



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE SISTÉMICA  
ASOCIADA A PLACAS ESTABLES E INESTABLES DE LA ENFERMEDAD  
CORONARIA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**MARIA RASHIDI SPRINGALL DEL VILLAR**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RAFAEL BOJALIL PARRA  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ.  
COMITÉ TUTOR: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
DR. RAFAEL SAAVEDRA DURÁN  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

MEXICO, D.F., SEPTIEMBRE 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE SISTÉMICA  
ASOCIADA A PLACAS ESTABLES E INESTABLES DE LA ENFERMEDAD  
CORONARIA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**MARIA RASHIDI SPRINGALL DEL VILLAR**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RAFAEL BOJALIL PARRA**  
**INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ.**  
**COMITÉ TUTOR: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**  
**DR. RAFAEL SAAVEDRA DURÁN**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.**

MEXICO, D.F., SEPTIEMBRE 2013

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 20 de mayo de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **SPRINGALL DEL VILLAR MARÍA RASHIDI** con número de cuenta **93548940** con la tesis titulada "**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE SISTEMICA ASOCIADA A PLACAS ESTABLES E INESTABLES EN LA ENFERMEDAD CORONARIA**", realizada bajo la dirección del **DR. RAFAEL BOJALIL PARRA**:

Presidente: DR. RAFAEL SIMITRIO SAAVEDRA DURÁN  
Vocal: DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO  
Secretario: DR. FRANCISCO BLANCO FAVELA  
Suplente: DR. VÍCTOR MANUEL BAUTISTA DE LUCIO  
Suplente: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDES

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizara a solicitud de la alumna, **con cinco sinodales**, con base en lo establecido en el Artículo 31 y acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, del Reglamento General de Estudios de Posgrado vigente.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de agosto de 2013



**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por su aceptación al programa de excelencia y por su apoyo durante mi formación doctoral.

A los apoyos recibidos por el CONACyT con el No. de proyecto 176982 durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A mi tutor Dr. Rafael Bojalil Parra por su apoyo durante mis estudios de doctorado, así como su confianza y valiosa amistad de muchos años.

A mi comité tutor, Dr. Rafael Saavedra Durán y al Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés por su asesoría, solidaridad y valiosas aportaciones al presente estudio.

## **AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL**

A los miembros del jurado por su tiempo, disposición y dedicación en la revisión de esta tesis y por sus apreciadas opiniones.

A mis padres por su siempre generosa solidaridad, respaldo y amor que me han dado durante todas las etapas de mi vida.

A mi familia por su presencia y apoyo durante los eventos más importantes y trascendentes de mi existencia.

A José por su hermosa compañía y comprensión brindada durante muchos años.

A todos mis amigos por su maravillosa amistad y complicidad incondicional.

# **DEDICATORIA**

**Dedico esta tesis a lo más hermoso y valioso de mi vida, a mis hijos Joch y Marifer, quienes han sido siempre mi principal motivación. A cada uno agradezco la enorme comprensión en todo momento e incondicional apoyo que siempre me han manifestado. Agradecida estoy con la vida por permitirme caminar y vivir feliz y orgullosa con dos personas tan maravillosas. Los amo y amaré para siempre.**

**Gracias hijos.**

# ÍNDICE

**RESUMEN**

**ABSTRACT**

**INTRODUCCIÓN**

<b>1.</b>		
	<b>ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA (CAD)</b> .....	1
	1.1 Síndromes Isquémicos Coronarios Agudos (SICA) .....	2
<b>2.</b>	<b>FISIOPATOLOGÍA DE LOS SICA:</b>	
	Mecanismos Inmuno-inflamatorios .....	3
<b>3.</b>	<b>MECANISMOS DESESTABILIZADORES DE LA PLACA</b>	
	<b>ATEROSCLERÓTICA</b> .....	5
	3.1 Metaloproteasas e Inhibidores .....	6
	3.2 Citocinas Inflamatorias .....	6



<b>4. MONOCITOS Y MACRÓFAGOS EN LOS SICA .....</b>	<b>8</b>
<b>5. BIOMARCADORES DE LA ATEROSCLEROSIS .....</b>	<b>10</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>12</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>20</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>21</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>22</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>23</b>
<b>MATERIAL Y METODOLOGÍA .....</b>	<b>25</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>51</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>63</b>

<b>IMPLICACIÓN CLÍNICA</b> .....	65
----------------------------------	----

<b>APENDICE 1</b> .....	66
-------------------------	----

**Artículo central de la tesis**

**Interferon-gamma increases the ratio of Matrix Metalloproteinase-9/Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in peripheral monocytes from patients with coronary artery disease.** Rashidi Springall, Luis M Amezcua-Guerra, Hector Gonzalez-Pacheco, Janette Furuzawa-Carballed, Lorena Gomez-García, Ricardo Marquez-Velasco, Ana María Mejía-Dominguez, Jorge Cossío-Aranda, Carlos Martínez-Sánchez, Rafael Bojalil. *Plos One*, August 2013;8(8):e72291.

<b>APENDICE 2</b> .....	67
-------------------------	----

**Artículo adicional**

**Proteína C Reactiva: Aspectos cardiovasculares de una proteína de fase aguda.** Luis Manuel Amezcua-Guerra, Rashidi Springall del Villar, Rafael Bojalil Parra. *Arch Card Mex.* 2007;77:58-66.

<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	68
---------------------------	----

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

- **Figura 1. Fisiopatología de los SICA**
- **Figura 2. Monocitos y macrófagos en los SICA**
- **Figura 3. Marcadores locales y sistémicos de la enfermedad aterosclerótica.**
- **Figura 4. Concentraciones séricas de la Proteína C Reactiva en diversos sitios de la circulación central y periférica.**
- **Figura 5. Concentraciones séricas de Proteína C Reactiva.**
- **Figura 6. Concentraicones séricas de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.**
- **Figura 7. Concentraciones séricas de complemento C3 y C4.**
- **Figura 8. Concentraciones de IL-1ra en suero y sobrenadantes de cultivos de monocitos estimulados.**
- **Figura 9. Concentraciones séricas de las quimiocinas IP-10, MIP-1 $\alpha$  e IL-8.**
- **Figura 10. Concentración de MMPs y TIMP-1 en sobrenadantes de cultivos de monocitos estimulados.**
- **Figura 11. Proporción entre las concentraciones de MMPs y TIMP-1 en sobrenadantes de monocitos estimulados.**
- **Tabla 1. Concentraciones séricas y plasmáticas de Proteína C Reactiva y complemento C3 y C4.**
- **Tabla 2. Datos demográficos y clínicos de los grupos de estudio.**
- **Tabla 3. Concentración de MMPs y TIMP-1 en sobrenadantes de cultivos de monocitos estimulados de pacientes con diferentes manifestaciones de CAD y sujetos donadores sanos.**

## ABREVIATURAS

AF	Arteria Femoral
AP	Arteria Pulmonar
C	Control donador sano
CAD	Enfermedad Arterial Coronaria
CCR-2	Receptor de Quimiocina -2
CD	Célula Dendrítica
CE	Célula Endotelial
Célula NK	Célula Asesina Natural
CML	Célula del Músculo Liso
EDTA	Etilendiamin-N,N,N',N' - ácido tetracético
ELISA	Prueba de Inmunoadsorbencia Ligada a Enzimas
EPOC	Enfermedad Pulmonar Oclusiva Crónica
ES	Error estándar
Fc $\gamma$ R	Receptor Fc gamma
FT	Factor Tisular
GM- CSF	Factor Estimulador de Crecimiento de Monocitos y Granulocitos
IAM	Infarto Agudo del Miocardio
ICAM-1	Molécula de Adhesión Intracelular-1
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL	Interleucina
IL-1ra	Antagonista del Receptor de la Interleucina 1
INCICH	Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
iNOS	Oxído Nítrico Sintetasa inducible
IP-10	Proteína 10 inducible por IFN- $\gamma$
LDL	Lipoproteína de Baja Densidad
Linfocito Th	Linfocito T ayudador
LPS	Lipopolisacárido
Macrófago M1	Macrófago clásicamente activado
Macrófago M2	Macrófago alternativamente activado
MCP-1 $\alpha$	Proteína Quimioatrayente de Monocitos-1
MEC	Matriz Extracelular

