específico de macrófago (MOMA-2, IgG2b de rata monoclonal, dilución 1:50; Serotec, Oxford, RU). Se usó anti-IgG-AP de rata de cabra (dilución 1:100; Sigma, St. Louis, MO) como anticuerpo secundario y NBT-BCIP (Dako, Glostrup, Dinamarca) como sustratos de enzima. Se usó tinción con tricromo de Masson (Sigma, St. Louis, MO) para visualizar el colágeno (tinción azul). Se visualizaron neutrófilos por tinción con Naftol AS-D cloroacetato esterasa según el protocolo del fabricante (Sigma).

Estimulación de macrófagos

Se estimularon macrófagos RAW264.7 privados de suero con 10 µg/ml de ox-LDL o 1 ng/ml de LPS durante 24 horas. Se aisló ARN total para PCR en tiempo real para evaluar la expresión de CCL3. Se estimularon macrófagos RAW 264.7 privados de suero con CCL3 recombinante (10 o 100 ng/ml) durante 24 horas. Posteriormente se añadió [³H]-timidina (1 µCi/pocillo, actividad específica 24 Ci/mmol; Amersham Biosciences, Los Países Bajos) a cada pocillo y se dejó que las células proliferaran durante otras 24 horas. Las células se aclararon dos veces con PBS frío y posteriormente se lisaron con NaOH 0,1 M. Se midió la cantidad de incorporación de [³H]-timidina usando un analizador de centelleo líquido (Tri-Carb 2900R).

Neutropenia inducida por ciclofosfamida

Ratones CCL3^{-/-} hembra o control WT recibió una inyección intraperitoneal (i.p) de ciclofosfamida (6 mg/ratón) para agotar los neutrófilos de la sangre como se ha descrito previamente^{3,4}. Se tomaron muestras de sangre mediante la vena de la cola regularmente y se determinó la diferenciación de células sanguíneas en un aparato de diferenciación de células Sysmex (Goffin Meyvis, Etten-Leur, Los Países Bajos).

Quimiotaxia *in vivo*

Ratones CCL3^{-/-} hembra o control WT recibieron una inyección i.p. de 500 ng de KC recombinante (Peptotech, Rocky Hill, NJ) o PBS. Dos horas después se aislaron sangre y células peritoneales y se analizaron para la composición de neutrófilos por citometría de flujo.

Citometría de flujo

Se recogieron leucocitos peritoneales por lavado de la cavidad peritoneal con PBS. Se incubaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en bruto y leucocitos peritoneales a 4 °C con tampón de lisis de eritrocitos (NH₄Cl 155 mM en Tris 10 mM/HCl, pH 7,2) durante 5 minutos. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm, se resuspendieron en tampón de lisis para eliminar los eritrocitos residuales. Las células se lavaron dos veces con PBS. Se incubaron suspensiones de células con 1 % de suero de ratón normal en PBS y se tiñeron para los marcadores superficiales CD11b, GR1 y CD71 (eBioscience, San Diego, CA.) a una concentración de 0,25 µg de Ab/200.000 células. Posteriormente, las células se sometieron a análisis de citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences, San Diego, CA). Se analizaron los datos FACS con el software CELLQuest (BD Biosciences).

Análisis estadístico

Los datos se expresan como media $\pm$ EEM. Se usó una prueba de la t de Student bilateral para comparar grupos individuales, mientras que se compararon múltiples grupos con un ANOVA unilateral y una prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls posterior. Se analizaron datos no paramétricos usando una prueba de la U de Mann-Whitney. Se consideró significativo un nivel de $P < 0,05$.

Resultados

El análisis de expresión temporal de lesiones ateroscleróticas en ratones LDLr^{-/-} mostró una clara regulación por incremento transitoria de CCL3 en placas iniciales (2 semanas después de la colocación del collar). En etapas más avanzadas de progresión de la lesión, CCL3 está volviendo a su nivel original. Esta expresión va inicialmente acompañada de elevada expresión del marcador de macrófagos CD68 del cual sus niveles siguen altos en momentos de tiempo posteriores. La expresión de CD36 es algo retardada en comparación con CD68 y CCL3 (Figura 16). Los perfiles de expresión sugieren que CCL3 puede estar involucrado en el reclutamiento crítico de células inflamatorias para sitios de lesión aterosclerótica. La exposición *in vitro* de macrófagos RAW 264.7 a ox-LDL conduce a una inducción moderada de expresión de CCL3, mientras que el ligando de TLR4 LPS induce fuertemente MIP1 α al nivel de ARNm (Figura 17).

Para evaluar los efectos de la deficiencia de CCL3 hematopoyéticos sobre la migración y activación de leucocitos, además de sobre la aterogénesis, los presentes inventores reconstituyeron ratones LDLr^{-/-} con médula ósea CCL3^{-/-}. La deficiencia de CCL3 no influyó en el peso corporal o los niveles de colesterol totales durante el transcurso del experimento (datos no mostrados). Los niveles de MIP1 α en plasma no fueron significativamente diferentes entre quimeras CCL3^{-/-} y controles de compañeros de camada ($2,4 \pm 0,8$ pg/ml en WT frente a $0,9 \pm 0,6$ pg/ml en quimeras CCL3^{-/-}; $p = 0,1$, Figura 17C). El fenotipo deficiente en CCL3 fue mucho más pronunciado después del tratamiento *in vivo* con LPS. Niveles de MIP1 α circulante 24 h después del tratamiento con LPS fueron fuertemente elevados en WT pero no en quimeras CCL3^{-/-} ($14,7 \pm 0,4$ pg/ml en control en comparación con $2,1 \pm 1,0$ pg/ml en quimeras CCL3^{-/-}; $p = 0,00005$, Figura 18A).

Se redujo el desarrollo de lesiones en la raíz aórtica de quimeras CCL3^{-/-} un significativo 31 % ($135,1 \pm 76,5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ en CCL3^{-/-} en comparación con $198,4 \pm 51,4 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ en controles; $P = 0,04$, Figura 19A). El porcentaje de macrófagos MoMa-2⁺ de la íntima no fue diferente entre grupos ($19,3 \pm 2,6$ % en controles frente a $22,9 \pm 3,0$ % en CCL3^{-/-}, Figura 18B), sugiriendo que CCL3 solo puede no ser muy crítico en la acumulación de macrófagos y proliferación en la placa aterosclerótica. Los números de linfocitos T CD3 no estuvieron influidos por la deficiencia de CCL3 ($2,9 \pm 1,2$ linfocitos T/mm² de placa en controles y $2,6 \pm 1,5$ linfocitos T/mm² de placa en CCL3^{-/-}, Figura 18D). A diferencia, la cantidad de neutrófilos de placa ($7,0 \pm 0,7$ en WT en comparación con $2,9 \pm 0,8$ /mm² de tejido de la íntima en placas CCL3^{-/-}; $p = 0,001$, Figura 18E), además de la adhesión de neutrófilos, fueron significativamente reducidas en placas de CCL3^{-/-} (Figura 18F). Como medida de la etapa de progresión de la lesión, se determinó la deposición de colágeno de la íntima. El porcentaje de colágeno en placas de CCL3^{-/-} no estuvo influido por la deficiencia de CCL3 ($7,5 \pm 1,4$ en WT en comparación con $5,7 \pm 1,0$ % en quimeras de CCL3^{-/-}, Figura 18C).

La deficiencia de CCL3 no influyó en el número total de glóbulos blancos circulantes en animales WT y trasplantados con CCL3^{-/-} ($4,4 \pm 0,7$ en WT frente a $3,9 \pm 0,6 \times 10^6$ células/ml en CCL3^{-/-}, Figura 19A) y el número de monocitos circulantes no estuvo afectado por la deficiencia de CCL3 tampoco ($7,7 \pm 1,1$ en WT frente a $8,9 \pm 1,0$ % en quimeras CCL3^{-/-}, Figura 19B). De forma interesante, el porcentaje de neutrófilos circulantes fue significativamente reducido en quimeras CCL3^{-/-} ($35,3 \pm 3,9$ en WT frente a $23,6 \pm 2,5$ % en quimeras CCL3^{-/-}; $p = 0,02$, Figura 19C).

Los reducidos números de neutrófilos pueden resultar de una reducida semivida o una diferenciación alterada y salida del estroma de neutrófilos. Para investigar esto, se trataron animales con una única inyección de ciclofosfamida y se monitorizó la eliminación/cinética de repoblación de neutrófilos durante 10 días. El número de leucocitos basales y la composición celular no fue diferente entre controles WT y ratones CCL3^{-/-}. Células deficientes en CCL3 fueron ligeramente más sensibles a tratamiento con ciclofosfamida (Figura 20A,B), ya que la semivida de los leucocitos estuvo significativamente potenciada en ratones CCL3^{-/-} en comparación con WT ($1,09 \pm 0,07$ días en WT en comparación con $0,89 \pm 0,06$ días en CCL3^{-/-}; $p = 0,04$, Figura 20C) y pareció igualmente distribuida en el subconjunto de neutrófilos y linfocitos (Figura 20C). Así, ratones deficientes en CCL3 muestran una reducida semivida de neutrófilos que coincide con los reducidos números de neutrófilos circulantes y en placas en esta cepa. La repoblación de células se inició 5 días después de la inyección y fue similar entre CCL3^{-/-} y controles WT (Figura 20D).

A continuación, los presentes inventores evaluaron la respuesta quimiotáctica de neutrófilos WT y CCL3^{-/-} hacia un gradiente de la principal quimiocina en el reclutamiento de neutrófilos, KC. Dos horas después de la inyección i.p. de KC, se aislaron WBC y leucocitos peritoneales y se analizaron para el contenido de neutrófilos. Los números de neutrófilos circulantes fueron similares entre animales WT y CCL3^{-/-} ($6,1 \pm 1,0$ en WT en comparación con $5,3 \pm 1,0$ en CCL3^{-/-}, Figura 21A). Sorprendentemente, dados los reducidos números de neutrófilos circulantes, los animales CCL3^{-/-} tuvieron números de neutrófilos ligeramente potenciados en el peritoneo en condiciones normales ($0,6 \pm 0,5$ % en WT en comparación con $1,4 \pm 0,07$, $p = 0,2$, datos no mostrados). Las inyecciones de KC indujeron fuertemente la migración de neutrófilos hacia el peritoneo de animales de control. Los números de neutrófilos

peritoneales después de las inyecciones de KC en animales CCL3^{-/-} fueron solo marginalmente más bajos en comparación con animales WT (12,3 ± 0,4 en controles en comparación con 10,2 ± 1,9 en animales CCL3^{-/-}, datos no mostrados). Sin embargo, la inducción de la entrada de neutrófilos se redujo en animales CCL3^{-/-} (20x inducción en WT en comparación con 7,5x inducción en CCL3^{-/-}, p=0,003; Figura 21C), que sugiere quimiotaxis alterada de neutrófilos CCL3^{-/-} en condiciones de inflamación.

De forma interesante, se atenuó la formación de placas como resultado de la ausencia específica de leucocitos de CCL3, que puede ser debido a una reducida acumulación de neutrófilos en la placa. Conjuntamente, los datos de los presentes inventores indican que la deficiencia de CCL3 se traducirá en una semivida de neutrófilos reducida y en una acumulación de neutrófilos dependiente de CXCR2 alterada en la placa, que posteriormente se traducirá en progresión de placas atenuada.

Discusión

La migración mediada por quimiocinas de leucocitos en la pared del recipiente es una etapa esencial en la formación y progresión de lesiones ateroscleróticas⁵. La quimiocina CC CCL3 puede interactuar con los receptores de quimiocinas CCR4, CCR1 y CCR5, de los que los dos últimos participan en la aterogénesis. Combinado con la expresión aórtica regulada por incremento durante la aterogénesis⁶, y su potente efecto quimiotáctico sobre linfocitos T, macrófagos y neutrófilos TNF-α⁷, es concebible una función de esta quimiocina en la aterogénesis. Aquí, los presentes inventores muestran que los leucocitos son la principal fuente de CCL3 en condiciones de inflamación y que la deficiencia de leucocitos CCL3 atenúa el desarrollo de placas, alterando la semivida de los neutrófilos y reduciendo la acumulación de neutrófilos.

Experimentos *in vitro* establecieron claramente que los macrófagos activados son una fuente rica de CCL3, que está en coincidencia con datos previos⁸. Además, se observó que niveles de CCL3 iniciales en la circulación eran solo parcialmente de origen de leucocito, pero producidos casi exclusivamente por leucocitos durante la respuesta inflamatoria producida por LPS^{2,9}. Los perfiles de expresión del desarrollo de lesiones ateroscleróticas reveló que CCL3 está principalmente regulado por incremento durante la progresión temprana de lesiones, sugiriendo que CCL3 participa en la inflamación de placas⁶. La aterogénesis en ratones CCL3^{-/-} fue significativamente atenuada, pero no fueron evidentes efectos sobre el contenido de macrófagos o linfocitos T. De forma interesante, la deficiencia hematopoyética y sistémica de uno de los receptores de CCL3, CCR1, condujo a aterosclerosis acelerada^{10,11}. Placas deficientes en CCR1 contuvieron más macrófagos y linfocitos T y linfocitos T CCR1^{-/-} produjeron más IFNγ¹⁰. En cambio, se mostró que la deficiencia funcional de CCR5, ya fuera en el linaje hematopoyético o por vía sistémica, reducía el desarrollo de lesiones ateroscleróticas y las placas contuvieron menos macrófagos y linfocitos T^{11,12}. El antagonismo de CCR5 por el uso de Met-RANTES atenuó similarmente el desarrollo de aterosclerosis, contenido de macrófagos y de linfocito T. Además, el tratamiento con Met-Rantes produjo niveles de expresión más bajos de CCR5, pero no de su ligando CCL3¹³. Se mostró que CCL3 tenía una afinidad de unión más alta por CCR5^{14,15}, que sugiere que los efectos mediados por CCR5 son primarios durante una inflamación de baja tasa crónica, mientras que la inflamación sustancial aguda podría corregir estos efectos mediante señalización de CCR1. El cambio fenotípico observado en la deficiencia de CCL3 hematopoyéticos parece estar más de acuerdo con el de función de CCR5 alterada, a pesar de que los presentes inventores no observaron ningún efecto perceptible sobre el contenido de macrófagos en placas. Esto indica que, aunque CCL3 podría influir en la migración de células inflamatorias, no es crucial en la migración de monocitos o linfocitos T hacia la placa.

Los neutrófilos no estuvieron implicados, hasta recientemente, en la patogénesis de la aterosclerosis. Sin embargo, cada vez se están acumulando más datos que soportan una función activa de este subconjunto de glóbulos blancos en esta enfermedad. Naruka y col. mostraron que los infiltrados de neutrófilos en placas se asociaban a eventos coronarios agudos¹⁶. El soporte experimental vino de van Leeuwen y colaboradores que muestran la abundante presencia de neutrófilos en placas de ratón avanzadas¹⁷, y de una expansión colaboradora después del bloqueo de CXCR4¹⁸. Los neutrófilos de placas son potentes células inflamatorias que actúan en un estrecho periodo de tiempo. Los neutrófilos están asociados a elevada apoptosis de la íntima y un fenotipo pro-inflamatorio¹⁸. Posiblemente, la acumulación de neutrófilos en lesiones ateroscleróticas puede inducir la desestabilización de placas como resultado de la potenciada inflamación, formación de núcleos necróticos como consecuencia de lesión oxidativa y degradación de matriz por liberación de elastasas de neutrófilos. Se ha informado que CCL3 es capaz de aumentar la quimiotaxis de neutrófilos inducida por la citocina pro-inflamatoria INFRA de una manera dependiente de CCR5⁷. En coincidencia con estos hallazgos, los presentes inventores muestran migración de neutrófilos atenuada a y diapédesis en la placa en deficiencia de CCL3 hematopoyéticos. Además, se redujo la migración de neutrófilos *in vivo* hacia KC (análogo de IL8 murino) en ratones CCL3^{-/-}. Esto indica que IL-8, similar a TNFα, puede inducir la migración de neutrófilos mediada por CCL3.

Otra opción interesante es que CCL3 afecta la homeostasis de neutrófilos. Durante la inflamación, los números de neutrófilos circulantes fueron significativamente más bajos en ratones CCL3^{-/-}, que coinciden bien con la noción de que la apoptosis de neutrófilos está considerada una medida protectora para amortiguar las respuestas inflamatorias agudas y prevenir el daño tisular no deseado¹⁹. Por tanto, neutrófilos terminalmente madurados muestran una semivida bruscamente reducida. Además, tienen migración alterada y desgranulación^{20,21}. Los presentes inventores observaron un claro efecto de CCL3^{-/-} sobre la eliminación cinética de neutrófilos, ya que se redujo la semivida de neutrófilos deficientes en CCL3. Sin embargo, la repoblación de neutrófilos no estuvo influida por la deficiencia de

CCL3, que muestra que la maduración de neutrófilos y la liberación del estroma no están en sí mismos influidos. Estos datos sugieren que los neutrófilos CCL3^{-/-} son más sensibles a ciclofosfamida, y quizás a otras señales proapoptóticas que conducen a semivida reducida.

- 5 Tomados conjuntamente, los datos de los presentes inventores establecen claramente una función causal para neutrófilos en el desarrollo de aterosclerosis. Además, los presentes inventores suponen que en condiciones de CCL3 derivados de leucocitos de inflamación pueden, posiblemente en concierto con TNF α , alterar la homeostasis de neutrófilos y potenciar la quimiotaxia de neutrófilos hacia la placa aterosclerótica para acelerar la formación de lesiones.

Tabla 8: Secuencias de cebadores de RT-PCR y fuentes.