MMP	Metaloproteasa
mRNA	RNA mensajero
MSI	Muerte Súbita Isquémica
NF- $\kappa$ B	Factor Nuclear $\kappa$ B
NTproBNP	Péptido Natriurético
oxLDL	Lipoproteína de Baja Densidad Oxidada
PAI	Inductor del Activador de Plaquetas
PCR	Proteína C Reactiva
PDGF	Factor de Crecimiento de Plaquetas
PGE2	Prostaglandina 2
SAP	Angina de Pecho Estable
SC	Seno Coronario
SICA	Síndrome Isquémico Coronario Agudo
SR-A	Receptor Scavenger-A
TGF- $\beta$	Factor de Crecimiento Tumoral-beta
TIMP	Inhibidor Tisular de Metaloproteasa
TLR	Receptor Tipo Toll
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral-alfa
UAP	Angina de pecho inestable
UAP/NSTEMI	Angina de Pecho Inestable/Infarto del Miocardio sin elevación ST
VCAM-1	Molécula de Adhesión Vascular Celular-1
VCI	Vena Cava Inferior

## RESUMEN

*La enfermedad arterial coronaria (CAD) representa uno de los problemas más importantes de salud a nivel mundial debido a su elevado índice de morbilidad y mortalidad. Los síndromes isquémicos coronarios agudos (SICA) son las complicaciones más temidas de CAD, que frecuentemente se desarrollan como consecuencia de la ruptura de la placa aterosclerótica, debido en gran parte al desequilibrio entre las metaloproteasas (MMPs) y sus inhibidores endógenos (TIMPs) que favorecen la degradación excesiva de la matriz extracelular (MEC). Actualmente se sabe que la activación del sistema inmune está involucrada en los mecanismos que subyacen a la desestabilización del ateroma, donde los monocitos activados son capaces de participar en la vulnerabilidad de la placa a través de su capacidad para sintetizar y secretar MMPs, dependiente en gran medida, de las citocinas que estén presentes en el medio. A pesar que se han descrito concentraciones elevadas de mediadores inflamatorios en los sueros de pacientes con SICA, poco se conoce si los monocitos pertenecientes de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas de CAD producen distinto perfil de MMPs y TIMPs y si éstos responden diferencialmente a la estimulación con citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. Más aún, también se desconoce si la elevación de citocinas pro-inflamatorias como el IFN- $\gamma$  puede alterar los balances entre dichas proteínas, de manera que pudiera explicarse la asociación entre la infección aguda y el desarrollo de los SICA sugerida recientemente por múltiples investigadores.*

*Con la finalidad de contribuir al entendimiento de los mecanismos sistémicos que participan en la desestabilización de la placa aterosclerótica, el objetivo del presente estudio fue evaluar la producción de MMPs y TIMP-1 por monocitos cultivados de diferentes manifestaciones clínicas de CAD y su respuesta a la estimulación con citocinas pro- y anti-inflamatorias. Las concentraciones de MMP-1, -2, -9 y TIMP-1 se determinaron en los sobrenadantes de los cultivos de monocitos estimulados con IFN- $\gamma$  o IL-4 obtenidos de 30 pacientes con CAD estable (SAP), 30 pacientes con angina inestable e*

*infarto del miocardio sin elevación del segmento ST (UAP/NSTEMI) y de 30 donadores sanos como grupo control (C). Las proporciones MMPs/TIMP-1 también fueron analizadas en todos los grupos. Se encontró que los monocitos de pacientes con UAP/NSTEMI produjeron concentraciones basales más elevadas de MMP-9 que los pacientes con SAP. La estimulación con IFN- $\gamma$  de los monocitos de ambos grupos de pacientes incrementó la síntesis de MMP-9, mientras que abatió la producción de TIMP-1, promoviendo un mayor desbalance de MMP-9/TIMP-1. En contraste, la exposición de los monocitos a la con IL-4 no alteró la producción ni la proporción de estas moléculas. Nuestros datos demuestran que los monocitos obtenidos de pacientes con CAD presentan una mayor respuesta a la estimulación con IFN- $\gamma$  comparada con las células de los sujetos donadores sanos. Los monocitos de pacientes con CAD estable y de los donadores sanos produjeron perfiles similares de MMPs y TIMP-1, pero presentaron una distinta sensibilidad a ambos tipos de estimulación reflejada en las proporciones MMPs/TIMP-1. Los monocitos de pacientes con CAD estable estimulados con IFN- $\gamma$  mostraron un importante desequilibrio en la proporción MMP-9/TIMP-1, tan elevado al encontrado en los pacientes con UAP/NSTEMI. De manera que la proporción MMP-9/TIMP-1 pudiera servir como un biomarcador útil de la vulnerabilidad de la placa. Debido a que la producción de IFN- $\gamma$  es inducida durante la infección, regula la producción de MMPs y TIMPs, e induce un incremento en la razón MMP-9/TIMP-1 en los pacientes con CAD estable, ello puede dar una verosimilitud biológica a la asociación entre las infecciones agudas y el desarrollo de los SICA.*

## **ABSTRACT**

*Coronary artery disease (CAD) represent one of the most important health problems worldwide due to its high morbidity and mortality rate. Acute coronary syndromes (ACS) are the most feared complications of CAD, frequently as consequence of plaque disruption likely due to an imbalance between metalloproteinases (MMPs) and their specific endogenous inhibitors (TIMPs) that favor excessive matrix destruction. Currently, it is known that a systemic immune activation is involved in the mechanisms underlying plaque destabilization. Activated monocytes are capable to participate in plaque vulnerability through their capability to synthesize and secrete MMPs, depending in great part of the cytokines present in the milieu. Higher concentrations of inflammatory mediators have been described in ACS. However, few is known if activated monocytes isolated from patients with different clinical manifestations of coronary artery disease (CAD) produce a distinct profile of MMPs and TIMPs and if they respond distinctly to the stimulation with pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. More important, it is also unknown if elevations of pro-inflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$  can alter the MMPs and TIMPs balances since a role of acute infection has been suggested in triggering ACS. In an attempt to contribute to the understanding of the systemic mechanisms underlying plaque vulnerability, the aim of this study was to evaluate the secretion of MMP-1, -2, and -9 and TIMP-1 by cultured monocytes from different clinical manifestations of CAD patients, when stimulated with IFN- $\gamma$  or IL-4. Supernatants concentrations of MMP-1, -9, and TIMP-1 were measured in stimulated monocytes with IFN- $\gamma$  or IL-4 from 30 patients with stable CAD, 30 with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction (UAP/NSTEMI) and 30 healthy controls. MMPs/TIMP-1 ratios were also performed. Monocytes from UAP/NSTEMI patients produced higher MMP-9 basal concentrations than SAP patients. Under IFN- $\gamma$  stimulation, both patients' monocytes increased MMP-9 synthesis while decreased TIMP-1, promoting higher MMP-9/TIMP-1 imbalance. IL-4 exposure did not alter their production or ratio. Our data demonstrate that monocytes isolated from CAD patients show an altered responsiveness to IFN- $\gamma$  compared to cells from*



healthy subjects. Monocytes from stable CAD and control subjects produced similar MMPs and TIMP-1 profiles, but present a differential responsiveness to IFN- $\gamma$  or IL-4 stimulation that were reflected in their imbalance of MMP-9/TIMP-1. When stimulated with IFN- $\gamma$ , monocytes of stable CAD patients shown a great imbalance on their MMP-9/TIMP-1 production, as high as that found in UAP/NSTEMI patients. Therefore, the MMP-9/TIMP-1 ratio could be a useful biomarker for plaque vulnerability. Since systemic production of IFN- $\gamma$  is induced during infection, regulates the production of MMPs and TIMPs, and induces an increase on the MMP-9/TIMP-1 ratio in patients with stable CAD, this may bring biological plausibility to the association between acute infections and the development of ACS.

# INTRODUCCION

## I. ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA (CAD)

Estudios epidemiológicos realizados durante los últimos años continúan reportando a las enfermedades cardiovasculares como las principales responsables de la mitad de la morbilidad y mortalidad mundial <sup>(Raposeiras-Roubín S, 2012)</sup> y a la aterosclerosis como la principal causa de muerte en los países industrializados <sup>(Phipps, 2000; Faxon et al, 2004; Turakhia, 2007)</sup>. La aterosclerosis coronaria es la causa más frecuente de la enfermedad cardíaca isquémica, cuya complicación conlleva al desarrollo de los síndromes isquémicos coronarios agudos (SICA) <sup>(Boyle, 2005)</sup>.

La aterosclerosis es una patología multifactorial altamente compleja que involucra diversos procesos inter-relacionados como el metabolismo de lípidos, disfunción endotelial, inflamación, estrés oxidativo, alteración en el metabolismo de matriz extracelular (MEC), activación plaquetaria y trombosis <sup>(Faxon et al, 2004)</sup>, en la cual se establece una amplia red de interacciones entre las diferentes poblaciones celulares que conforman la placa aterosclerótica, así como de sus moléculas de expresión y secreción <sup>(Ross, 1999; Libby, 2000; Hansson, 2001)</sup>, que definen cada una de las respuestas inmuno-inflamatorias que se establecen en las distintas etapas de la aterogénesis, desde la formación de la lesión aterosclerótica hasta la erosión superficial o ruptura de la placa ateromatosa <sup>(Mahmoudi et al, 2007)</sup>.

La aterosclerosis coronaria no es simplemente una consecuencia degenerativa inevitable de la edad con la acumulación de lípidos en la pared vascular, sino que representa una serie de respuestas celulares y moleculares altamente específicas en la que el sistema inmune y la inflamación son elementos esenciales para su iniciación, progresión y complicaciones <sup>(Hansson, 2001)</sup>. Se trata de una respuesta inflamatoria crónica que puede complicarse y convertirse en un evento clínico agudo que amenaza la vida del paciente tras la desestabilización de la placa aterosclerótica <sup>(Boyle, 2005)</sup>.

## 1.1 Síndrome Isquémico Coronario Agudo (SICA).

Por muchos años prevaleció la idea que los SICA resultaban de una estenosis obstructiva de las arterias coronarias. Actualmente se sabe que la ruptura o erosión de una placa aterosclerótica coronaria es el mecanismo más frecuente por el que la aterosclerosis da lugar a los eventos coronarios agudos, incluyendo a la angina de pecho inestable (UAP), infarto agudo del miocardio (IAM) y muerte súbita isquémica (MSI) (Rodríguez et al, 2007; Noguchi et al, 2013).

La aterosclerosis coronaria crónica estable frecuentemente se complica por la conversión hacia un estado inflamatorio agudo que provoca la ruptura de la capa fibrosa. Tras dicha ruptura, el material componente de la placa entra en contacto con la sangre y favorece la formación de trombos que causan posteriormente la obstrucción del flujo coronario (Schroeder y Falk., 1995; Sakakura et al, 2013). En algunas placas, la progresión es lenta y probablemente una continuación de procesos biológicos complejos iniciados por un daño endotelial crónico. Sin embargo, en muchas de las lesiones crecientes, la progresión es rápida y seguida de fisuras recurrentes menores, con la formación subsecuente de trombos murales y una organización fibrótica, causando la estenosis coronaria. Si dicha estenosis es significativa, se desarrollará angina de pecho estable o una isquemia silenciosa como resultado de un incremento en la demanda de oxígeno por el miocardio. En contraste, la angina inestable, infarto del miocardio con y sin onda Q, representan un continuo de los procesos aterogénicos, y son usualmente caracterizados por una reducción abrupta del flujo coronario. La presencia de factores de riesgo trombogénicos tanto locales como sistémicos al momento de la ruptura de la placa puede modificar la magnitud y duración del trombo e influir en la diversidad de manifestaciones clínicas agudas (Fuster et al, 1996; Theroux and Fuster, 1998).

## 2. FISIOPATOLOGIA DE LOS SICA: Mecanismos Inmuno-inflamatorios

La aterosclerosis comienza con el daño endotelial causado por una gran variedad de estímulos que incrementan la permeabilidad a las lipoproteínas de baja densidad (LDLs) y permite la migración de monocitos y linfocitos hacia la íntima. Dentro de la pared arterial, las LDLs son oxidadas (oxLDL), lo que induce una mayor disfunción endotelial e inflamación en la íntima <sup>(Ross, 1999)</sup>. Los monocitos infiltrantes se diferencian en macrófagos que reconocen e internalizan oxLDLs para tornarse en células espumosas, principal componente celular de los ateromas. Dependiendo de las células presentadoras de antígeno, las células T CD4<sup>+</sup> también infiltrantes responden a las oxLDL y a otros antígenos que promueven su proliferación y la síntesis de citocinas <sup>(Stemme et al, 1995)</sup>. Durante etapas intermedias, la producción de citocinas por los macrófagos y linfocitos T activados estimulan a las células del músculo liso (CMLs) a migrar hacia la íntima y generar colágena y otros componentes que conforman la capa fibrosa que cubre la placa, y a los macrófagos para producir enzimas proteolíticas (i.e. metaloproteasas (MMPs) capaces de degradar a los componentes de la matriz extracelular (MEC) de dicha capa <sup>(Libby, 2002)</sup>. La continua inflamación induce posteriormente la muerte de macrófagos y CMLs, y sus residuos necróticos ayudan a la persistencia del proceso inflamatorio, lo que resulta en la progresión de la placa ateromatosa avanzada hacia lesiones vulnerables candidatas a sufrir erosión o ruptura <sup>(Hansson et al, 2005)</sup>.