Gen	cebador directo (5'-3')	cebador inverso (5'-3')
CCL3	<u>GCCACATCGAGGGACTCTTC</u>	<u>GATGGGGGTTGAGGAACGTG</u>
	<u>A</u>	
CD36	<u>GTTCCTCCAGCCAATGCCTT</u>	<u>ATGTCTAGCACACCATAAGATGTA</u>
	<u>T</u>	<u>CAGTT</u>
CD68	<u>CCTCCACCCTCGCCTAGTC</u>	<u>TTGGGTATAGGATTGGATTGA</u>
HPRT	<u>TTGCTCGAGATGTCATGAAG</u>	<u>AGCAGGTCAGCAAAGAACTTATAG</u>
	<u>GA</u>	
CypA	<u>CCATTTCAAGAAGCAGCGTT</u>	<u>ATTTTGTCTTAACTGGTGGGTCTGT</u>
	<u>T</u>	

Referencias

1. von der Thusen JH, van Berkel TJ, Biessen EA. Induction of rapid atherogenesis by perivascular carotid collar placement in apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*. Feb 27 2001;103(8):1164-1170.
2. Kasama T, Strieter RM, Standiford TJ, y col. Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. *J Exp Med*. Jul 1 1993;178(1):63-72.
3. Zuluaga AF, Salazar BE, Rodriguez CA, y col. Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases. *BMC Infect Dis*. 2006;6:55.
4. Spellberg BJ, Collins M, French SW, y col. A phagocytic cell line markedly improves survival of infected neutropenic mice. *J Leukoc Biol*. Aug 2005;78(2):338-344.
5. Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res*. Oct 29 2004;95(9):858-866.
6. Moos MP, John N, Grabner R, y col. The lamina adventitia is the major site of immune cell accumulation in standard chow-fed apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Nov 2005;25(11):2386-2391.
7. Montecucco F, Steffens S, Burger F, y col. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1alpha) on human neutrophils through defined signalling pathways. *Cell Signal*. Mar 2008;20(3):557-568.
8. Fahey TJ, 3rd, Tracey KJ, Tekamp-Olson P, y col. Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J Immunol*. May 1 1992; 148(9):2764-2769.
9. Harrison LM, van den Hoogen C, van Haaften WC, y col. Chemokine expression in the monocytic cell line THP-1 in response to purified shiga toxin 1 and/or lipopolysaccharides. *Infect Immun*. Jan 2005;73(1):403-412.
10. Potteaux S, Combadiere C, Esposito B, y col. Chemokine receptor CCR1 disruption in bone marrow cells enhances atherosclerotic lesion development and inflammation in mice. *Mol Med*. Jan-Dec 2005;11(1-12):16-20.
11. Potteaux S, Combadiere C, Esposito B, y col. Role of bone marrow-derived CC-chemokine receptor 5 in the development of atherosclerosis of low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Aug 2006;26(8):1858-1863.
12. Braunersreuther V, Zernecke A, Arnaud C, y col. Ccr5 but not Ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Feb 2007;27(2):373-379.
13. Veillard NR, Kwak B, Pelli G, y col. Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice. *Circ Res*. Feb 6 2004;94(2):253-261.
14. Neote K, DiGregorio D, Mak JY, y col. Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. *Cell*. Feb 12 1993;72(3):415-425.
15. Samson M, Labbe O, Mollereau C, y col. Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry*. Mar 19 1996;35(11):3362-3367.

16. Naruko T, Ueda M, Haze K, y col. Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation*. Dec 3 2002;106(23):2894-2900.
17. van Leeuwen M, Gijbels MJ, Duijvestijn A, y col. Accumulation of myeloperoxidase-positive neutrophils in atherosclerotic lesions in LDLR-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jan 2008;28(1):84-89.18
- 5 18. Zernecke A, Bot I, Djalali-Talab Y, y col. Protective role of CXC receptor 4/CXC ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis. *Circ Res*. Feb 1 2008;102(2):209-217.
19. Luo HR, Loison F. Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. *Am J Hematol*. Apr 2008;83(4):288-295.
20. Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol*. Apr 1997;61(4):375-380.
- 10 21. Whyte MK, Meagher LC, MacDermot J, y col. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J Immunol*. Jun 1 1993;150(11):5124-5134.

Listado de secuencias

<110> Universiteit Leiden
Academisch Ziekenhuis Leiden Acting Under The Name Leiden University Medical Center

15 <120> Biomarcadores de futuros eventos cardíacos

<130> RT/P2230EP01

20 <150> 08830897.8
<151> 10-09-2008

<150> PCT/IB2008/002771
<151> 10-09-2008

25 <150> 0717637.3
<151> 10-09-2007

<160> 22

30 <170> Patent In versión 3.5

<210> 1
<211> 23
35 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

40 <400> 1
gaaatgtcag ttgctgcatt cct 23

<210> 2
45 <211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
50 <223> Cebador

<400> 2
acaatccgcc caaaggggaac 20

55 <210> 3
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>
<223> Cebador

<400> 3

	agtcctggca gtcagatga a	21
5	<210> 4 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador	
	<400> 4 gaagatgaga acttcacct aaagcata	28
15	<210> 5 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador	
	<400> 5 tcctgctgac gattgacagg ta	22
25	<210> 6 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador	
	<400> 6 gtgcccgcga ggcaaac	17
35	<210> 7 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Cebador	
	<400> 7 ttggcctga gtaactgtga aa	22
45	<210> 8 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Cebador	
	<400> 8 tgagtcaccc caagagtctc tgtc	24
55	<210> 9 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Cebador	

	<400> 9		
	ctgctgcatg aacccggt	18	
5	<210> 10		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
10	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 10		
	ggaagaagtg gcgaggctact	20	
15	<210> 11		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
20	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 11		
	actgtgggct cctccaaatt t	21	
25	<210> 12		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
30	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 12		
	tccatgggtgg actgcgtg	18	
35	<210> 13		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
40	<220>		
	<223> Cebador		
45	<400> 13		
	agacatccgt tccctacaa gaa	23	
50	<210> 14		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 14		
	cagggctccg atgtataata attga	25	
60	<210> 15		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		

<223> Cebador
 <400> 15
 gtccacgttg atttctctc atc 23
 5
 <210> 16
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 16
 cgtgtggttaa gtaaaattgc tgct 24
 15
 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 17
 cccagaagtg gttgtttccc t 21
 25
 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 18
 ttctcttgag cctggatgct 20
 35
 <210> 19
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 19
 tctgcgctcc tgcattctg 18
 45
 <210> 20
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 20
 cagtgggcgg gcaatg 16
 55
 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60

ES 2 660 475 T3

	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 21	
5	cctggaggcc acctcttcta a	21
	<210> 22	
	<211> 25	
10	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
15	<400> 22	
	tcgagctcaa caatagaaat caatt	25

REIVINDICACIONES

1. Uso de quimiocina CCL18 y opcionalmente CCL5 como biomarcador para la identificación de si un sujeto de prueba está o no en riesgo elevado de un futuro síndrome o evento cardiovascular agudo.
- 5 2. El uso según la reivindicación 1, en el que el síndrome o evento cardiovascular puede comprender enfermedad de las arterias coronarias, aterosclerosis, infarto agudo de miocardio, arteriosclerosis, angina de pecho inestable, embolia, trombosis venosa profunda, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca congestiva o arritmia.
3. El uso según las reivindicaciones 1 o 2, para monitorizar el estado y/o progresión de dicho síndrome o evento.
- 10 4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, para monitorizar pautas terapéuticas y/o ensayos clínicos con el fin de detectar si un tratamiento particular puede ser o no eficaz en reducir un riesgo elevado de un síndrome o evento cardiovascular agudo.
5. El uso según cualquier reivindicación precedente, en el que dicho(s) biomarcador(es) se detecta/n en una célula tomada de un sujeto o una muestra de un líquido corporal de un individuo que puede derivar de sangre, por ejemplo, células mononucleares aisladas, o de una fracción de sangre, por ejemplo, plasma o suero, especialmente plasma.
- 15 6. El uso según cualquier reivindicación precedente, en el que el sujeto está seleccionado del grupo que consiste en ser humano, primate no humano, equino, bovino, ovino, caprino, leporino, aviar, felino o canino.
7. El uso según cualquier reivindicación precedente, en el que dichas una o más quimiocinas se detectan mediante un inmunoensayo tal como inmunoensayos asociados a enzima (ELISA); ensayos basados en fluorescencia, tales como fluoroinmunoensayo de lantánidos potenciado por disociación (DELFI), ensayos radiométricos, inmunoensayos múltiplex o ensayos de perlas citométricas (CBA); sensores.
- 20 8. Un procedimiento *in vitro* de predicción de si un individuo está o no en riesgo elevado de un futuro síndrome o trastorno cardiovascular agudo, procedimiento que comprende:
 - a) proporcionar una muestra de un líquido corporal de un individuo;
 - b) determinar un nivel de CCL18 y opcionalmente CCL5 en la muestra;
 - 25 c) comparar el nivel de CCL18 y opcionalmente CCL5 como se determinó en la etapa b) con un nivel de referencia de una muestra de un líquido corporal de un individuo sano de control; y
 - d) detectar si el nivel de dicho CCL18 y opcionalmente CCL5 como se determinó en la etapa b) es significativamente diferente de dicho nivel de referencia y, por lo tanto, si un individuo está o no en riesgo elevado de un síndrome o trastorno cardiovascular agudo.
- 30 9. El uso o procedimiento según cualquier reivindicación precedente, que comprende además la evaluación de síntomas clínicos y/o la determinación del nivel de al menos otro biomarcador en el sujeto seleccionado de CXCL 1 (IP-10), proteína C reactiva, troponina 1, creatina cinasa, creatina cinasa MB, CD40L, HDL, ESR, número de plaquetas, sexo, un índice cardíaco, mioglobina y/o interleucina-6, en el que la cantidad del al menos otro biomarcador es indicativa de enfermedad cardiovascular o una predisposición a la misma.