La activación inmunológica resulta como respuesta a los diversos componentes inflamatorios que se van generando durante el proceso aterogénico con capacidad de estimularlo o inhibirlo. La inmunidad innata mediante la participación de leucocitos fagocíticos, péptidos vasoactivos, mediadores inflamatorios lipídicos, complemento y citocinas pro-inflamatorias contribuye al inicio de la aterogénesis, mientras que la inmunidad adaptativa desarrollada por los linfocitos T, macrófagos y citocinas inmuno-reguladoras, controlan la actividad y progresión de la enfermedad hasta etapas avanzadas

(Blinder et al, 2002). Mediante la actividad cambiante de una serie de marcadores (moléculas de adhesión, citocinas, quimiocinas, metaloproteasas y especies reactivas del oxígeno) (Galkina y Ley, 2009), las interacciones de las células de la inmunidad innata, adaptativa y

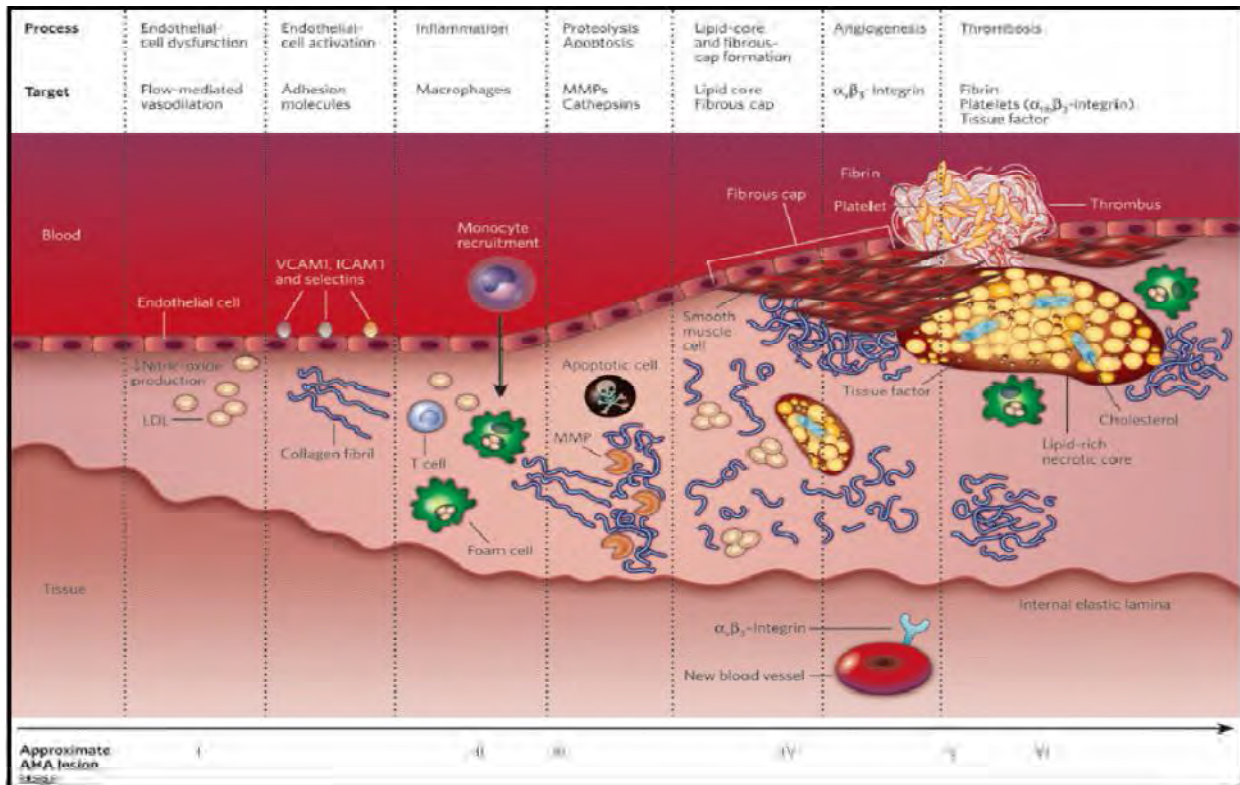


Figura 1. Fisiopatología de los Síndromes Isquémicos Coronarios Agudos (SICA).

mediadores inflamatorios dirigen los aspectos de la inflamación crónica o aguda en el sitio de la lesión (Libby, 2007). De tal suerte, que la inflamación provee una conexión entre muchos factores de riesgo tradicionales y novedosos y una biología arterial alterada, estableciendo el balance existente entre las señales activadoras e inhibitoras, pro- y anti-inflamatorias, procesos sintéticos y degradativos, de vida y muerte celular, así como entre señales pro- y anti-trombóticas que determinan el tiempo de evolución, progresión y desestabilización del ateroma (Hansson et al, 2002; Hansson 2001; Ross, 1999; Ham y Braunwald, 2000; Biasucci et al, 2002).

Debido a que la respuesta inflamatoria que se genera en el sitio de la lesión es capaz de determinar la composición de la placa y por tanto de contribuir significativamente a su condición estable o inestable (Libby, 2006), actualmente el estudio de la inflamación se ha enfocado hacia dos fenómenos muy distintos pero altamente vinculados. En primer lugar, a la formación de la placa de ateroma debido a un proceso inflamatorio crónico y en segundo, a la ruptura de la misma derivado de un proceso inflamatorio agudo (Berliner et al, 1995; Bennett, 2002).

### **3. MECANISMOS DESESTABILIZADORES DE LA PLACA ATEROSCLERÓTICA.**

La vulnerabilidad y la subsecuente ruptura de la capa fibrosa frecuentemente es resultado de dos sucesos importantes. En primer lugar, a la disminución importante en la síntesis de colágena por apoptosis de las células del músculo liso (CMLs) (Geng, 2001) debido a la acción de citocinas pro-inflamatorias como el TNF- $\alpha$  e IL-1, y en particular por el IFN- $\gamma$  sintetizado por linfocitos presentes en el sitio de la lesión (Hansson et al, 1989; Warner et al, 1989; Geng y Libby, 1995), y en segundo lugar, a la degradación de los componentes de la MEC por los macrófagos activados mediante la elevación en la producción de enzimas proteolíticas, particularmente de metaloproteasas (MMPs) (Libby, 2002).

La estabilidad de la placa aterosclerótica depende de la integridad y resistencia de su capa fibrosa. De tal suerte que, cualquier estímulo inflamatorio que promueva el desequilibrio entre la síntesis y degradación de los componentes de la MEC que conforman la capa fibrosa favorece su vulnerabilidad (Lee y Libby, 1997).

### 3.1. Metaloproteasas e Inhibidores

Las MMPs pertenecen a la familia de las endopeptidasas dependientes de zinc con capacidad de degradar todas las proteínas que componen la MEC . Dependiendo de su especificidad, pueden agruparse en colagenasas (MMP-1, -8, -13), gelatinasas (MMP-2, -9), estromielisinas (MMP-3, -10, -11), matrilisinas (MMP-7) y metaloeslastasas (MMP-12) (Galis y Khatri, 2002) . Los macrófagos son la fuente más importante de MMPs en humanos (Dollery y Libby, 2006) cuya síntesis se incrementa cuando son estimulados por mitógenos, productos bacterianos (LPS), citocinas inflamatorias (IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-4 y TNF- $\alpha$ ), factores de crecimiento, oxLDL, especies reactivas del oxígeno (ROS) y por el contacto con los linfocitos T (Louie, 1984; Shappiro et al, 1993; Lacraz et al, 1994; Newby, 2008) .

La actividad proteolítica de las MMPs está finamente regulada por diversos inhibidores endógenos, incluyendo a la familia de las proteínas inhibidoras de metaloproteinasas (TIMPs) que se unen estequiométricamente 1:1 a las MMPs (Brew et al, 2000) . En particular, el TIMP-1, capaz de regular la actividad proteolítica de casi todos los miembros de las MMPs que hasta ahora se conocen (Lacraz et al, 1995) . Por consiguiente, el balance proteolítico depende de la concentración relativa entre ambas moléculas (Paramo et al, 2005; Newby, 2005) .