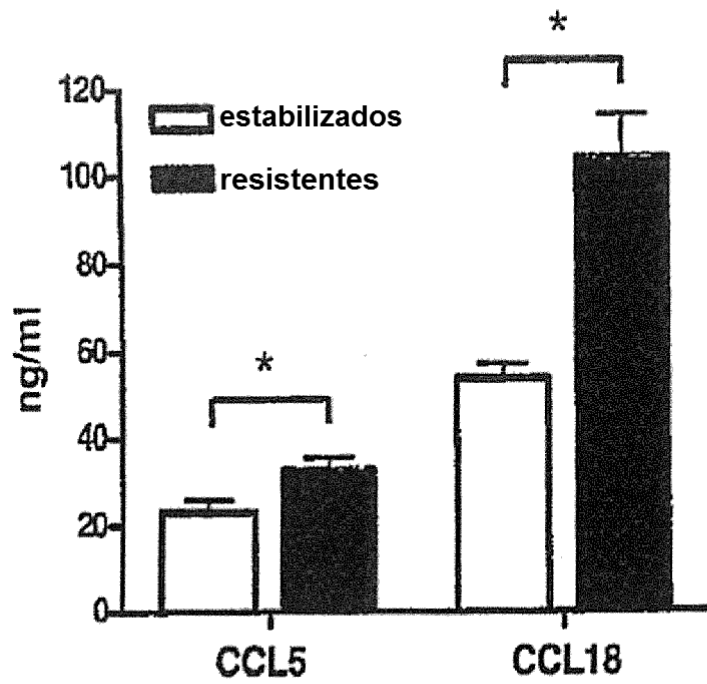


FIG. 1A

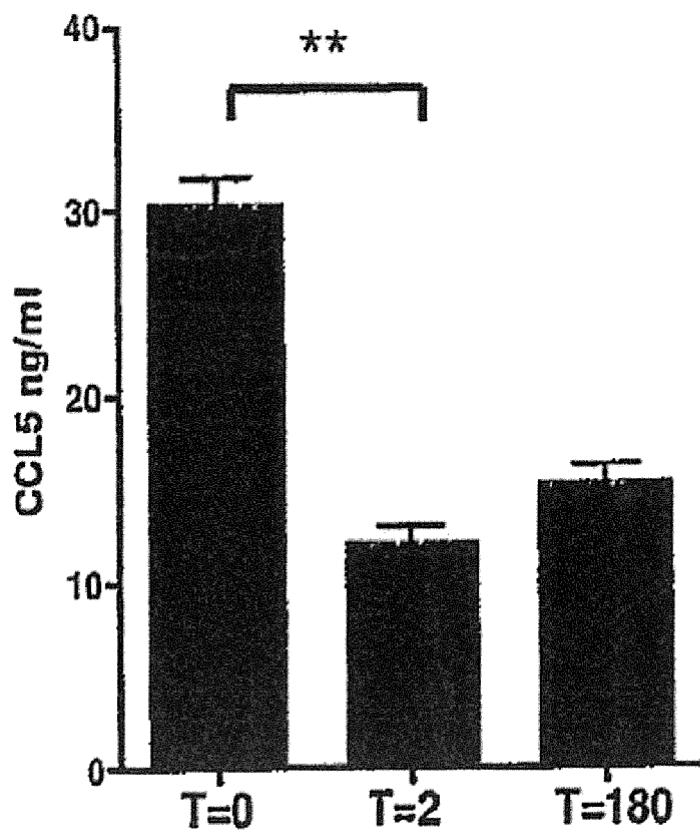


FIG. 1B

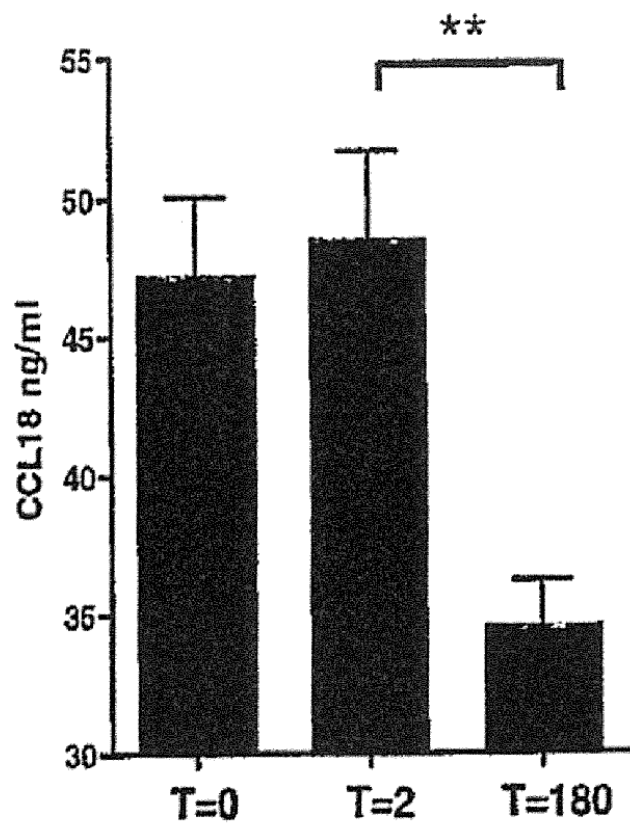


FIG. 1C

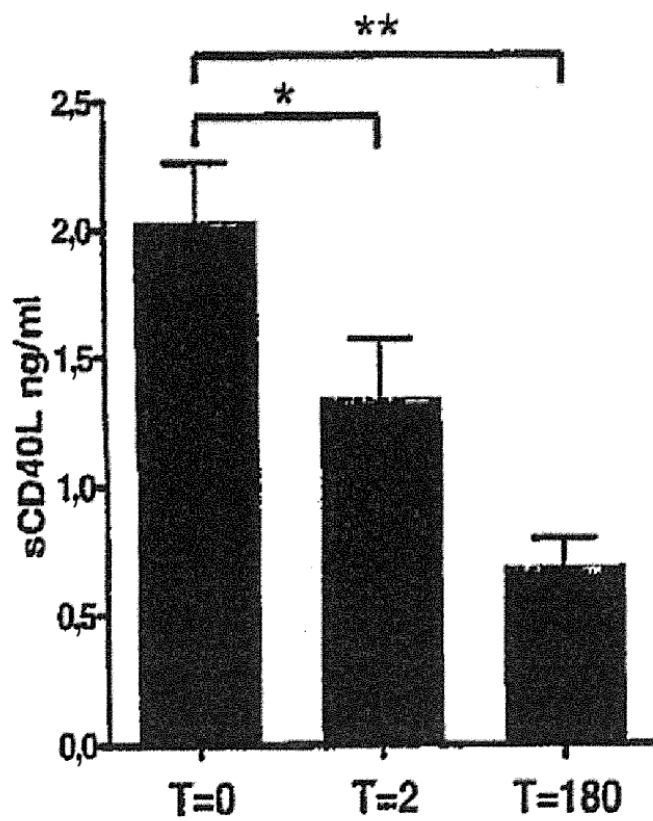


FIG. 1D

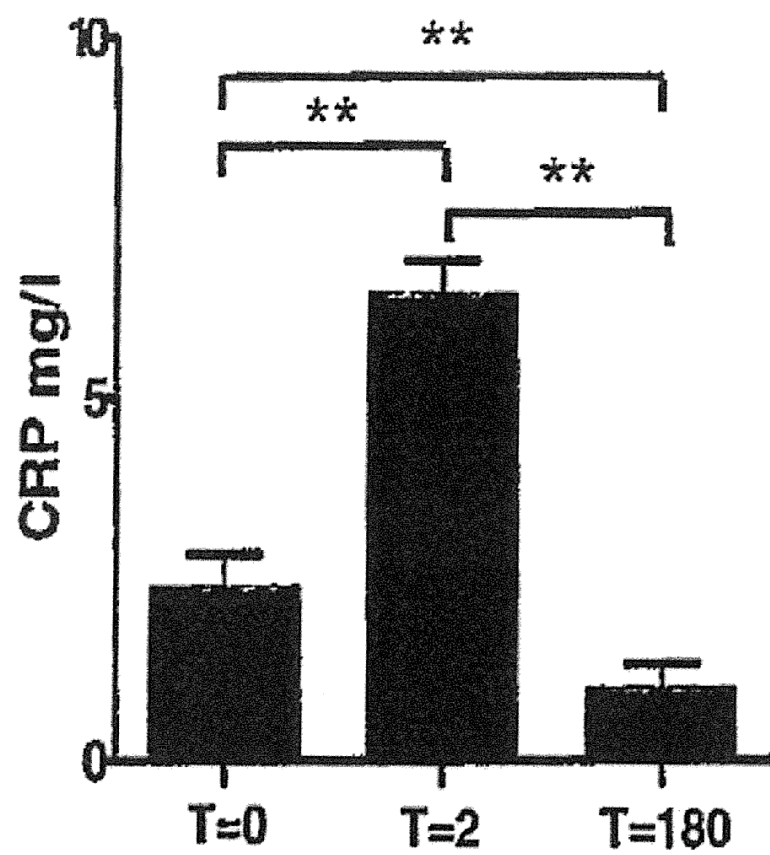


FIG. 1E

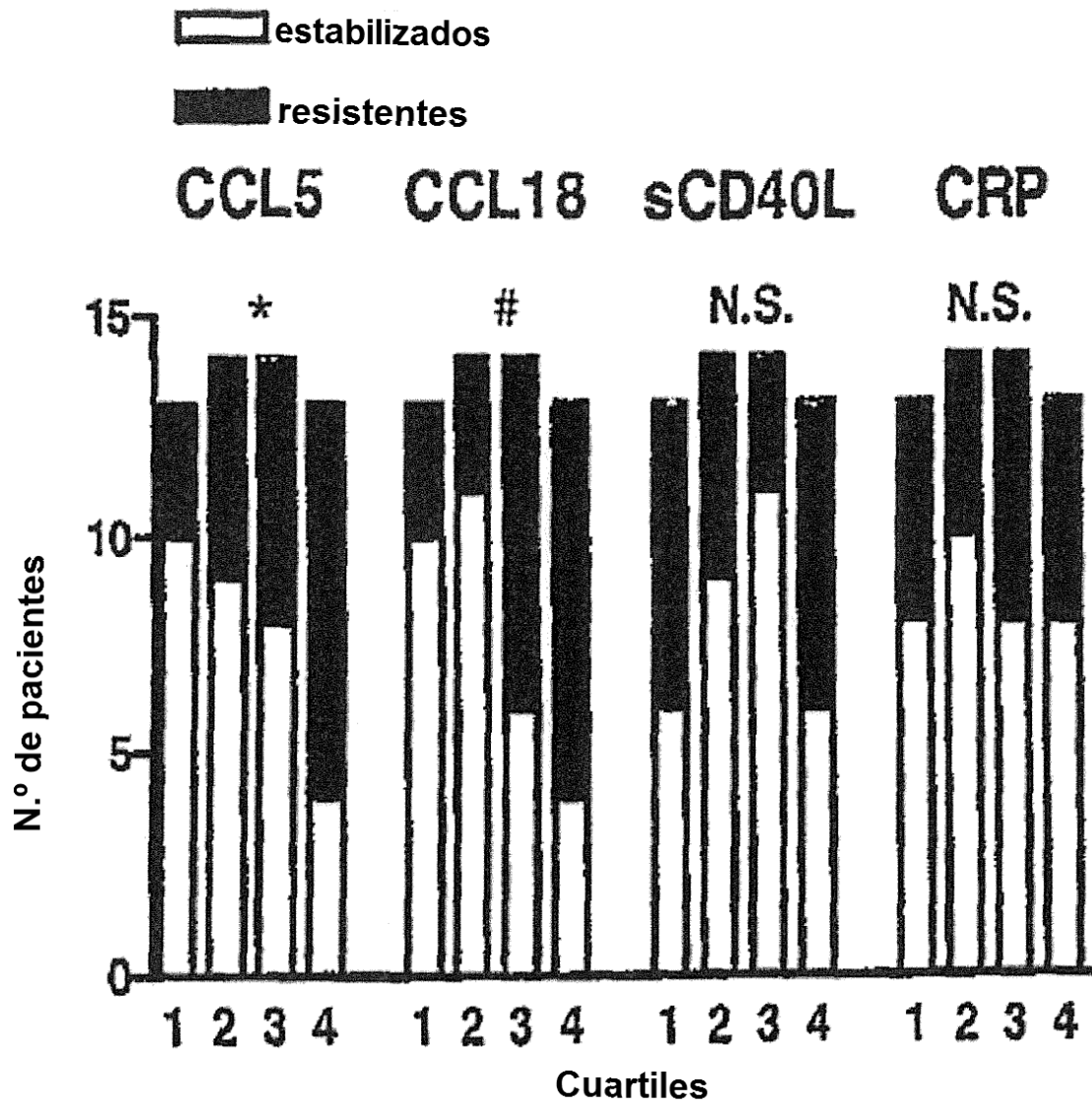
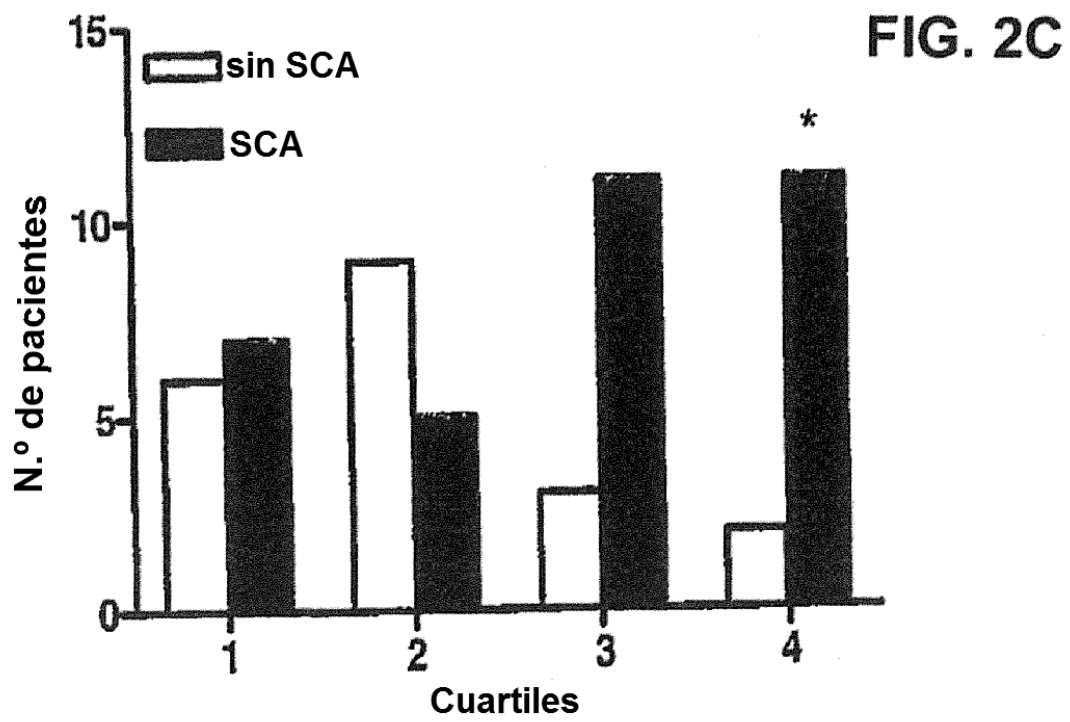
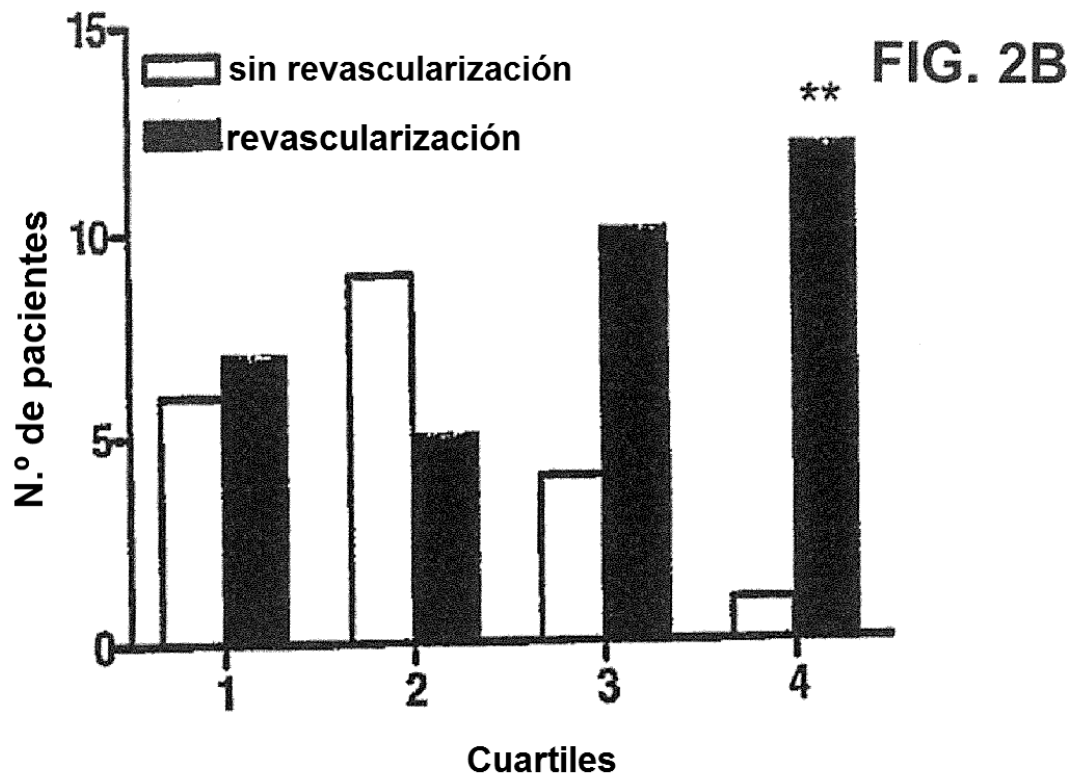


FIG. 2A



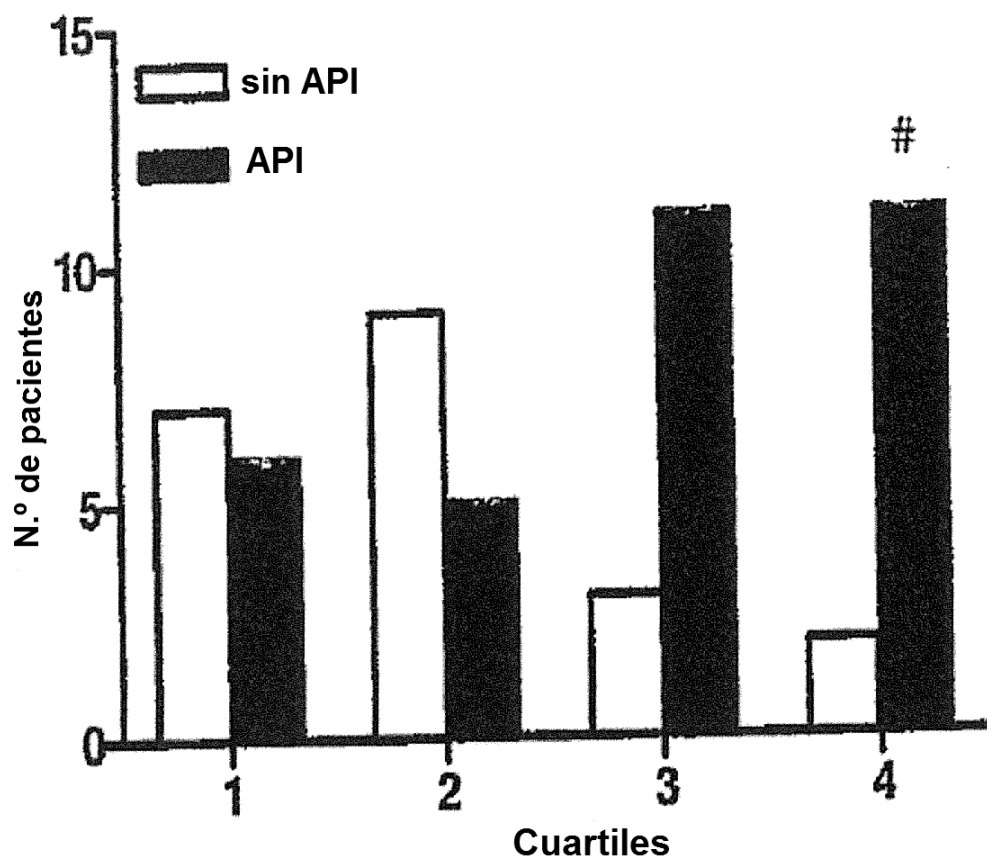


FIG. 2D

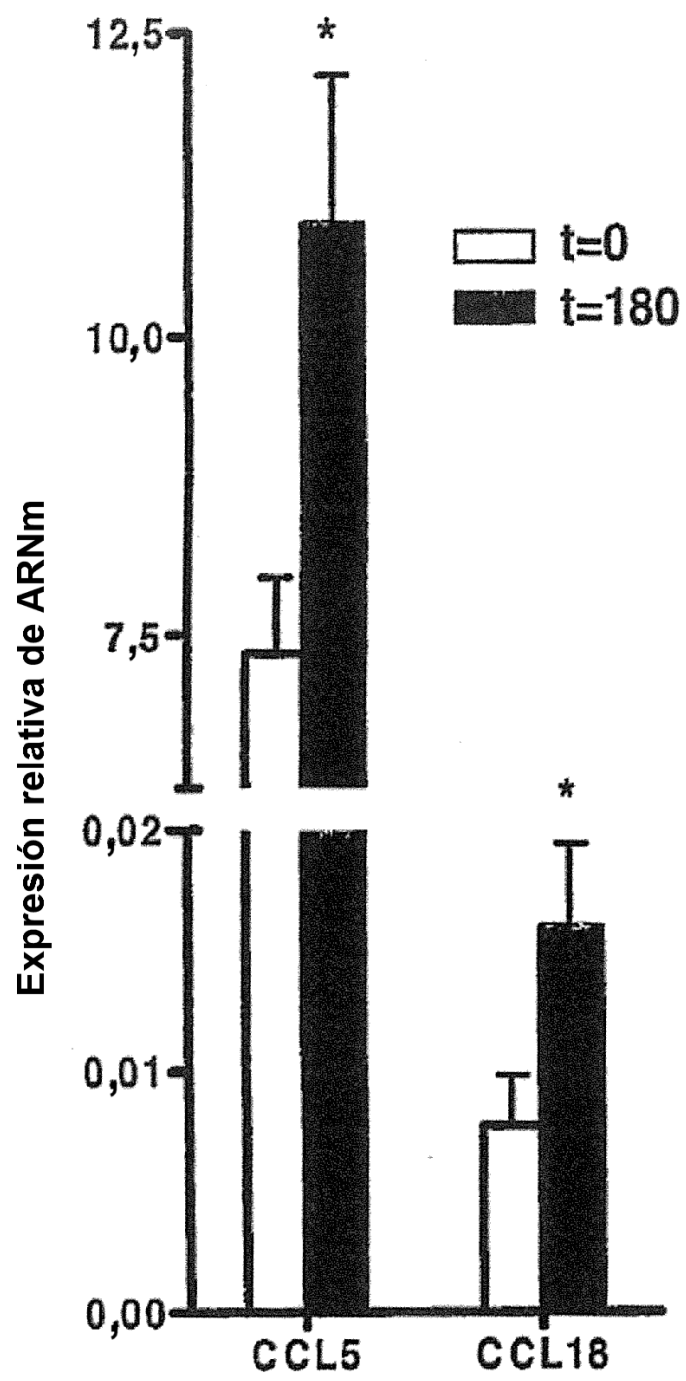
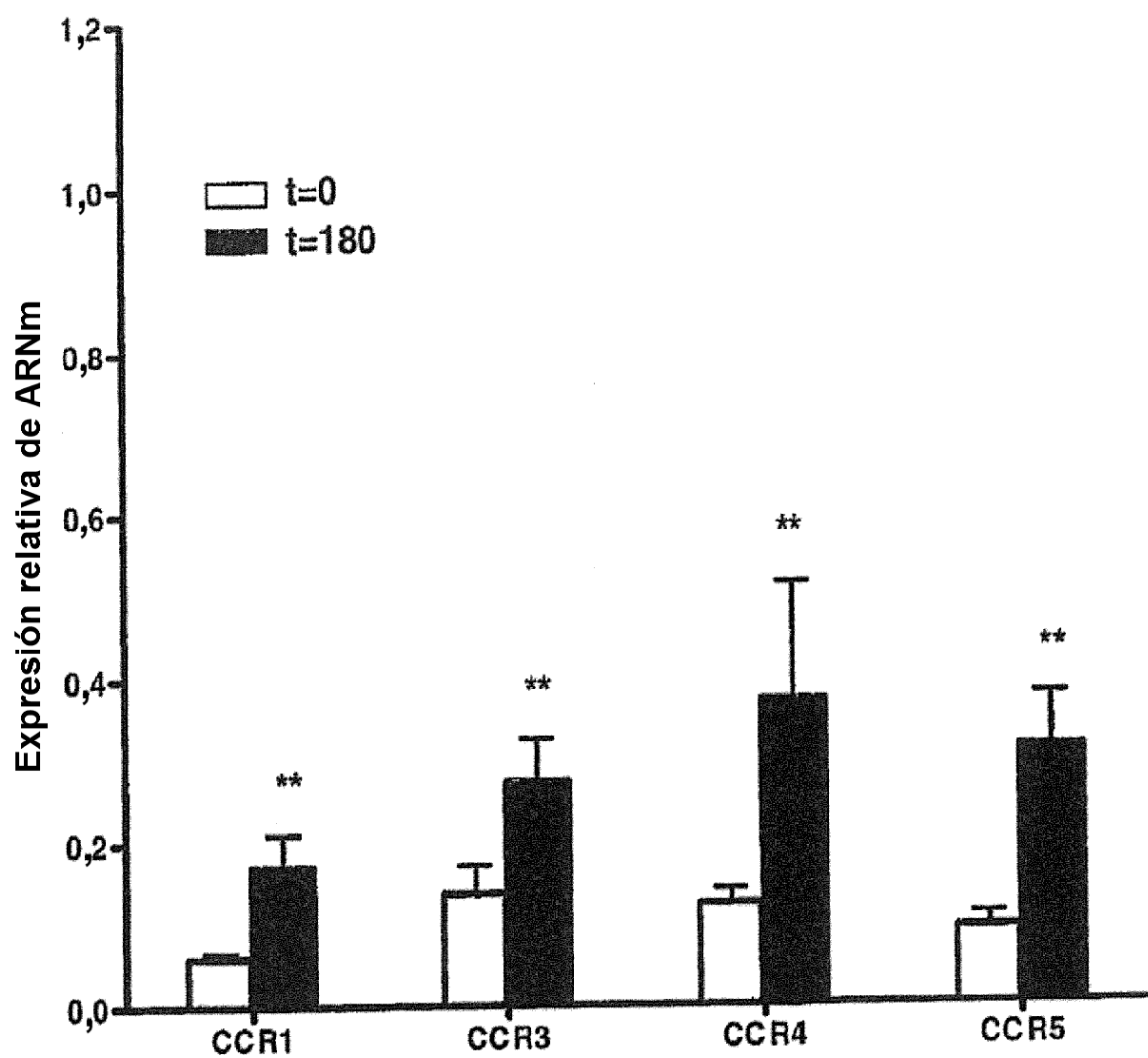


FIG. 3A

**FIG. 3B**

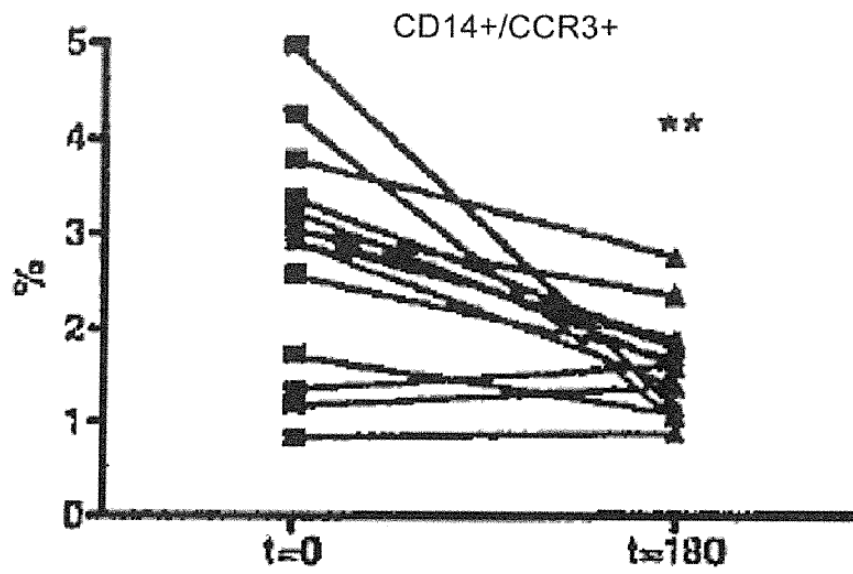


FIG. 4A

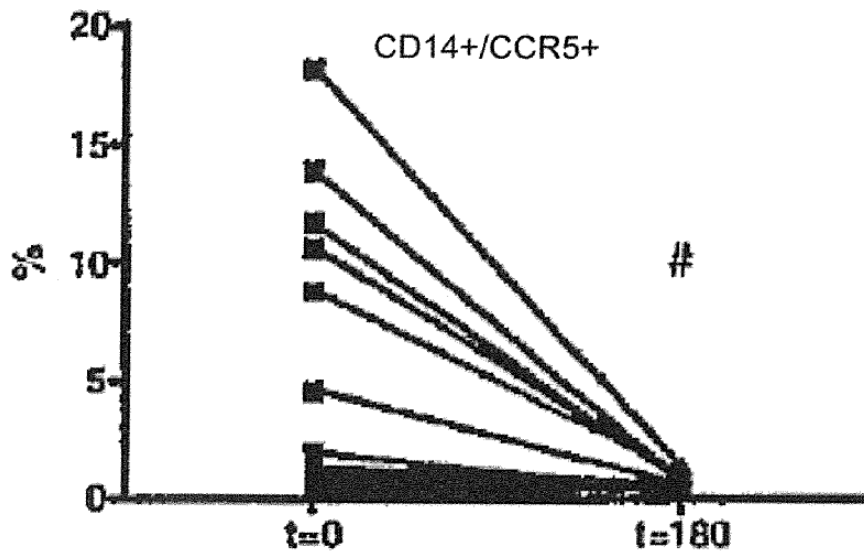


FIG. 4B

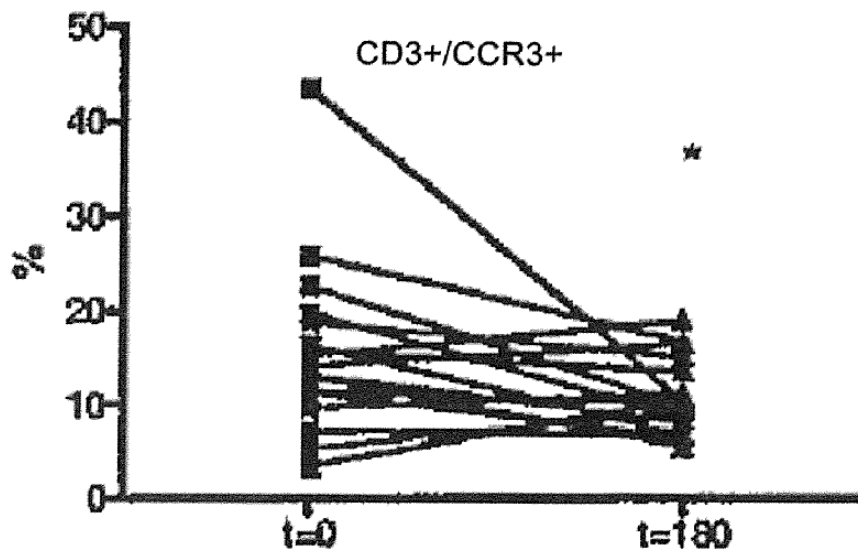


FIG. 4C

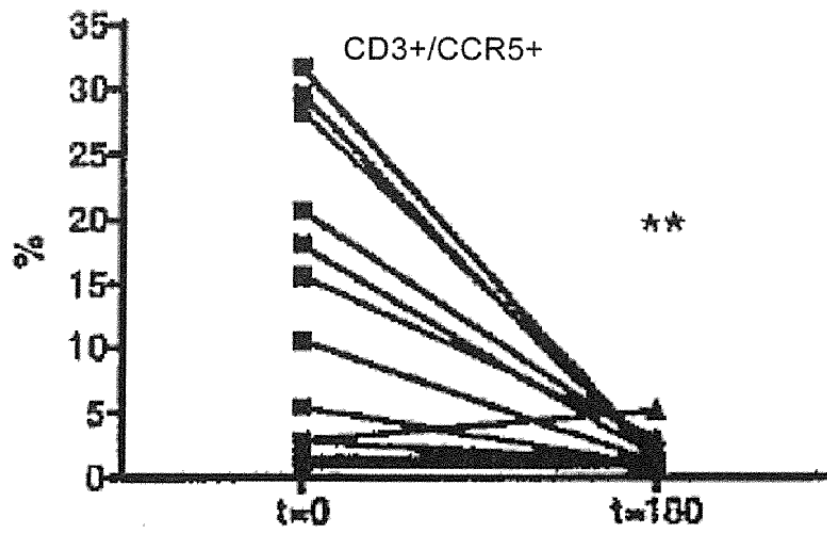


FIG. 4D

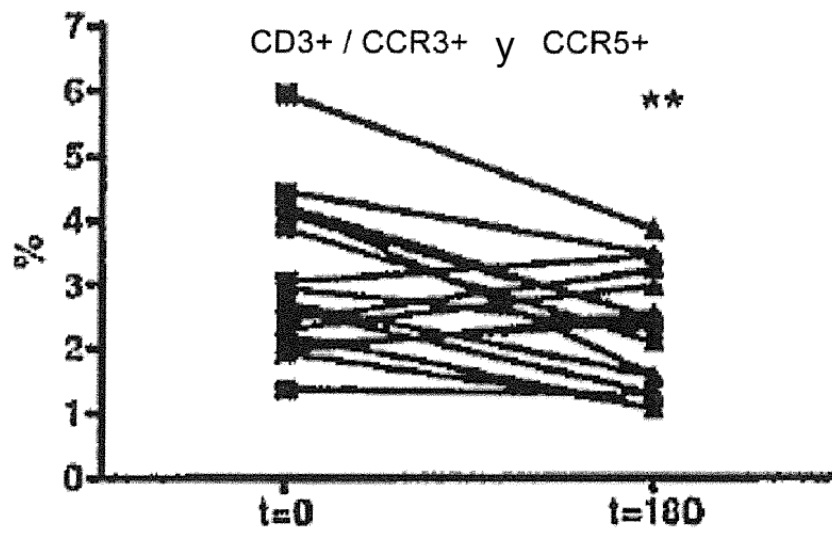


FIG. 4E

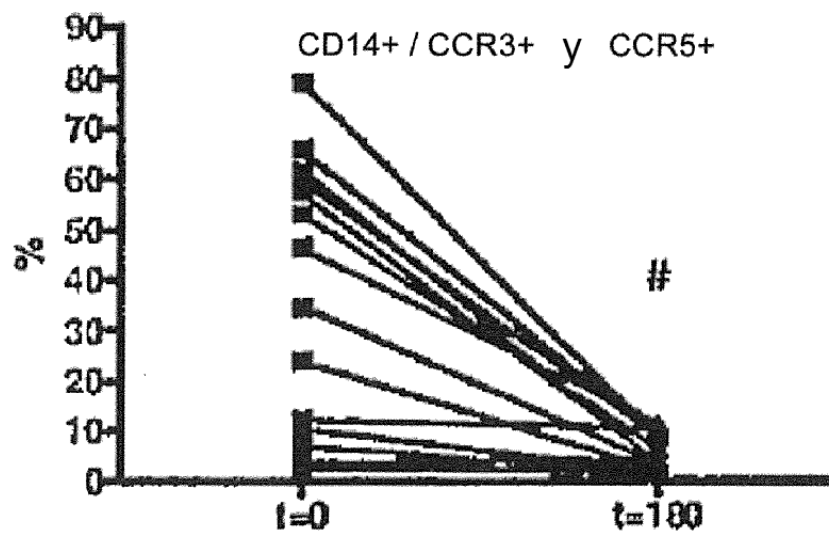


FIG. 4F

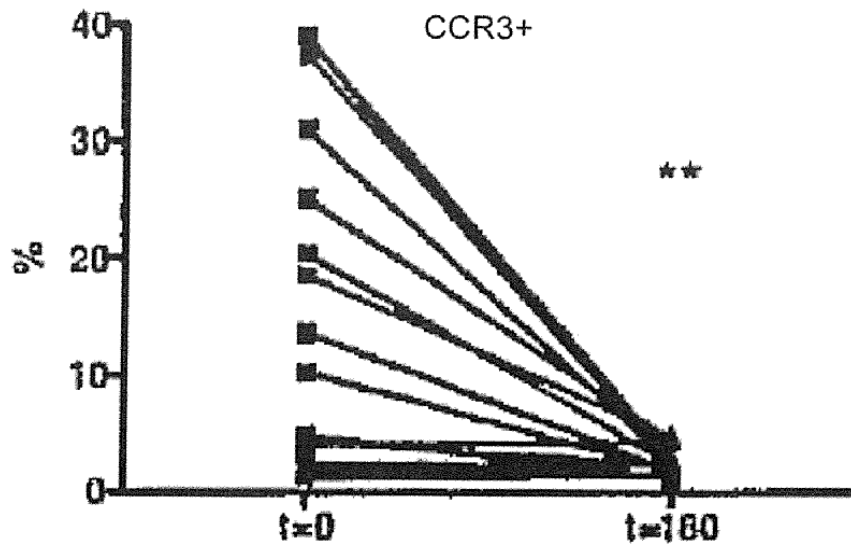


FIG. 4G

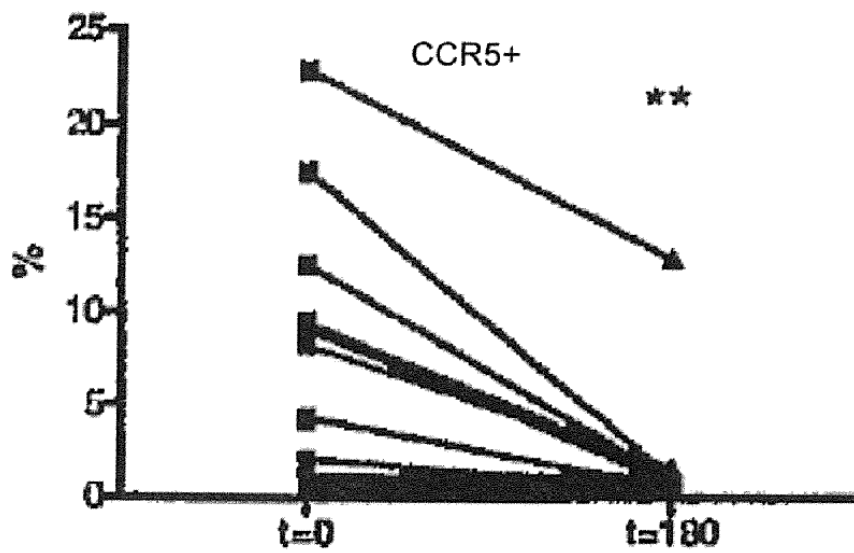


FIG. 4H

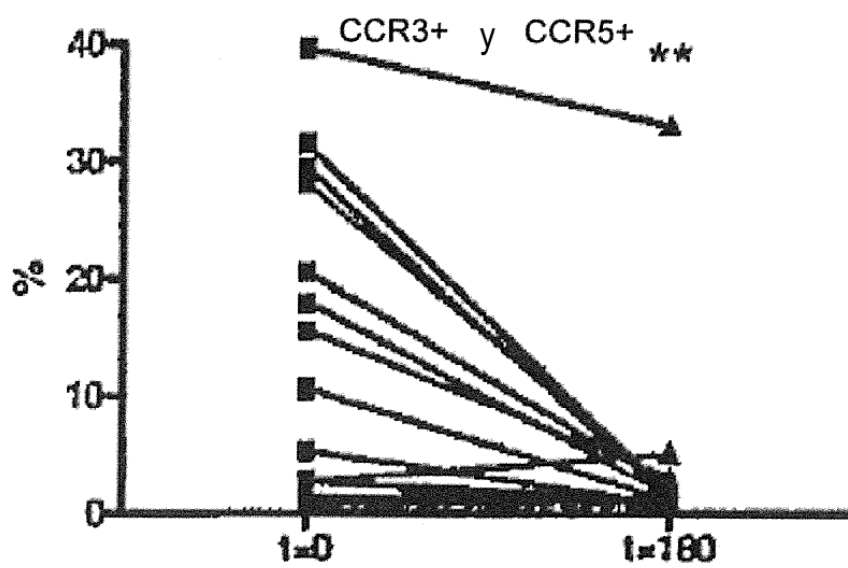