### 3.2 Citocinas Inflamatorias

Las citocinas pro-inflamatorias producidas por los linfocitos T y macrófagos activados, son consideradas como participantes imprescindibles en la inflamación vascular crónica típica de la aterosclerosis. El IFN- $\gamma$  es pro-inflamatorio y pro-aterogénico que activa fuertemente a los macrófagos, induce la expresión de MMPs (Davies, 1998; Kai et al, 1998) , inhibe la expresión de TIMPs y la proliferación y síntesis de colágena en CMLs, incrementando la degradación de la capa fibrosa (Kim et al, 2001; Mallat et al, 2001; Shan et al, 1998) . Similarmente, induce

el reclutamiento de células inmunes a la lesión <sup>(Buono et al, 2003)</sup>, incrementa la producción de quimiocinas <sup>(Valente et al, 1998)</sup> y la expresión de moléculas de adhesión e integrinas y promueve a las CMLs hacia un fenotipo proliferativo <sup>(Barillari et al, 2001)</sup>, introduce las oxLDLs a los macrófagos <sup>(Li, 2002)</sup>, activa a macrófagos y células T, todos importantes para promover la desestabilización de la placa <sup>(Grupta et al, 1997)</sup>. El TNF- $\alpha$  incrementa la expresión de

moléculas de adhesión en CEs, quimiocinas y receptores “scavenger” en macrófagos <sup>(Tousoulis et al, 2003)</sup> y puede desestabilizar las placas ateroscleróticas induciendo la producción de MMPs <sup>(Kim et al, 2001)</sup>. Junto con la IL-1, el TNF- $\alpha$  promueve la respuesta inflamatoria (IL-6 y PCR) y la inducción de la síntesis de ciertas proteasas como la MMP-9. Debido a que la IL-1 es un potente mediador de la inflamación arterial que produce gran daño a la pared vascular, su inhibición por el IL-1ra reestablece la función endotelial, reduce la respuesta inflamatoria en la vasculatura y reduce el estrés oxidativo vascular <sup>(Crossman et al, 2008)</sup>.

Durante la respuesta inflamatoria también son producidas ciertas citocinas anti-inflamatorias. La IL-4, IL-13, TGF- $\beta$  e IL-10 juegan un papel importante en impedir la progresión y ruptura de la placa así como en los procesos trombóticos, inhibiendo muchas de las propiedades de las poblaciones celulares inflamatorias asociadas al proceso aterogénico <sup>(Tziakas et al, 2003)</sup>. La IL-10 inhibe la adhesión de los monocitos <sup>(Pinderski et al, 1999)</sup> pero induce la síntesis de TIMP-1. La IL-13 e IL-4, suprimen la producción de IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e incrementan la síntesis del antagonista del receptor para la IL-1 (IL-1ra) <sup>(Scotton et al, 2005)</sup>, alteran la oxidación de lípidos por macrófagos <sup>(Cornicelli et al, 2000)</sup>, inducen (IL-4, IL-13) la producción de ciertas MMPs <sup>(Shimizyu et al, 2004)</sup>, mientras que otras (IL-10, TGF- $\beta$ ) las inhiben.

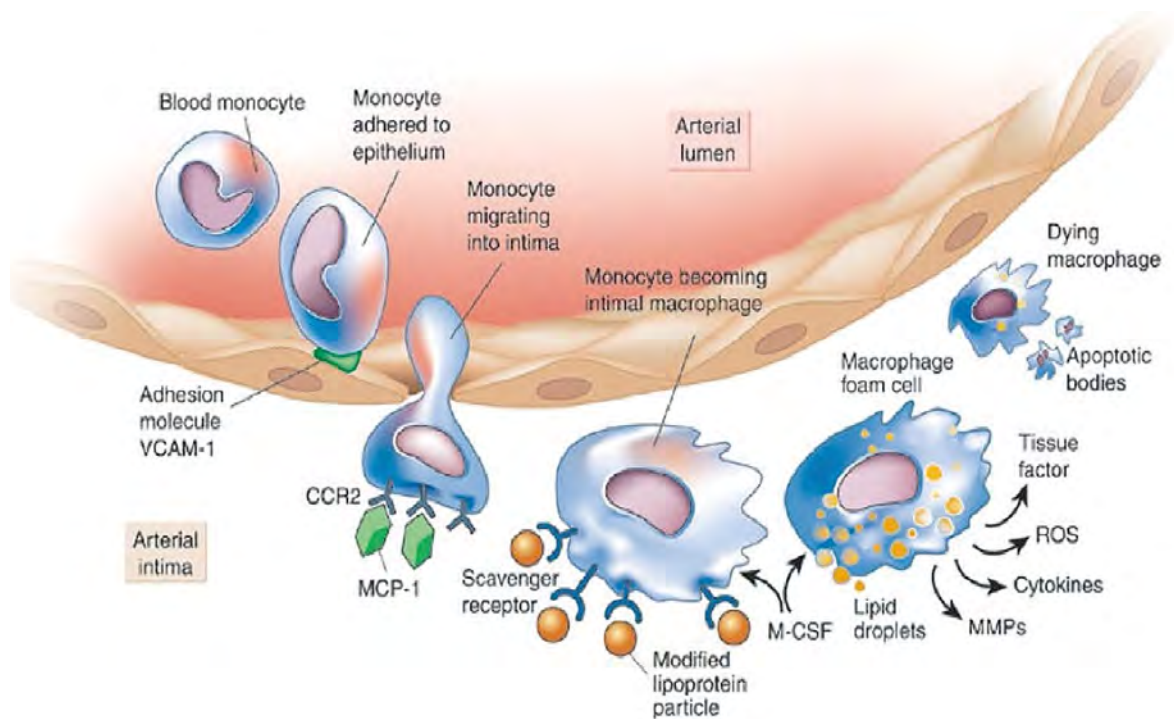


#### 4. MONOCITOS/MACRÓFAGOS EN LOS SICA

Los monocitos son una de las poblaciones celulares principales del sistema inmune que están involucradas en la formación, crecimiento y ruptura de la placa aterosclerótica. Durante la inflamación, los monocitos migran de la circulación a tejidos linfoides y no linfoides en respuesta a señales tisulares causadas por infección o daño tisular <sup>(Geissmann et al, 2008)</sup>, fagocitan moléculas como las oxLDL, producen citocinas inflamatorias y pueden diferenciarse en macrófagos, células dendríticas o células espumosas <sup>(Tacke y Randolph, 2006)</sup>. La migración de los monocitos hacia los tejidos y su diferenciación hacia varios tipos celulares parece estar determinado en parte por el medio inflamatorio, lo que indica la enorme plasticidad de estas células <sup>(Woollard y Geissmann, 2010)</sup>.

Los monocitos humanos muestran una heterogeneidad de tamaño, granularidad, morfología nuclear y fenotipo, similar a la existente en subpoblaciones en ratón <sup>(Gordon, 2005)</sup>. Se han definido dos subpoblaciones de monocitos: CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>lo</sup> que representan el 85-95% de los monocitos en individuos sanos; CD14<sup>lo</sup>CD16<sup>hi</sup> representan el resto <sup>(Passlick et al, 1989)</sup>. Las placas ateroscleróticas parecen atraer predominantemente el fenotipo más inflamatorio <sup>(Libby et al, 2008)</sup> que se caracterizan por un incremento de moléculas de adhesión <sup>(de Servi et al, 1996)</sup>, incremento en la producción de citocinas <sup>(Biasucci et al, 1996)</sup> y sustancias pro-coagulantes <sup>(Manten et al, 1998)</sup>.