FIG. 4I

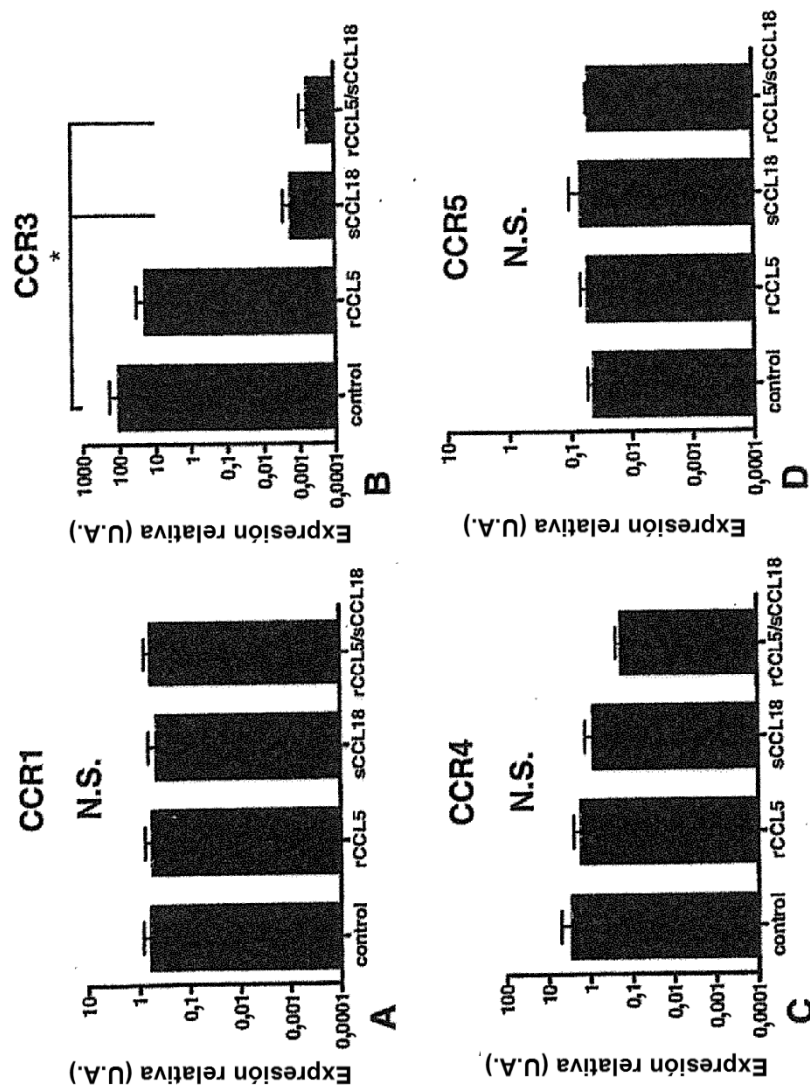


Figura 5

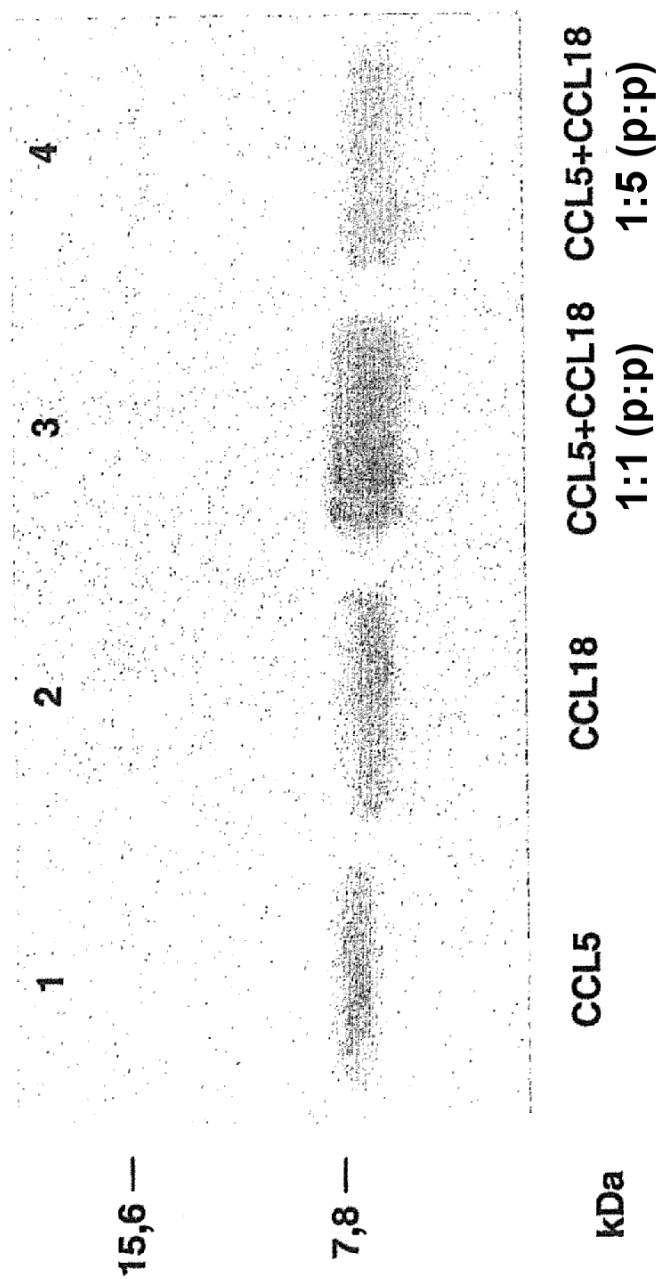


Figura 6

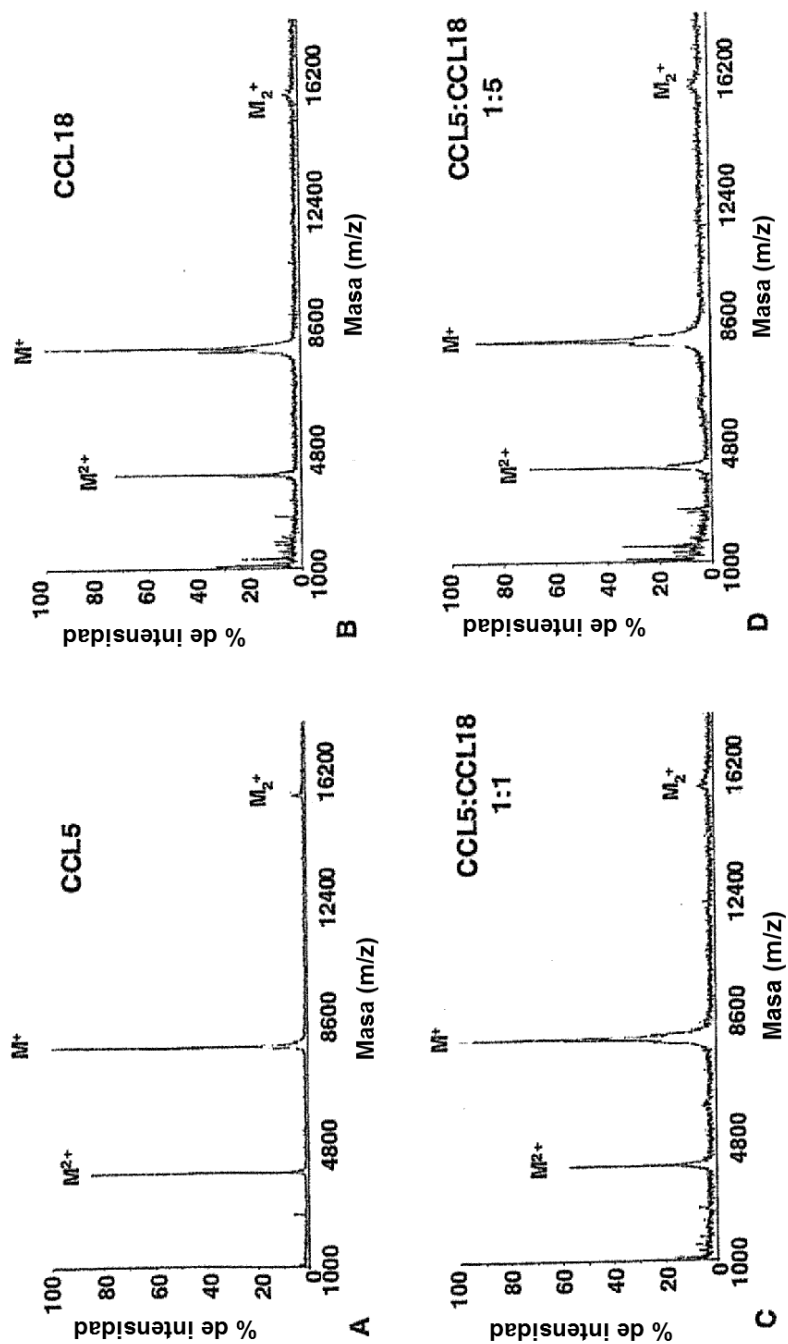


Figura 7

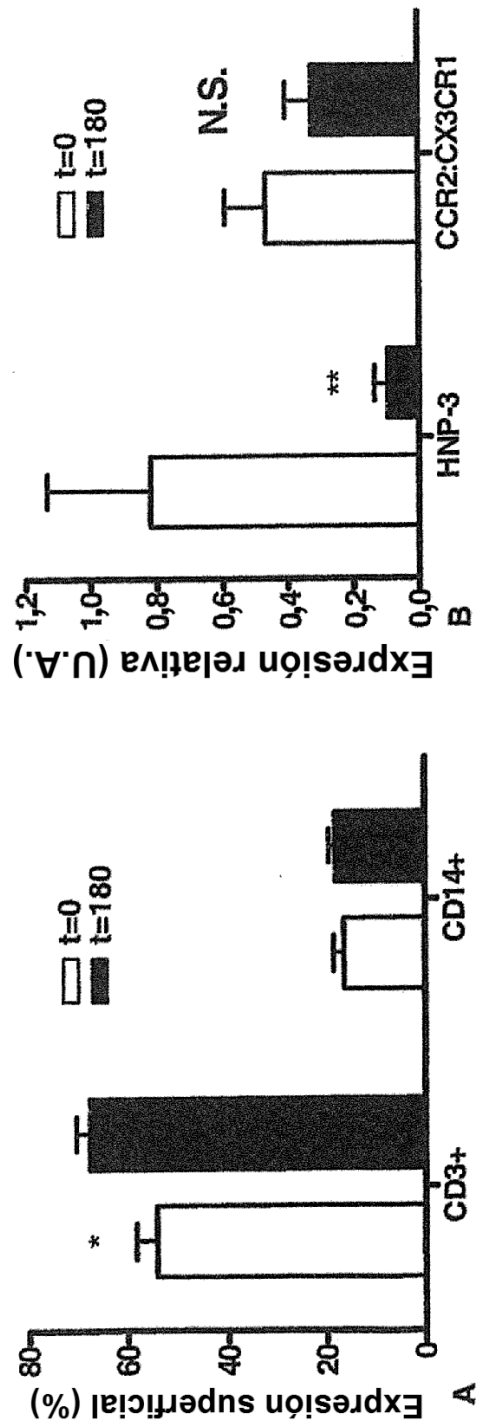


Figura 8

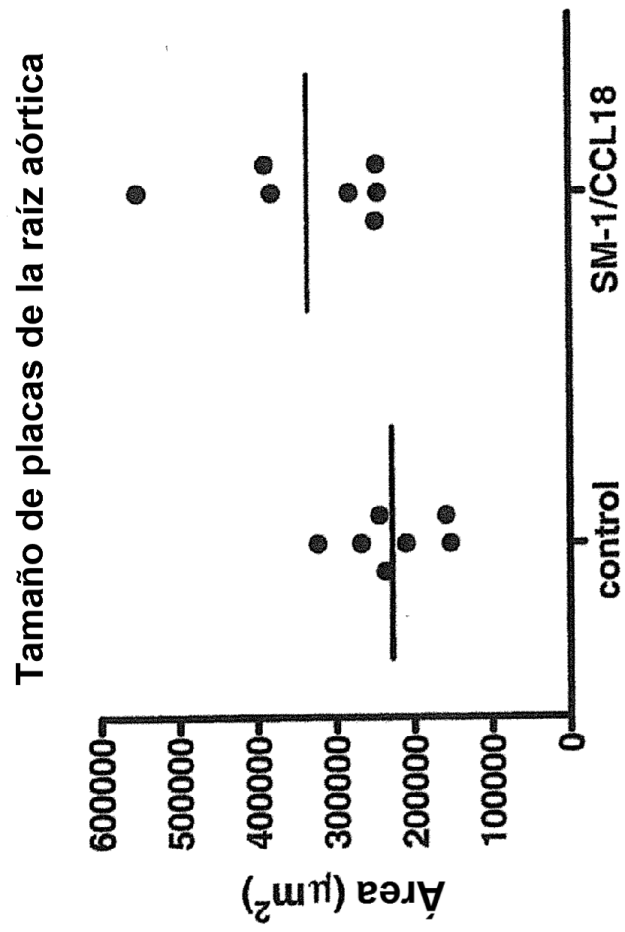


Figura 9

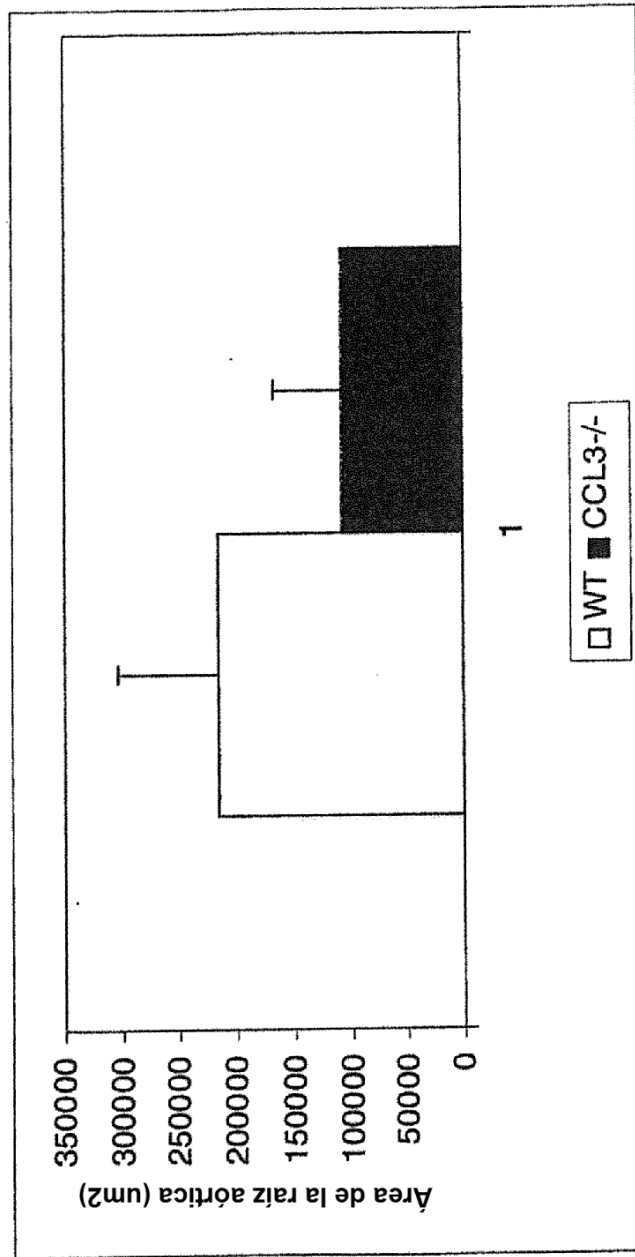


Figura 10

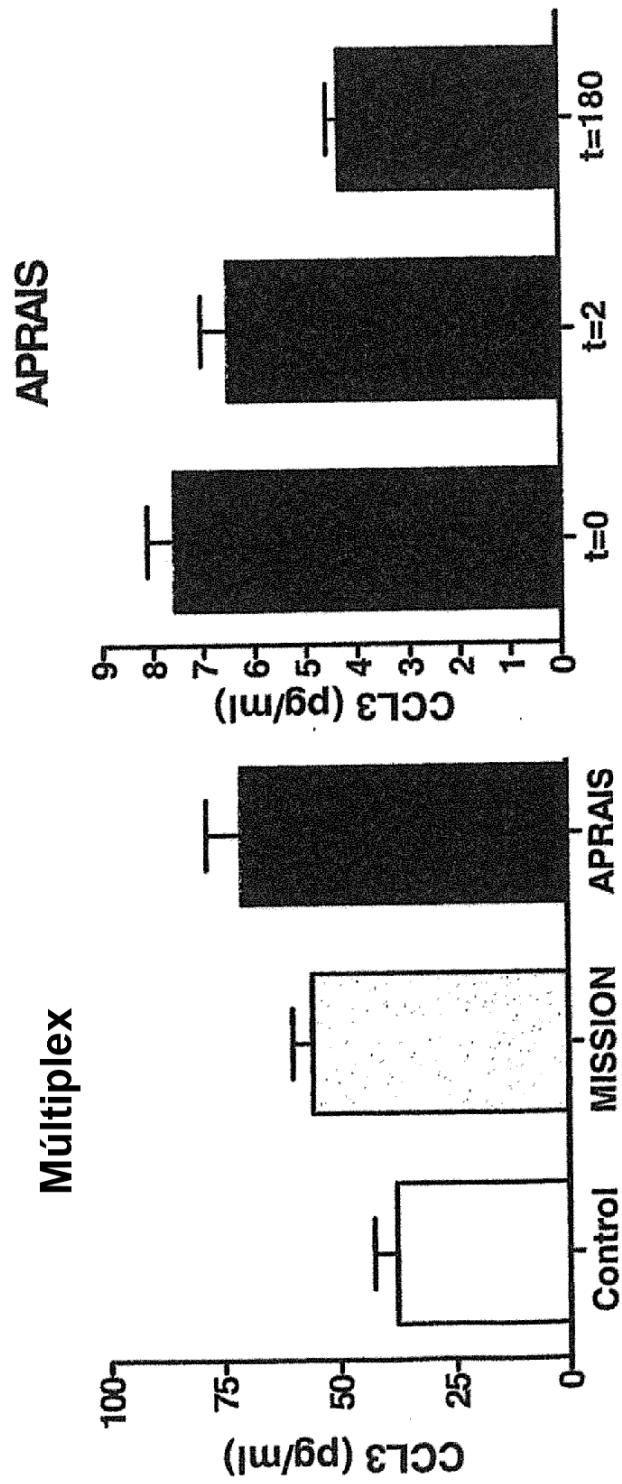


Figura 11

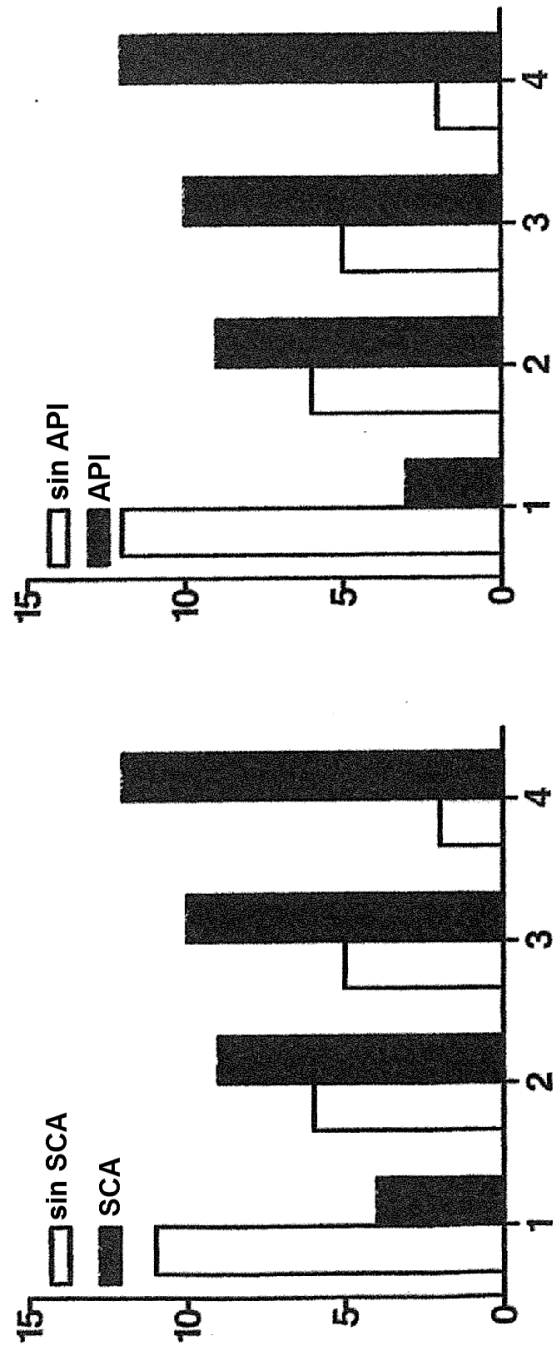


Figura 12