Otra variedad de fenotipos de macrófagos también han sido definidos dependiendo del patrón de activación. Los macrófagos clásicamente activados (M1) y los alternativamente activados (M2), ambos fenotipos están presentes en los ateromas <sup>(Bouhlef et al, 2007)</sup> y pueden ser distinguidos por una serie de marcadores expresados en su superficie <sup>(Gordon y Taylor, 2005)</sup>. Tanto el lipopolisacárido (LPS) como citocinas inflamatorias (i.e. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ ) inducen el fenotipo M1. El fenotipo M2 es generado en respuesta a citocinas como la IL-4 o IL-13. El papel de estos distintos fenotipos de macrófagos en la progresión e inestabilidad apenas se está investigando.



**Figura 2. Participación de los fagocitos mononucleares en el proceso aterogénico (Circ J, 2010).**

La activación de los monocitos y de los macrófagos residentes pueden contribuir a la condición vulnerable de las placas avanzadas mediante su capacidad para sintetizar diversas MMPs (i.e. MMP-1, -2, -3 y -9) (Miltenburg et al, 1995; Lacraz et al, 1994; Xie et al, 1998; Zhang and Wahl, 2006; Khan et al, 2004; Webster and Crowe, 2006). Además, en las últimas décadas, diversos hallazgos sugieren una incrementada reactividad de los monocitos a una variedad de estímulos infecciosos y no infecciosos que contribuyen a la inestabilidad de las placas ateromatosas coronarias.

## 5. BIOMARCADORES EN LOS SICA

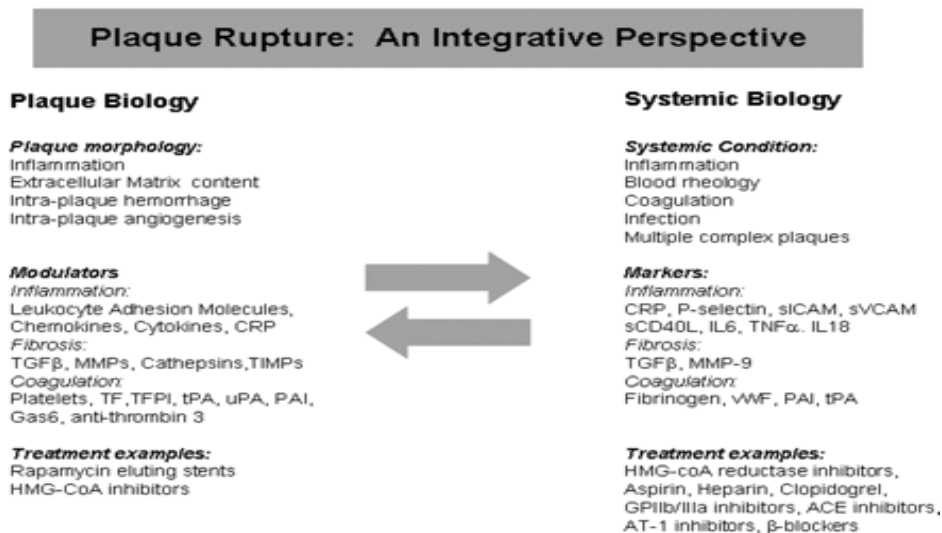
Tanto el papel patogénico de la inflamación local, como de los niveles incrementados de marcadores inflamatorios en suero, han servido para identificar pacientes con un elevado riesgo de desarrollar eventos isquémicos futuros y su influencia en la evolución clínica de los SICA (Mulvihill y Foley, 2002). Actualmente, muchas de las moléculas sintetizadas por poblaciones celulares del sistema inmune pueden ser medidas de manera sistémica como es el caso de las citocinas inflamatorias y factores de crecimiento (GM-CSF, IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ ) y de mediadores inflamatorios como las proteínas de fase aguda (i.e. PCR) (Biasucci et al, 1996; Liuzzo et al, 1994; Haverkate et al, 1997), moléculas de adhesión (P y E selectinas, ICAM-1, VCAM-1), quimiocinas (MCP-1, CCR-2, IL-8), mediadores de la matriz MEC (TGF- $\beta$ , MMPs, TIMPs), mediadores de la coagulación (i.e. factor tisular), entre muchos otros (Albert et al, 2003; Ridker et al, 2004; Pradhan et al, 2002; Blankenberg et al, 2003; Heeschen et al, 2003; Nordt et al, 1999). Desde hace tiempo se ha demostrado que los niveles séricos de PCR se encuentran elevados en pacientes con CAD activa comparado con aquellos con CAD estable (Berk et al, 1990) y que existe una correlación entre la elevación de los niveles de PCR y eventos cardiovasculares en pacientes con angina inestable (Liuzzo et al, 1994) y eventos cardiovasculares futuros en diferentes poblaciones (Blake y Ridker, 2003).

La elevación de las concentraciones séricas de ciertas citocinas pro-inflamatorias se han asociado con la enfermedad coronaria y sus complicaciones (Wang et al, 2004; Margee et al, 2004), mediando la respuesta de fase aguda (Baumann et al, 1990; Heinrich et al., 1990), induciendo la producción de múltiples moléculas de adhesión, quimiocinas y la síntesis de MMPs y TIMPs (Galis et al, 1994; Mach et al, 1999). Desde hace varias décadas, se ha reportado un dominio de citocinas tipo Th1 en el suero de pacientes con angina inestable (UAP) como IFN- $\gamma$ , IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6 (Methe et al, 2005; Fernandes et al, 2004; Rus et al, 1996; Boer et al, 1999; Biasucci et al, 1999; Liuzzo et al, 2001). Ciertos investigadores han reportado niveles bajos de IL-10 en pacientes con SICA comparados con aquellos con SAP y sujetos control (Pasqui et al, 2005; Tziakas et al, 2003), sugiriendo

que niveles reducidos de esta citocina puede favorecer la inestabilidad de la placa <sup>(Rajappa et al, 2009)</sup>. Además, se ha mostrado que pacientes con UAP tienen niveles significativamente más elevados de IL-1ra que los pacientes con SAP e individuos sanos, implicando a los niveles de IL-1ra como un marcador sensible de inestabilidad clínica en pacientes con CAD <sup>(Patti et al, 2002)</sup>. Los niveles séricos elevados de IL-6 e IL-8 también son considerados como predictores para CAD inestable <sup>(Romuk et al, 2002)</sup>.

## ANTECEDENTES

La vulnerabilidad de una placa aterosclerótica avanzada no ocurre como un fenómeno local aislado sino también como consecuencia de una enfermedad sistémica. El incremento en la coagulabilidad y la inflamación, así como la recurrencia de infecciones, son factores sistémicos que se correlacionan con la ruptura de la placa interactuando sinérgicamente con los factores de riesgo tradicionales (Fuster y Fayad, 1999; Corti y Fuster, 2003; Sambola et al, 2003) que gobiernan muchos de los aspectos de la biología de la placa, determinando su destino clínico (Libby, 2005; Rader et al, 2008).



**Figura 3. Marcadores locales y sistémicos involucrados en la ruptura de la placa aterosclerótica (Lutgens et al, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003).**

Por ahora se ha probado que la regulación de factores locales es capaz de cambiar la progresión y la composición de la placa, ya sea para prevenir o inducir su ruptura, y que la regulación de los moduladores sistémicos tiene un efecto en la biología local del ateroma

y viceversa (Szoroday et al, 2006). Muchos moduladores de la inflamación, respuesta inmune, fibrosis y coagulación no sólo son utilizados como biomarcadores sistémicos de eventos ateroscleróticos sino son participantes activos locales en la ruptura del ateroma (Willerson, 2002; Manhapra et al, 2001).

Los signos clínicos de una placa vulnerable son difíciles de discernir y por muchos años su identificación ha estado basada en marcadores imagenológicos, biomarcadores funcionales de la homeostasis vascular y en marcadores circulantes basados principalmente en mediciones de factores de inflamación, estrés oxidativo y trombosis (Vasan, 2006; Tardif et al, 2006; Naghavi et al, 2006; Garcia-Moll, 2005). El uso de biomarcadores de la MEC (i.e MMPs y TIMPs) han sido menos estudiados a pesar de que éstos proveen una plataforma estructural y funcional esencial de la vasculatura, cuyos cambios con respecto a su síntesis y/o degradación juegan un papel crucial en la remodelación vascular pero también en el desarrollo y ruptura de las placas (Libby y Lee, 2000; Shah y Galis, 2001), por lo que actualmente se propone que los marcadores de la inestabilidad y ruptura del ateroma pueden ser muy útiles para predecir eventos coronarios futuros y su recurrencia (Newby, 2008). Evidencia inmunoquímica ha demostrado una sobreexpresión de ciertas colagenasas como MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9 y MMP-13 y de TIMPs en las CEs, macrófagos, CMLs y células espumosas presentes en las placas en etapas más avanzadas de la aterogénesis (Galis et al, 1994; Newby, 2005), así como una mayor actividad proteolítica de MMP-1, -3, y -9 mayor en placas inflamadas que en placas fibrosas (Galis et al 1992; Kalela et al, 2002; Noji et al, 2001; Tayebjee et al, 2005; Wilson et al, 2003). La actividad proteolítica está muy asociada con los macrófagos y las CMLs en los hombros de las placas, alrededor del núcleo necrótico y acompañada de la expresión y concentración de MMP-1 y MMP-9 (Galis et al, 1994; Sukhova et al, 1999).

Por ahora es un hecho reconocido que las células inmunológicas dominan las lesiones ateroscleróticas tempranas y sus moléculas efectoras aceleran la progresión de las lesiones y los mecanismos inflamatorios que dan lugar al desarrollo de los SICA (van der Wal et al, 1994; Kovanen et al, 1995). Recientemente se ha demostrado una activación sistémica de las células del sistema inmune en las distintas etapas de CAD (Ross, 1999; Abbate et al, 2003; Methe et al,

2005). Mediante pruebas de invasión y de migración y la síntesis de diversos marcadores séricos como el CD14, la activación de monocitos antes del contacto con la vasculatura dañada es ahora un hecho demostrado (Zalai et al, 2001), fundamentando que la inflamación sistémica puede no sólo reflejar sino potencialmente dirigir la inestabilidad de la placa. Niveles incrementados de marcadores de activación de monocitos y células T se han detectado en suero de pacientes con UAP e IAM (Lee et al, 1999; Caligiuri et al, 2000; Jude et al, 1994). De manera que, los mecanismos inmuno-inflamatorios que subyacen a la vulnerabilidad y desestabilización de la placa ateromatosa también están definidos por los mecanismos sistémicos definidos en gran medida por los leucocitos mononucleares activados en circulación (Yamashita et al, 2003; Hansson, 2001; Liuzzo et al, 1999). Los monocitos, todavía en circulación, son capaces de generar y secretar muchos de los mediadores inflamatorios, degradadores de la matriz y trombogénicos involucrados en dicha destabilización (Zalai et al, 2001). Un incremento significativo de marcadores séricos en circulación producidos y/o inducidos por los monocitos y células T activadas han sido ampliamente descritos. Niveles elevados de citocinas inflamatorias, elevación de mediadores inflamatorios como las proteínas de fase aguda (PCR) (Biasucci et al, 1996; Liuzzo et al, 1994; Haverkate et al, 1997), moléculas de adhesión (P y E selectinas, ICAM-1, VCAM-1), quimiocinas (MCP-1, CCR-2, IL-8), citocinas (GM-CSF, IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ , CD40L), mediadores de la matriz (TGF- $\beta$ , proteasas (MMPs) e inhibidores (TIMPs), mediadores de la coagulación (FT), entre muchos otros han sido detectados en un vasto número de estudios previos (Albert et al, 2003; Ridker et al, 2004; Ridker et al, 2000; Blankenberg et al, 2003; Heeschen et al, 2003; Nordt et al, 1999). Por tanto, resulta concebible la idea de que la ruptura de la capa fibrosa está influida por la producción y desequilibrio entre las MMPs y TIMPs generadas en la placa aterosclerótica (Hanemaaijer et al, 1993; Orbe et al, 2003) y por sus concentraciones en circulación (Noji et al, 2001; Nanni et al, 2007).

Las concentraciones de MMPs y sus inhibidores pueden ser detectadas a nivel sistémico, y se ha visto que pacientes con enfermedad coronaria muestran una alteración en el balance fibrinolisis/proteólisis en sangre periférica (Paramo et al, 2001). Diversos estudios han

demostrado un incremento significativo de las concentraciones de diversas MMPs en pacientes con SICA comparados con sujetos sanos y con pacientes con enfermedad coronaria más avanzada (Kai et al, 1998; Eckart et al, 2004). Zeng y cols. (2005) fueron de los primeros en demostrar un incremento en las concentraciones de MMP-9 y MMP-2 en la circulación de pacientes con SICA comparado con sujetos sanos, cuyos niveles correlacionaron fuertemente con la concentración de PCR. Niveles elevados de MMPs y un desequilibrio en la proporción MMPs/TIMPs han sido detectados en el suero de pacientes con etapas avanzadas de CAD (Shah et al, 1995; Brown et al, 1995).

Gran cantidad de investigaciones han reportado un asociación entre las MMPs y TIMPs que predicen un pronóstico adverso en una amplio rango de enfermedades cardiovasculares (Kalela et al, 2002; Noji et al, 2001; Tayebjee et al, 2005; Wilson et al, 2003), donde el biomacador más prometedor es la MMP-9 como predictor independiente de la ruptura de la placa ateromatosa (Blankenberg et al, 2003; Loftus et al, 2003; Uzui et al, 2002; Fukuda et al, 2006), junto con incrementos en la concentración sérica de MMP-1, MMP-2 y TIMP-1 en pacientes con SICA (Inokubo et al, 2001; Kai et al, 1998; Inoue et al, 2003). Otros estudios describen niveles elevados de TIMP-1 en el suero de pacientes con angina estable e inestable (Inokubo et al, 2001; Ding et al, 2006; Fiotti et al, 2007) en comparación con individuos sanos (Giasante et al, 2007; Nanni et al, 2007; Higashikata et al, 2006). Posteriormente, se demostró un desbalance entre las concentraciones séricas de MMP-9/TIMP-1 en pacientes con estados avanzados de CAD (Cheng et al, 2008; Brunner et al, 2010). Cavusoglu y cols. (2006) establecieron como predictor independiente de eventos cardiovasculares futuros a los niveles séricos bajos de TIMP-1 en una cohorte de pacientes varones sometidos a angiografía coronaria. Como extensión a estos hallazgos, se ha demostrado un desbalance en la proporción MMP-9/TIMP-1 en los monocitos CD14<sup>+</sup> obtenidos de pacientes con manifestaciones clínicas avanzadas de CAD, donde la actividad sérica de MMP-9 correlacionó significativamente con la proporción MMP-9/TIMP-1 en los monocitos circulantes (Brunner et al, 2010).