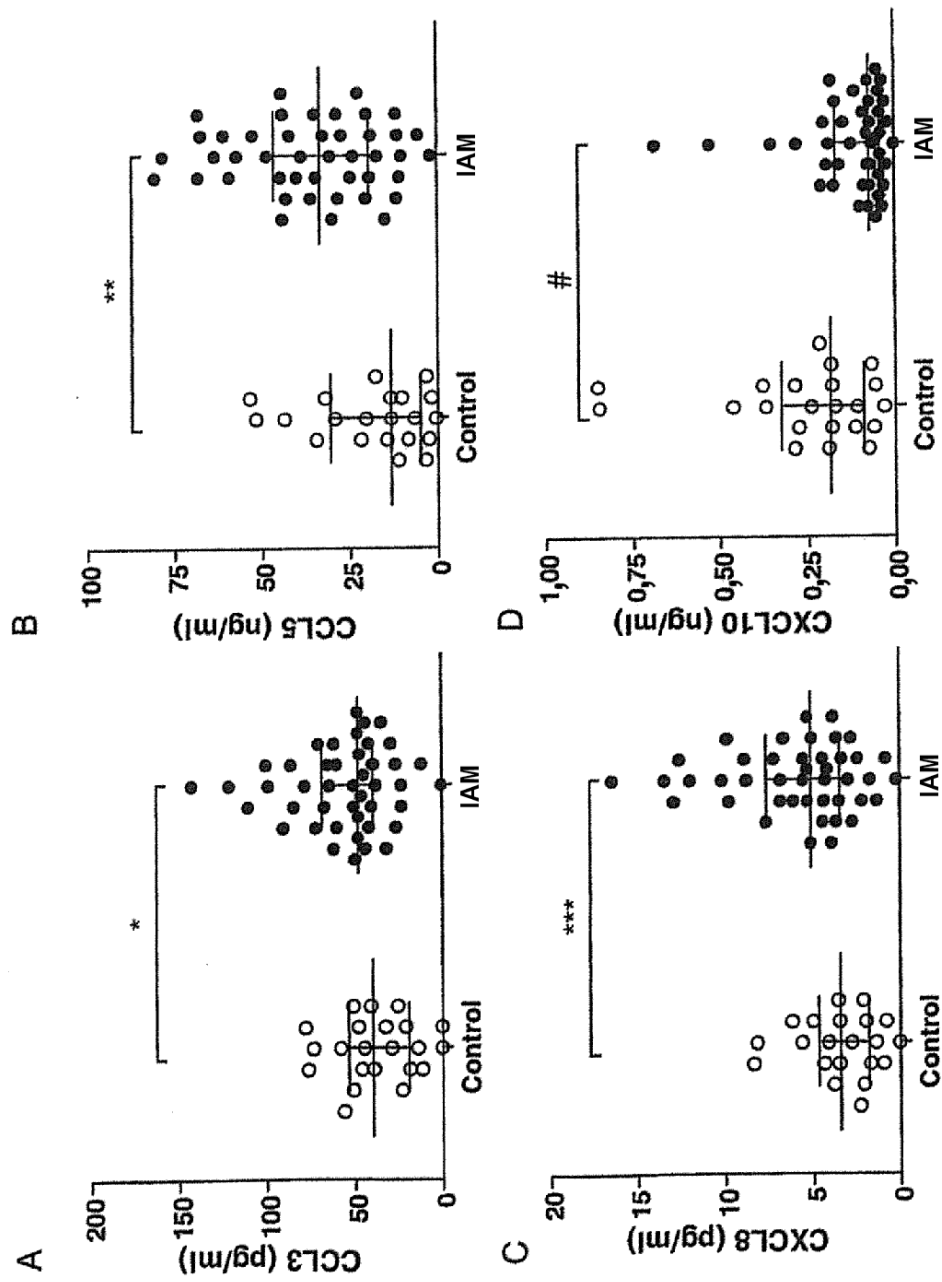


Figura 13

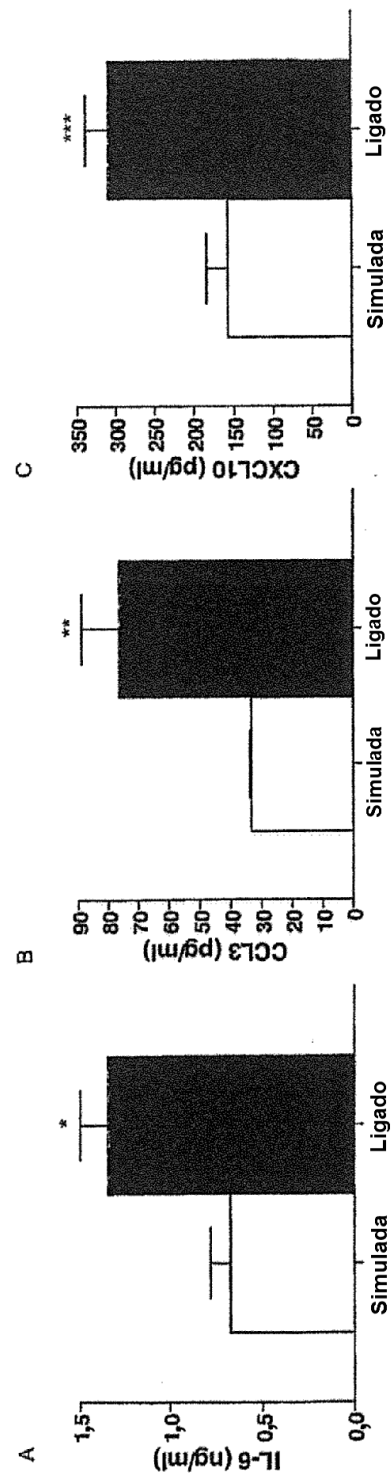


Figura 14

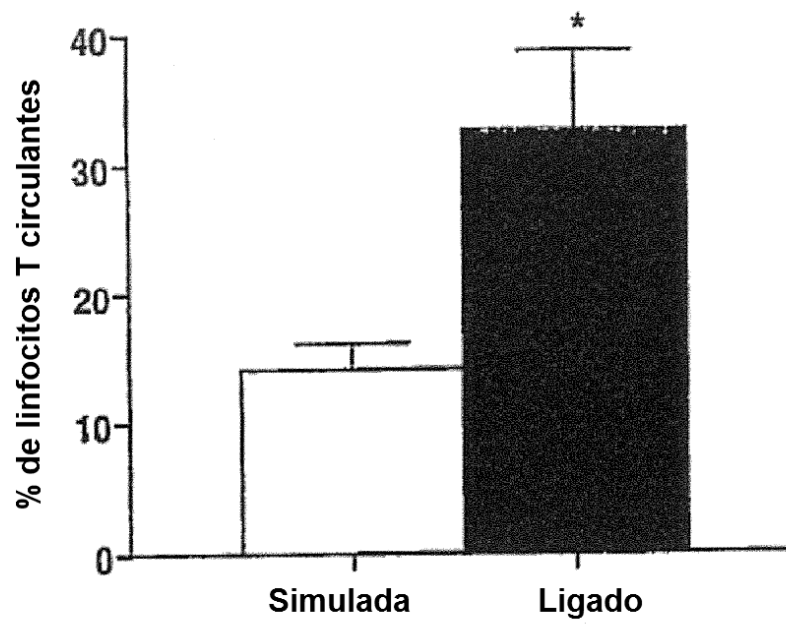


FIG. 15A

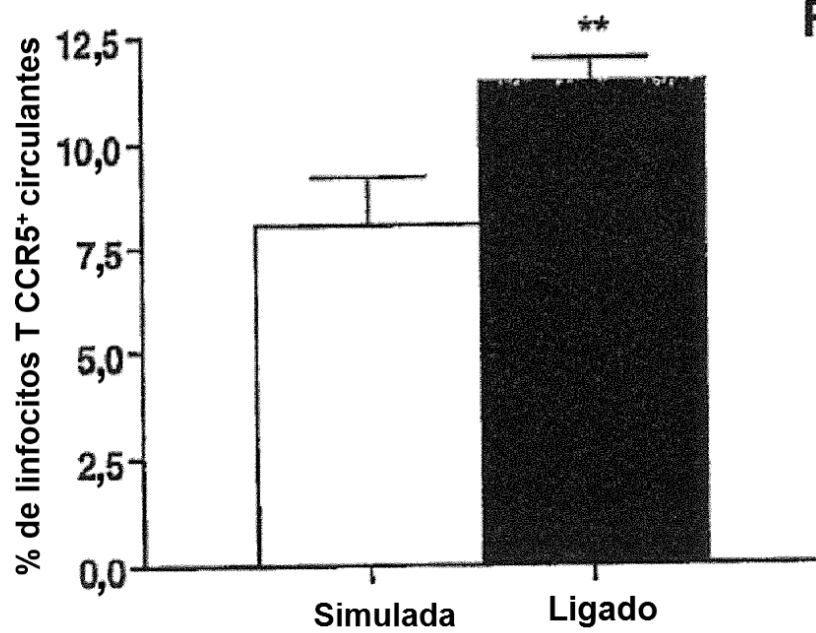


FIG. 15B

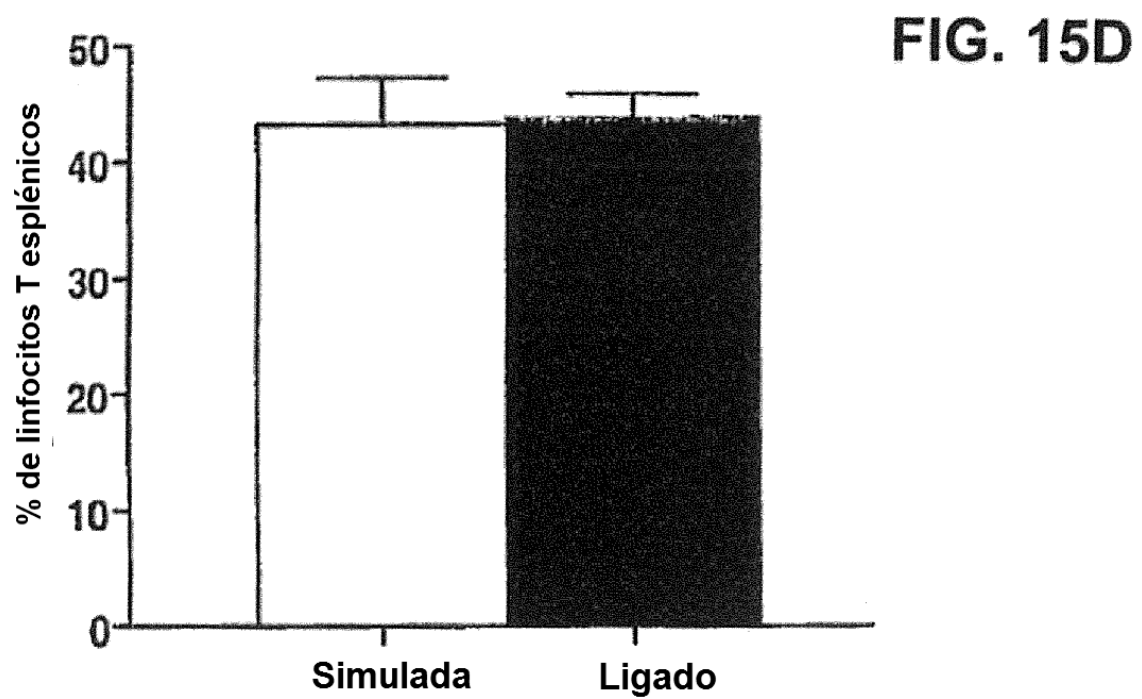
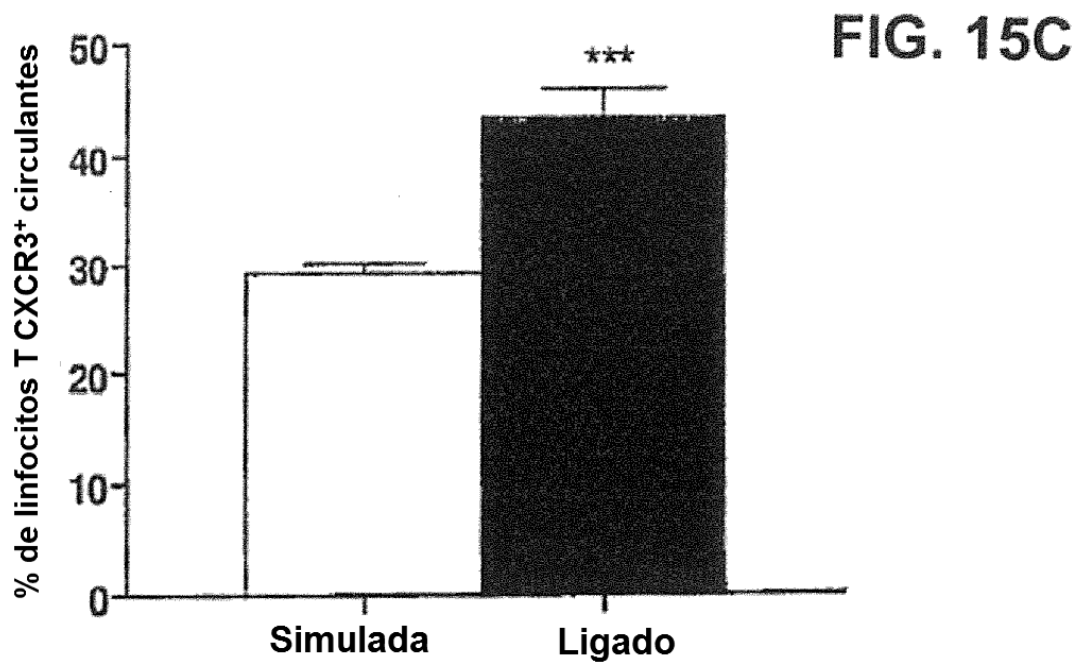


FIG. 15E

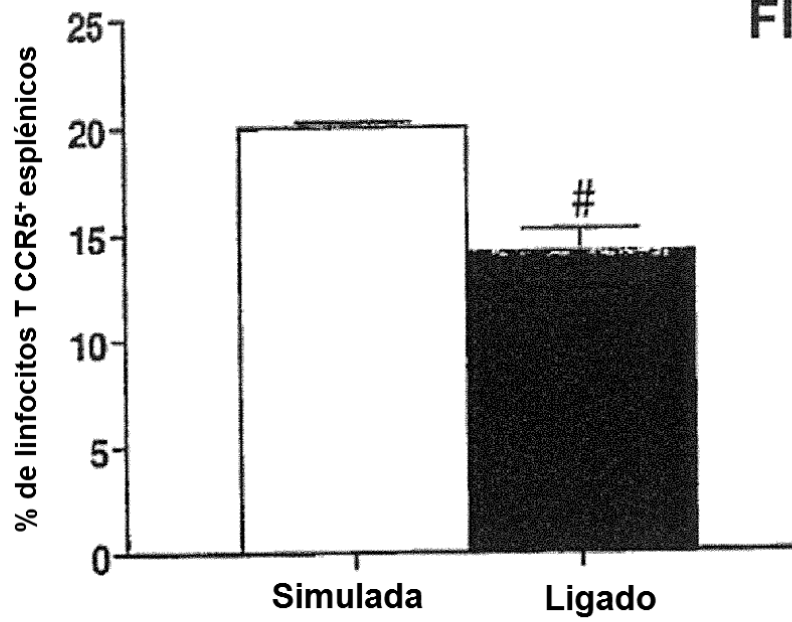
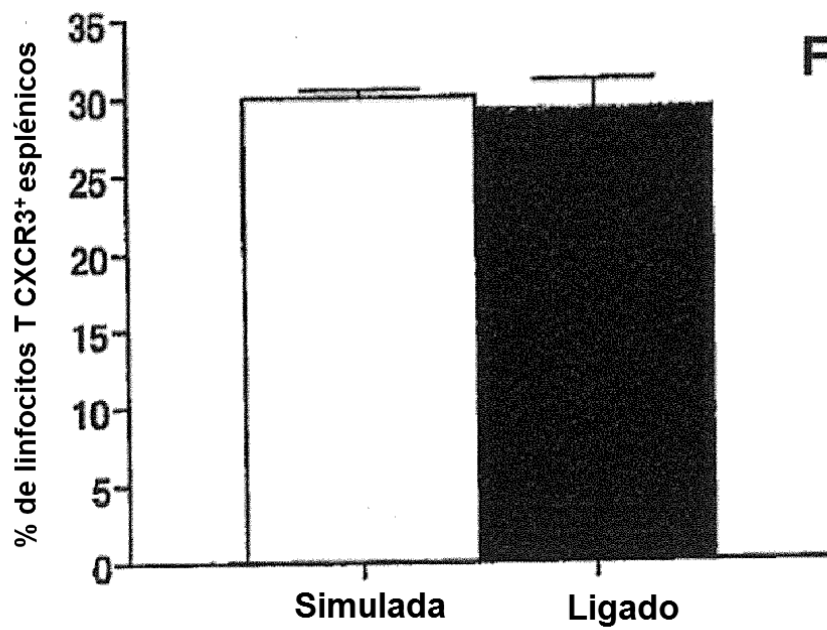
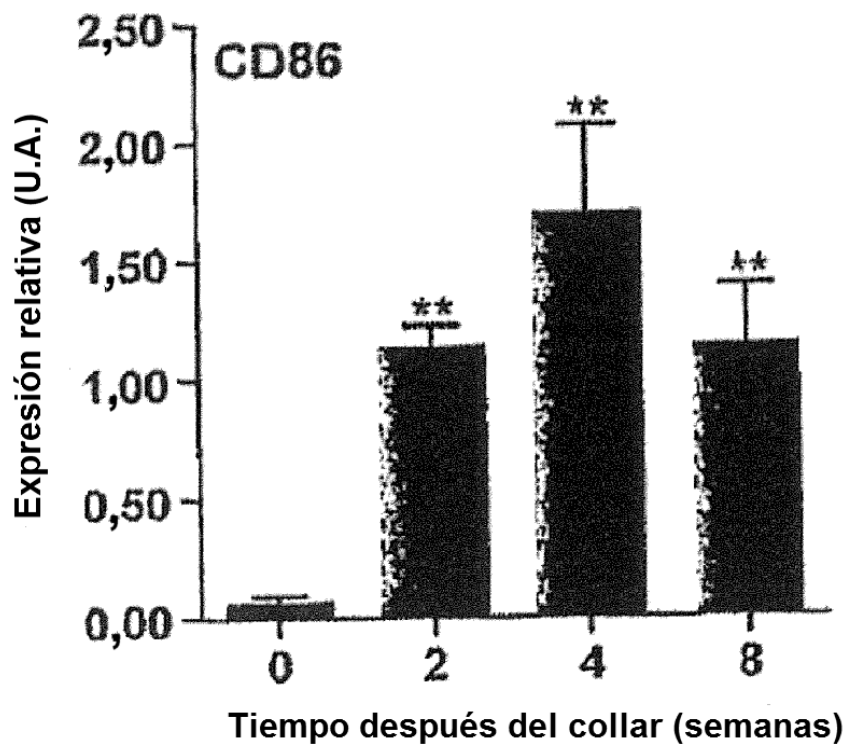
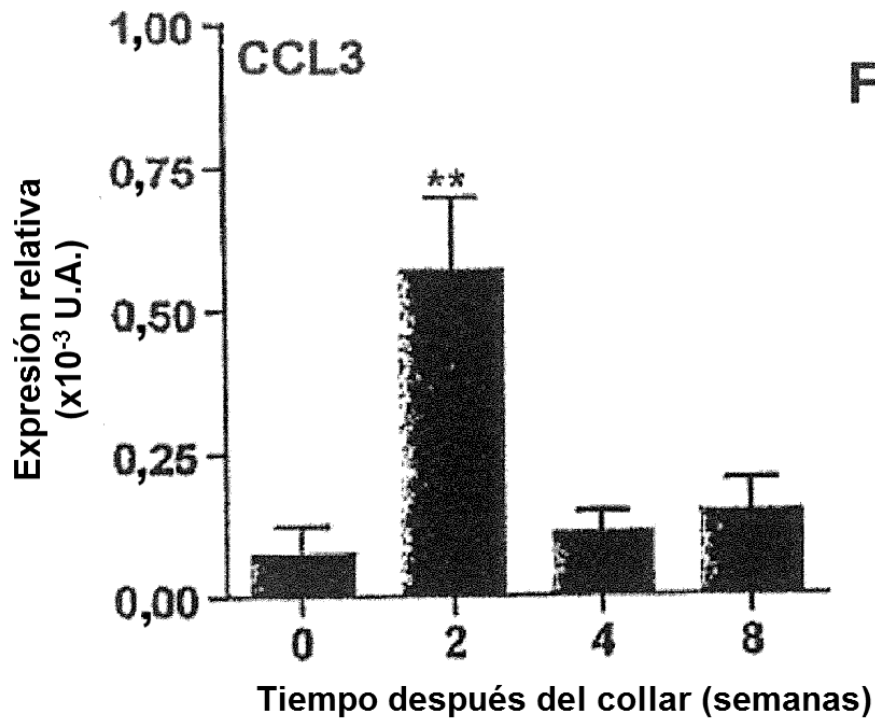


FIG. 15F





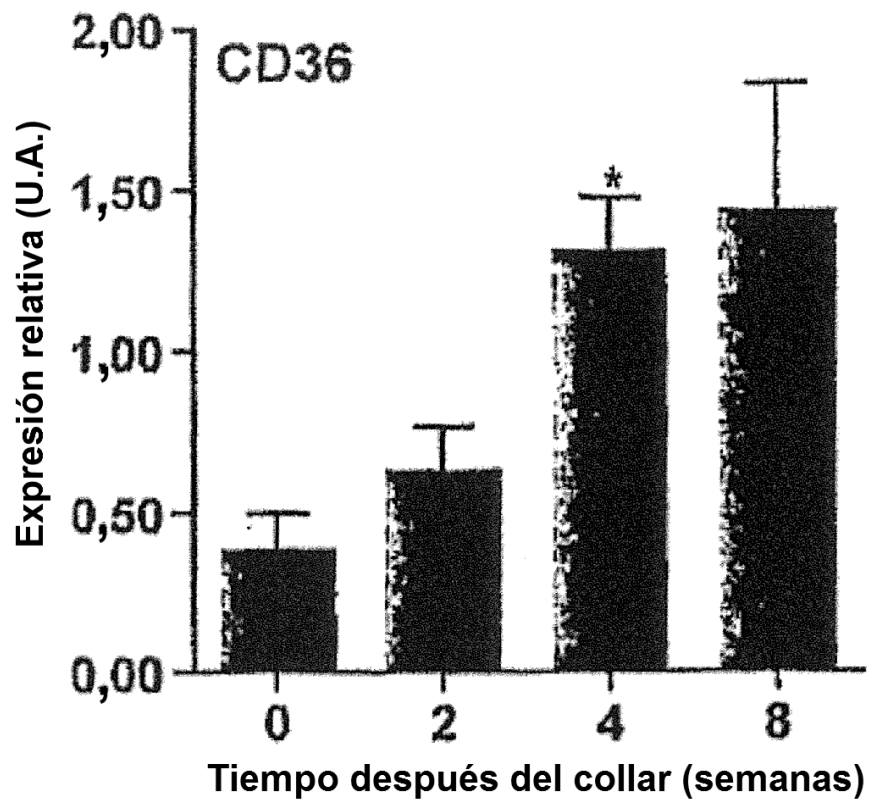


FIG. 16C

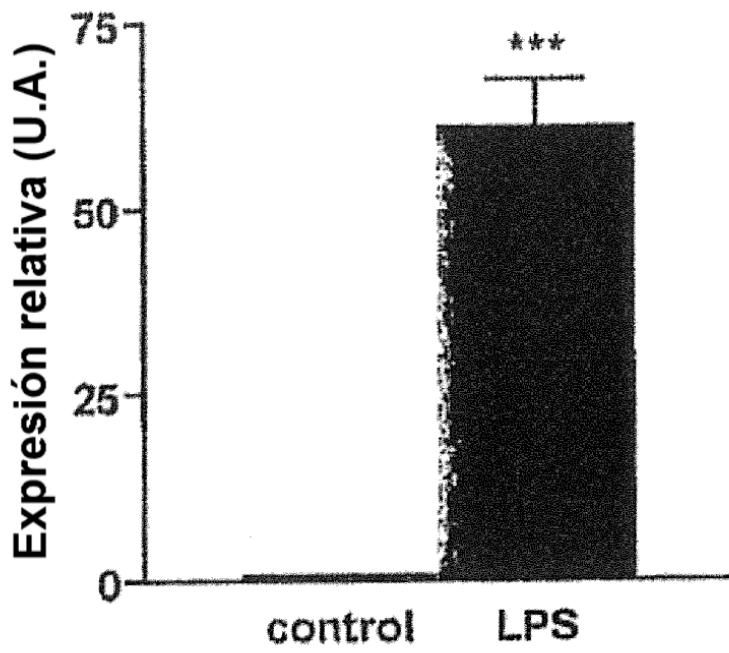


FIG. 17A

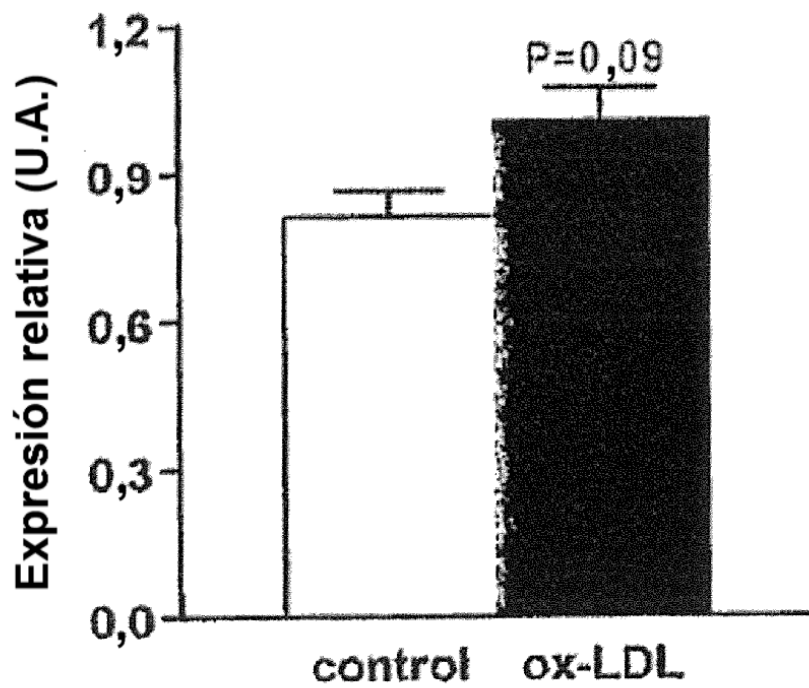


FIG. 17B

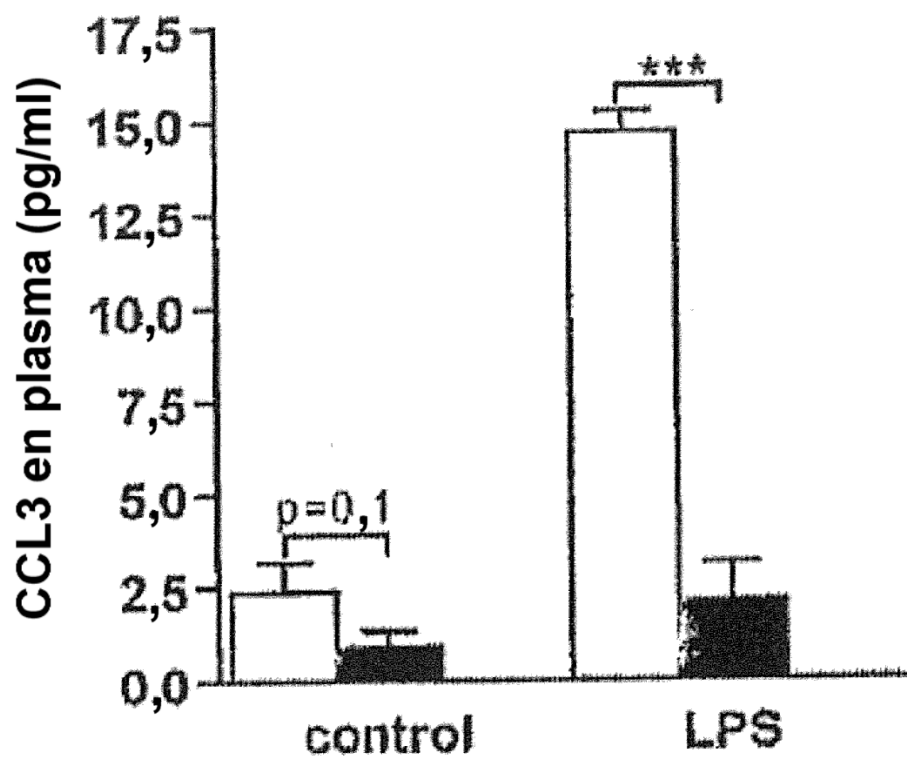


FIG. 17C

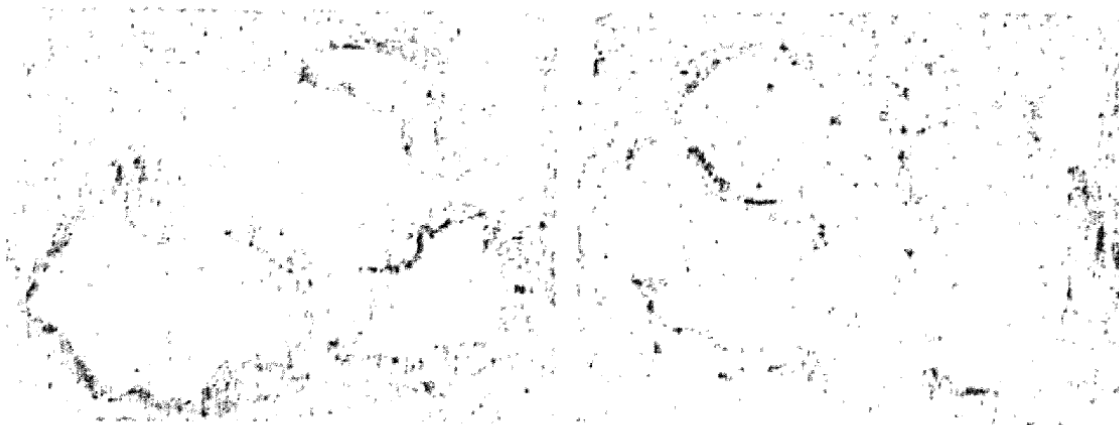
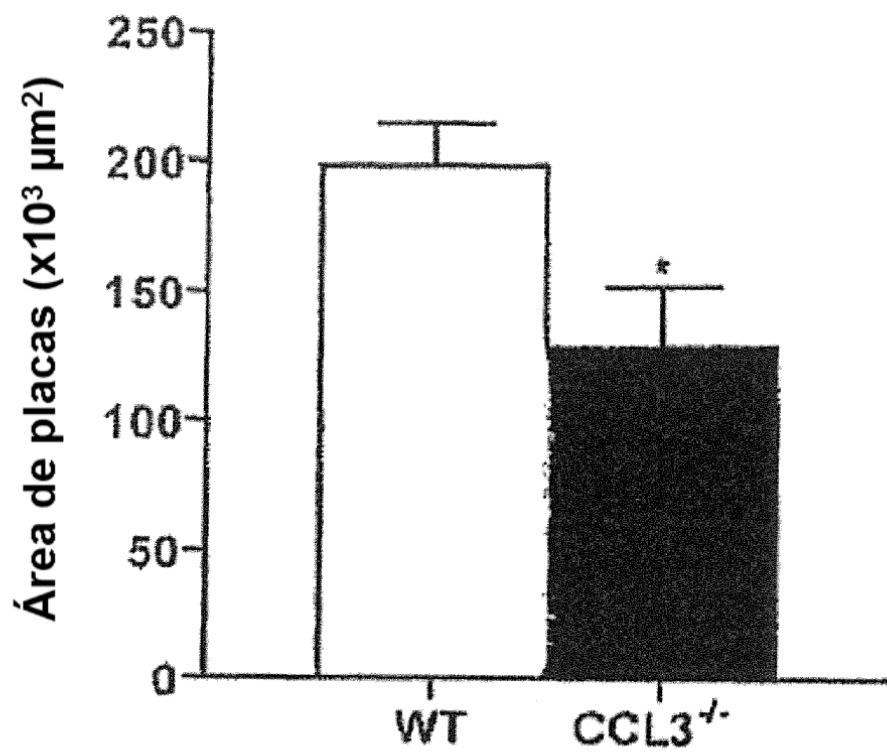
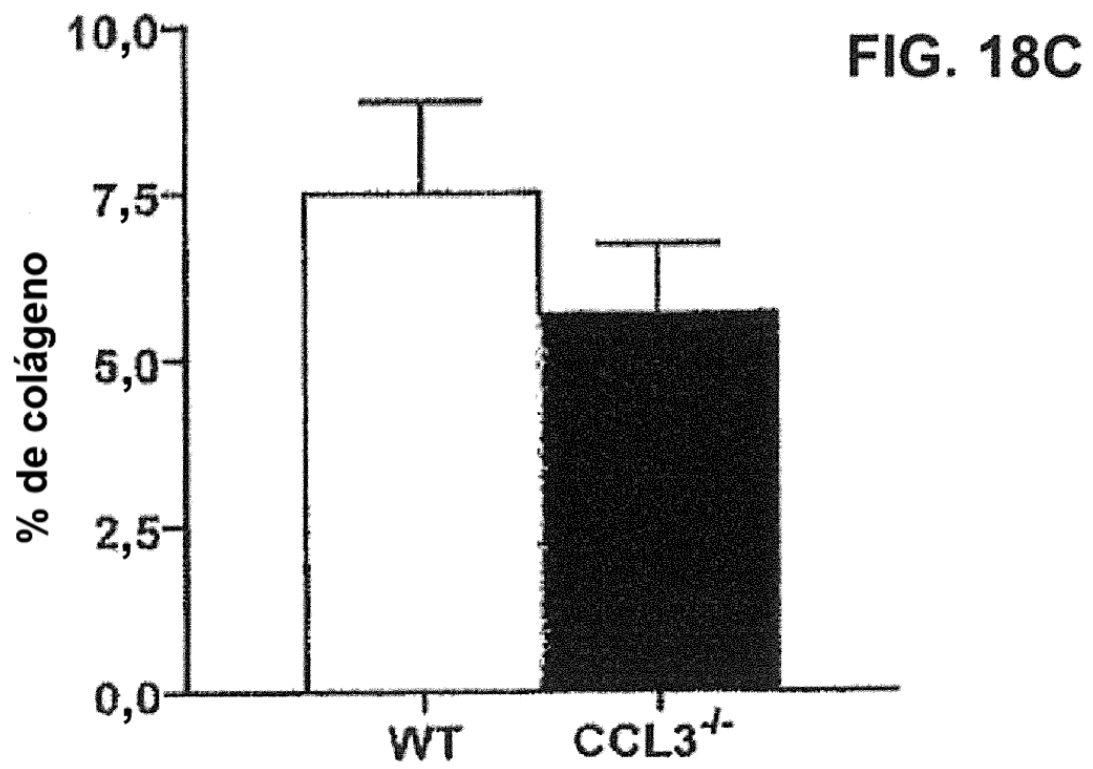
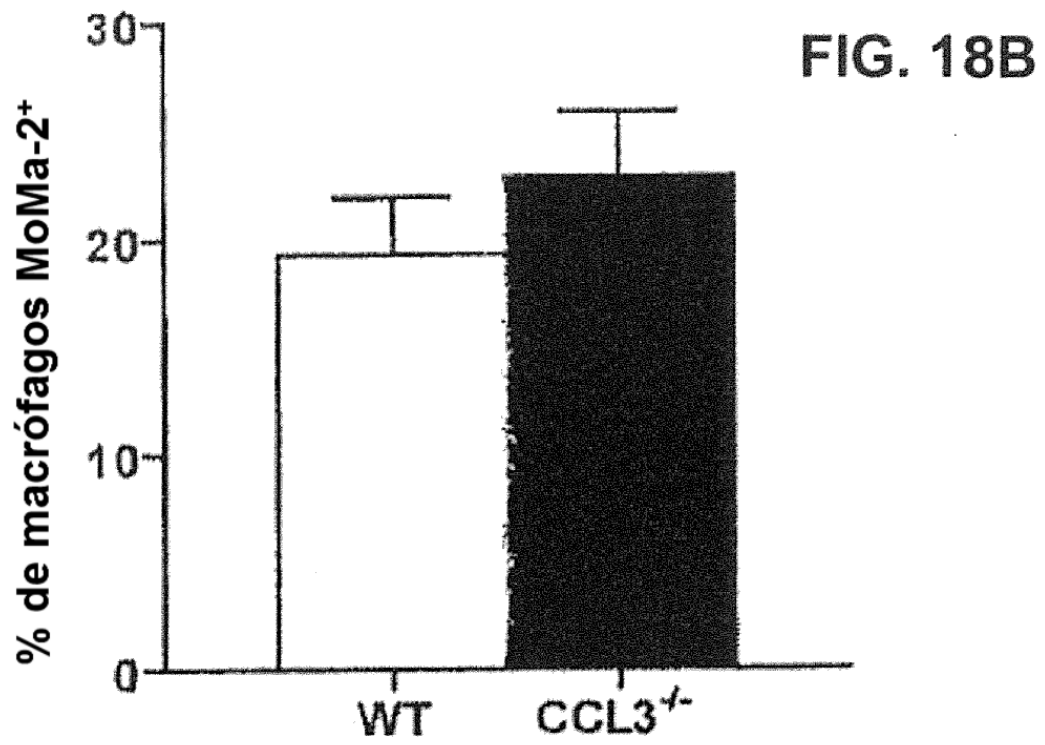
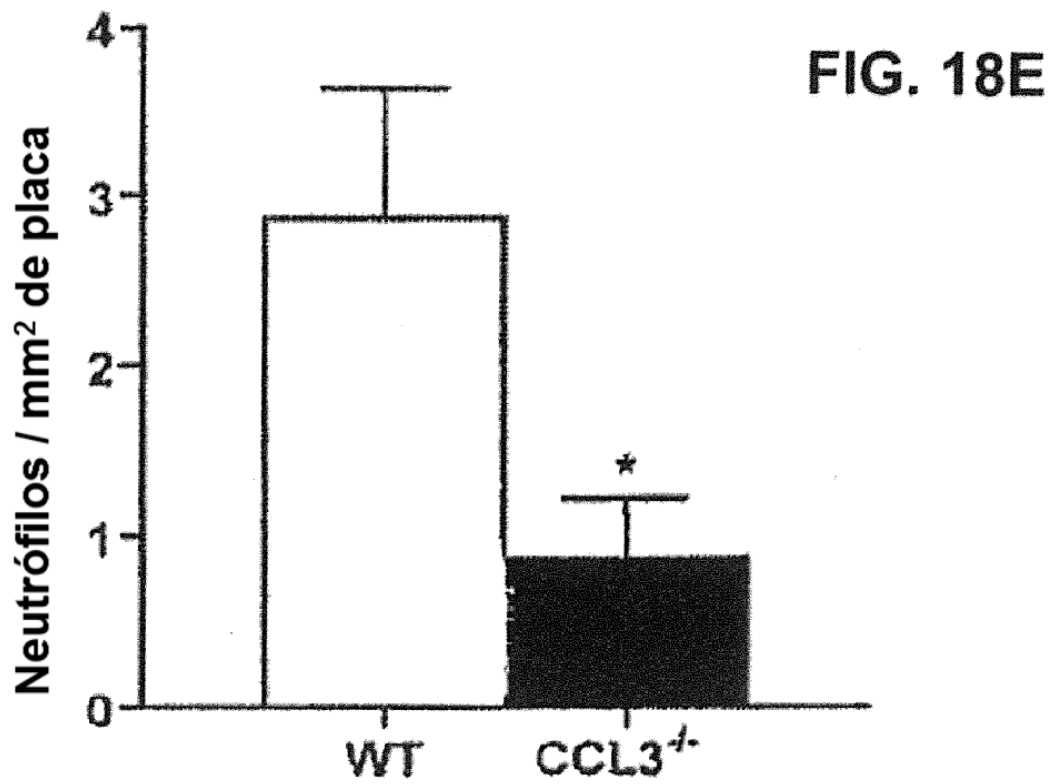
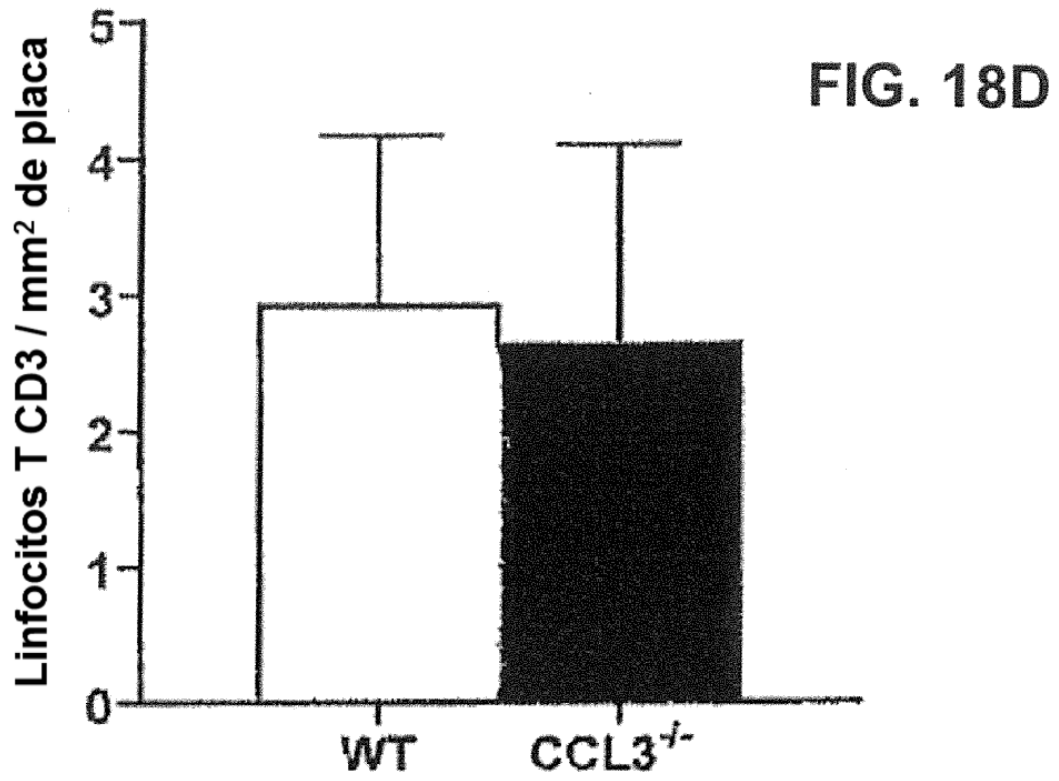


FIG. 18A





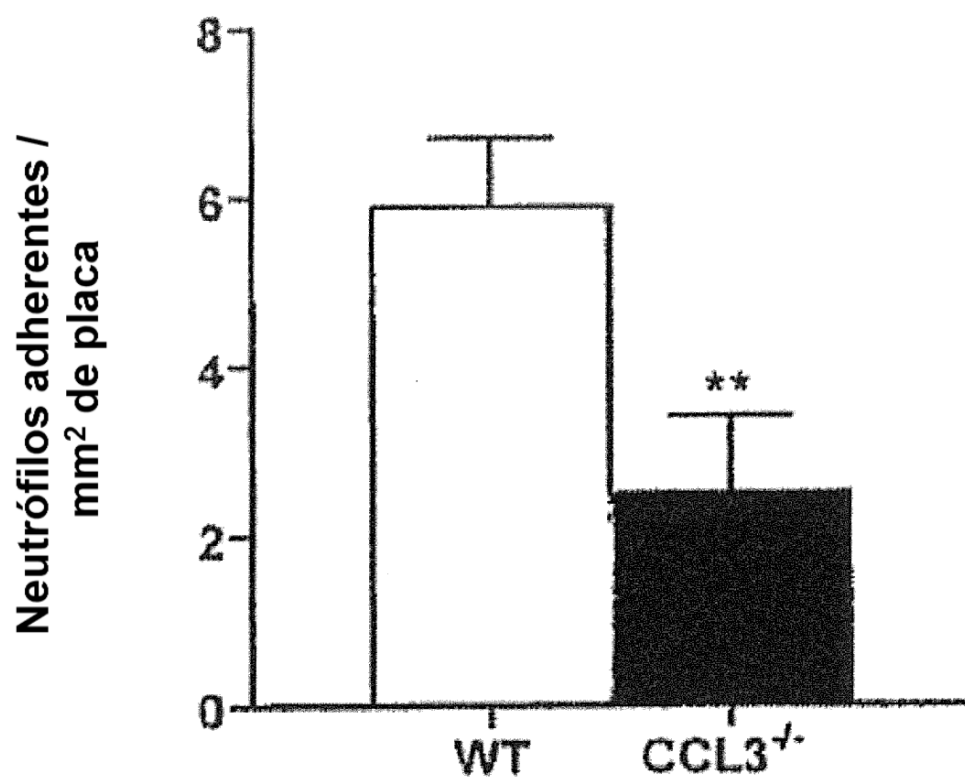
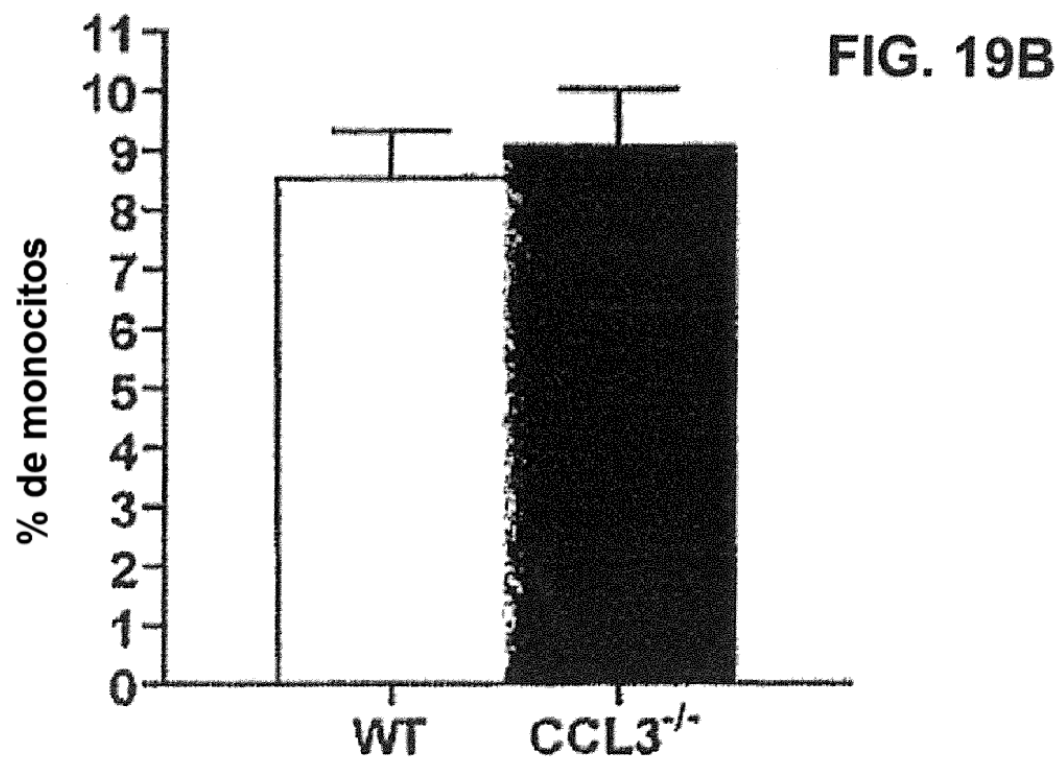
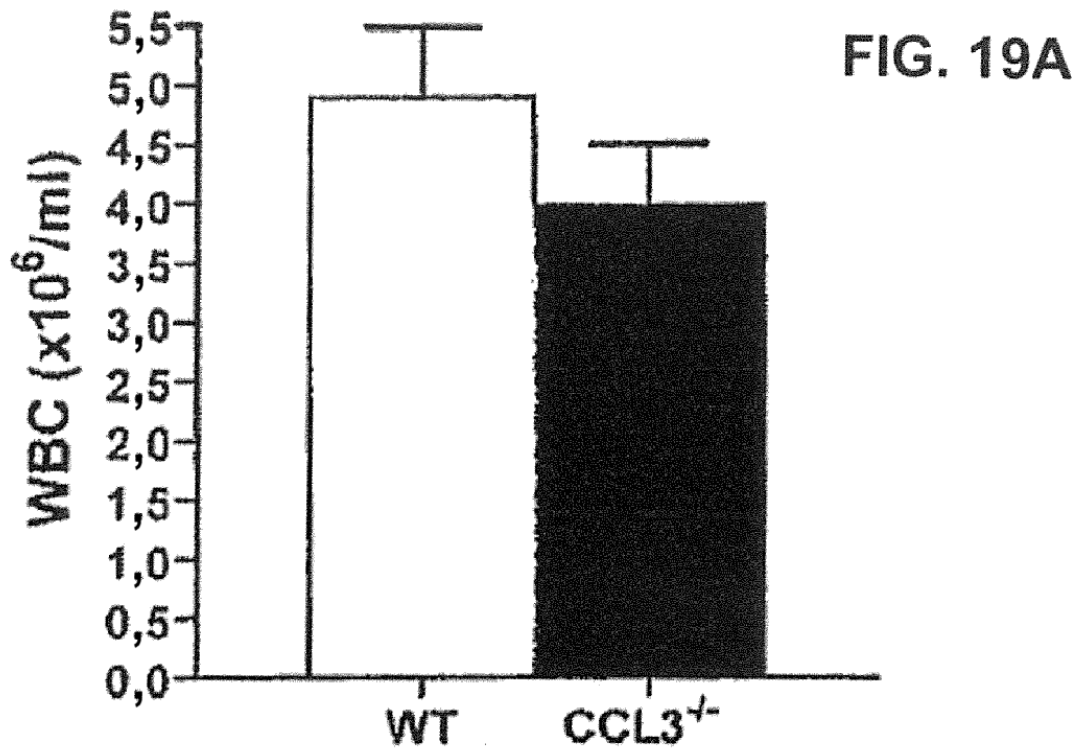


FIG. 18F



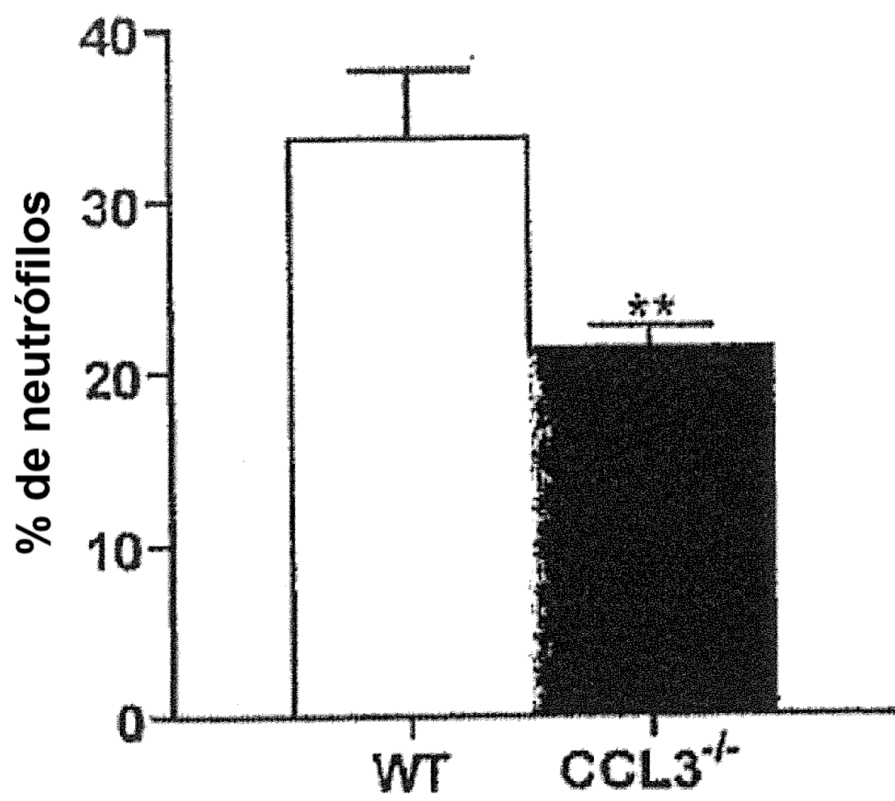


FIG. 19C

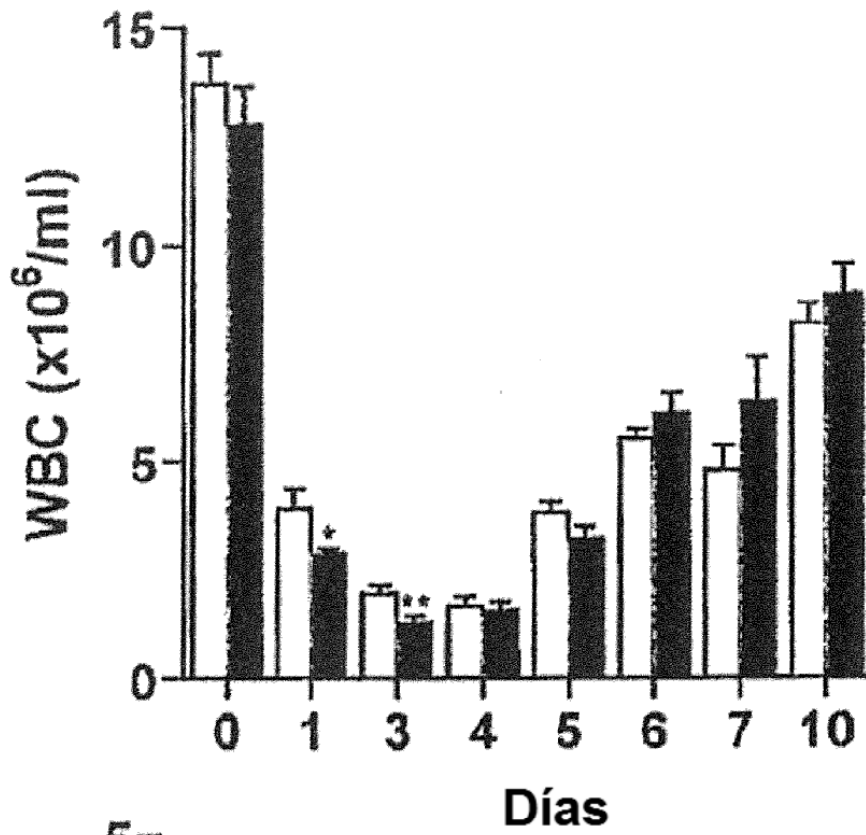


FIG. 20A

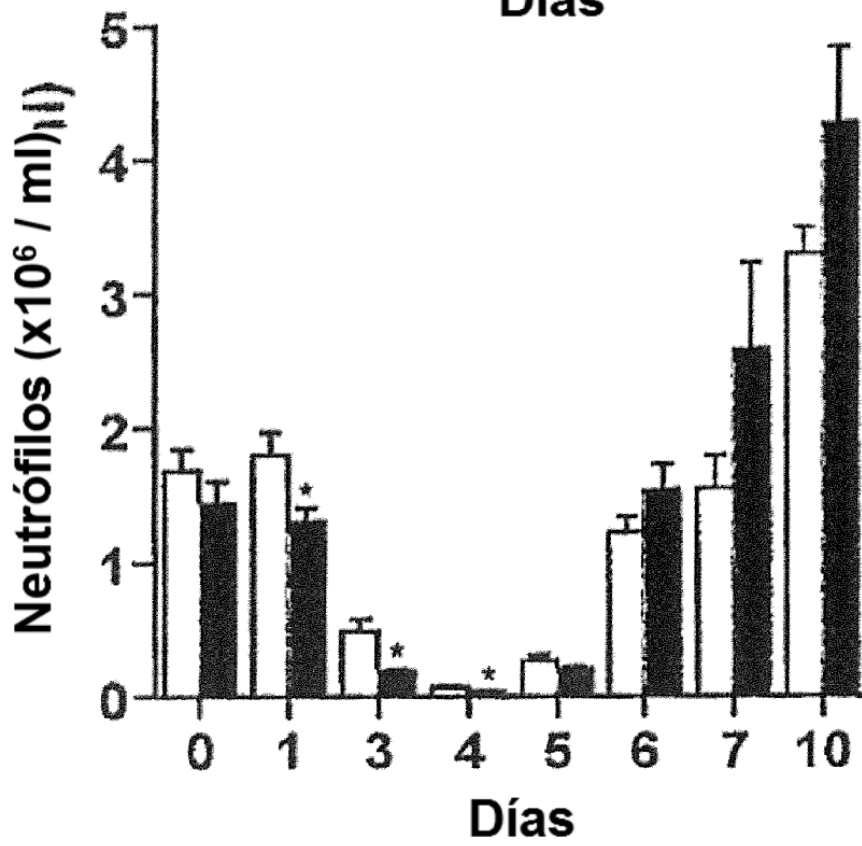


FIG. 20B

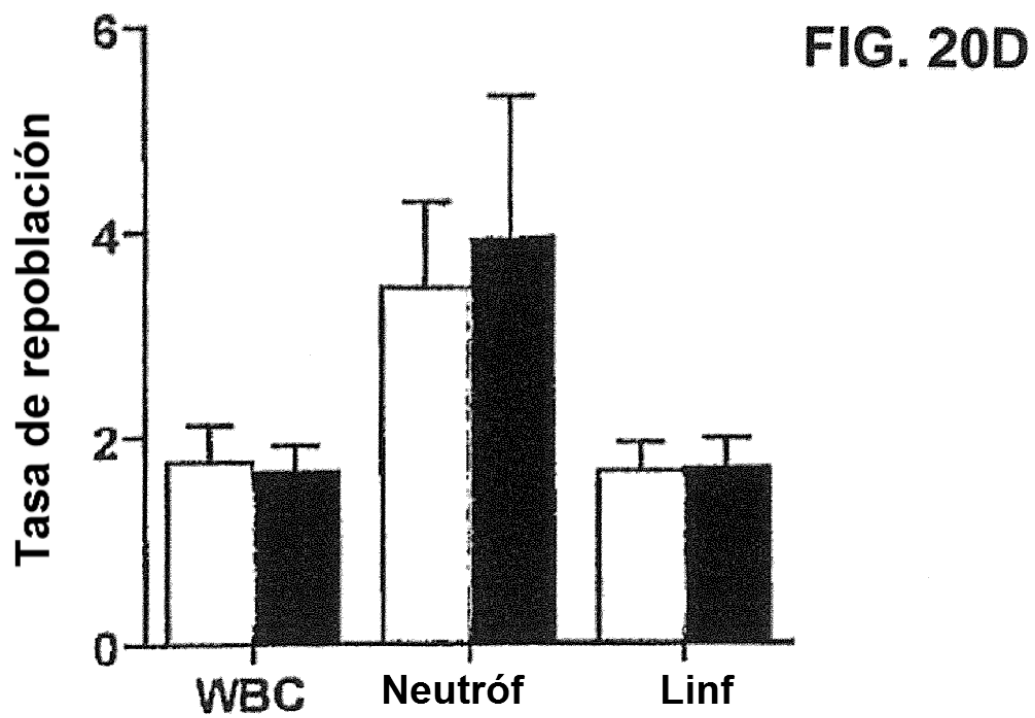
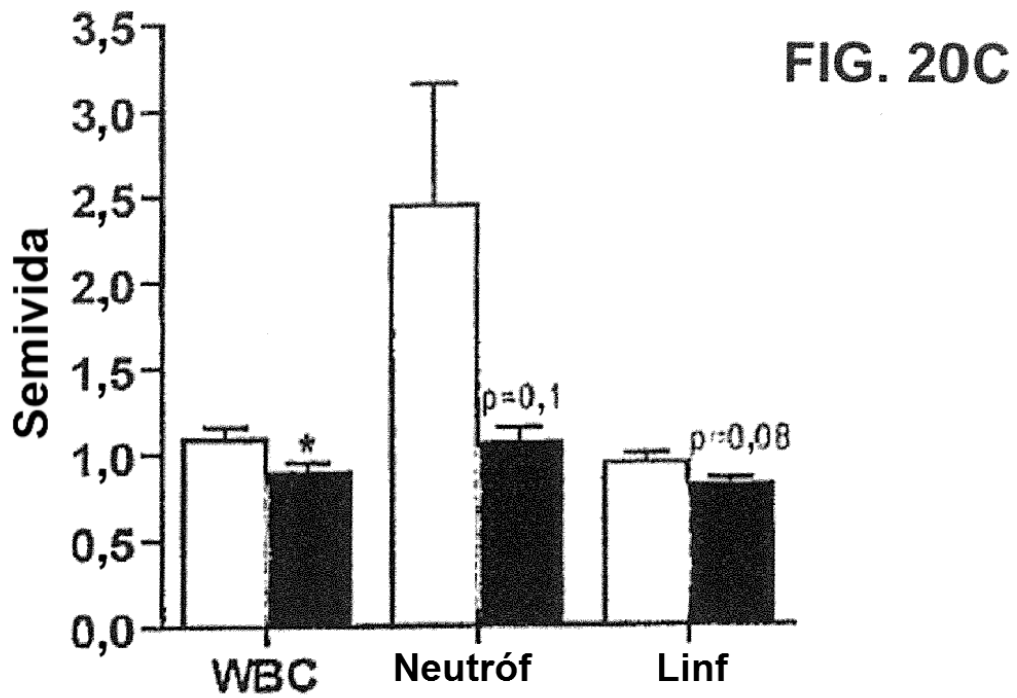


Figura 21