Los monocitos expresan niveles bajos de diversas MMPs en condiciones fisiológicas, pero



su contacto con la MEC induce la síntesis de un amplio espectro de MMPs. Así como en los macrófagos, el LPS, la unión CD40 y citocinas inflamatorias también induce cambios en la expresión de MMPs en monocitos, mediados principalmente por el NF- $\kappa$ B. Los monocitos expresan TIMP-1, -2 y -3 y muy poca cantidad de TIMP-4 (Bar-Or et al, 2003), y producen espontáneamente MMP-9, cuyos niveles se incrementan con la exposición a LPS, TNF, IL-1, GM-CSF y por la unión de CD40 con su ligando (Zhang et al, 1998; Mach et al, 1997). La MMP-1, sin embargo, no es producida por los monocitos pero concentraciones bajas se inducen con la presencia de estas citocinas o cuando son estimulados por productos bacterianos. Los niveles de TIMP-1 incrementan en estas células cuando son estimuladas con LPS e IL-10 (Nold et al, 2003). Diferentes estímulos inflamatorios como TNF- $\alpha$  e IL-1 entre otros, regulan la expresión de diversas MMPs (Arenas et al, 2004), mientras que la expresión de TIMP-1 incrementa con la estimulación con LPS y con IL-10 (Nold et al, 2003). Por ahora se ha visto que la IL-4 disminuye la producción de MMP-1 y MMP-9 (Corcoran et al, 1992; Lacraz et al, 1992), mientras que el IFN- $\gamma$  reduce la producción de MMP-9 y MMP-12 en monocitos (Lacraz et al, 1992; Wu et al, 2000), y que los macrófagos activados con IFN- $\gamma$  son mayores productores de MMPs y los alternativamente activados producen TIMP-1 (Murray y Wynn, 2011). Se ha visto que la PCR induce la expresión de MMP-1 en macrófagos sin afectar la síntesis de TIMP-1 (Williams et al, 2004).

Se ha observado una asociación entre los biomarcadores circulantes de la MEC y las manifestaciones clínicas y los factores de riesgo ateroscleróticos. Se conoce que la PCR induce la expresión de MMP-1 en macrófagos sin afectar la síntesis de TIMP-1 (Williams et al, 2004) y que los niveles incrementados de MMP-9 en circulación se han asociado directamente con las concentraciones de PCR, IL-6 y fibrinógeno (Ferroni et al, 2003).

Estudios relacionados han demostrado que los niveles elevados de oxLDL juegan un papel en la transición de placas estables hacia un estado inestable mediante la estimulación en la producción de MMPs por las CEs y macrófagos (Huang et al, 1999; Xu et al, 1999; Li et al, 2005).

Experimentos *in vitro*, han demostrado que las oxLDLs incrementan la producción de MMP-1, -3 y -9, mientras que reducen TIMP-1 y que la glucosa incrementa los niveles de MMP-9 por los macrófagos sin tener efectos en los niveles de TIMP-1 (Death et al, 2003). En contraste, las HDLs reducen la producción de diversos tipos de MMPs (Huang et al, 2001; Li et al, 2003). En los monocitos/macrófagos se ha reportado que las oxLDLs actúan sinérgicamente con factores pro-inflamatorios que inducen la expresión de MMP-1 y MMP-9 (Ardans et al, 2002). Por otro lado se ha visto que los individuos fumadores presentan niveles incrementados de MMP-9 y TIMP-1 (Nakamura et al, 1998), que la concentración de TIMP-1 se correlaciona con el índice de masa corporal (Sundstrom et al, 2004), y que los niveles incrementados de MMP-9 circulantes con el aumento de la presión sanguínea y engrosamiento de las paredes arteriales (Yasmin et al, 2005). De igual manera, el incremento de TNF- $\alpha$ , catecolaminas, oxLDLs en SICA incrementan la síntesis de MMP-1 y MMP-9 por monocitos y macrófagos (Speidl et al, 2004). Recientemente, se ha demostrado que los monocitos de los pacientes con SICA presentaron una sobreexpresión de los genes que codifican para MMP-2 y -9, particularmente en la fase aguda de estos síndromes (Kulach et al, 2010). Por otro lado, se ha reportado que los pacientes con CAD tienen una mayor cantidad de monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> que los sujetos sanos (Schitt et al, 2004), que correlacionan negativamente con los niveles de HDL y positivamente con niveles de lípidos aterogénicos por lo que se han sugerido como marcadores celulares durante la hipercolesterolemia (Rothe et al, 1996), mientras que se ha detectado un incremento significativo de CD14<sup>lo</sup>CD16<sup>+</sup> en pacientes con CAD estable, importantes en la reparación y estabilidad del ateroma. Se sabe que los monocitos son activados, derivando en una cascada de citocinas inflamatorias (Hochart et al, 2008), particularmente en pacientes con angina inestable (Jude et al, 1994). Antes de su participación en la patogénesis de los SICA, los monocitos son activados en circulación mediante sus receptores Toll (TLR) e interacciones con otros leucocitos y células endoteliales, presentando transformaciones en su fenotipo. Los TLRs parecen ser

particularmente importantes en la activación de los monocitos circulantes en los SICA, reconociendo moléculas liberadas de tejidos dañados e iniciando la cascada inflamatoria por diferentes poblaciones celulares, incluyendo a los monocitos. Estudios previos han descrito que los monocitos TLR4<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> están 2.5 veces más incrementados en pacientes con SICA, asociados con niveles elevados de IL-6 y TNF- $\alpha$ , así como de moléculas de adhesión, selectinas y quimiocinas en etapas tempranas de CAD, indicando su papel potencial en la predisposición para desarrollar SICA y vulnerabilidad de la placa aterosclerótica (Methe et al, 2005). Por lo tanto, los monocitos están activamente involucrados en detonar la cascada inflamatoria en los SICA, proceso que es posteriormente amplificado por niveles elevados de PCR y proteínas de choque térmico secretados en estos pacientes (Satoh et al, 2006).

La activación de monocitos que infiltran en el sitio de lesión vascular pudiera ser crucial no sólo para el desarrollo y la progresión de la placa aterosclerótica sino para su desestabilización. La diferencia de microambientes que caracterizan las distintas manifestaciones clínicas de CAD pudiera ser en gran medida la responsable de una activación diferencial que conlleve a la síntesis diferencial de MMPs y TIMPs. Por tanto, sería de gran interés esclarecer la participación de los monocitos en los mecanismos sistémicos estabilizadores o desestabilizadores de las placas ateroscleróticas coronarias.

Actualmente está surgiendo amplia evidencia que sugiere que la enfermedad cardiovascular (ECV) puede ser encendida por diversas infecciones. En particular, la infección respiratoria aguda (influenza), puede ser un importante disparador de los SICA (Warren-Gash et al, 2012). Debido a que la infección es importante en la etiología de la inflamación, ésta pudiese conferir un riesgo incrementado para el desarrollo de las complicaciones aterotrombóticas (Kiechl et al, 2001). La respuesta del hospedero a las infecciones agudas pueden encender, amplificar o facilitar los SICA no sólo como resultado de cambios inflamatorios y trombogénicos generalizados, sino también mediante efectos locales en las arterias coronarias y lesiones ateroscleróticas (Corrales-Medina et al, 2010). La inflamación sistémica y las infecciones aceleran la aterogénesis en animales (Alber et al, 2000).

Sin embargo, la inflamación sistémica varía en respuesta a infecciones o a otros estímulos pro-inflamatorios. Estos cambios intermitentes pueden estar vinculados en el riesgo de desarrollar eventos vasculares. De hecho, los marcadores inflamatorios predicen la evolución en los eventos vasculares agudos <sup>(Keaney y Vita, 2002)</sup>; el incremento en el conteo de leucocitos puede anunciar un período corto de riesgo incrementado de embolia <sup>(Grau et al, 2004)</sup>; y diversos estudios han sugerido que puede existir un incremento transitorio en el riesgo de IAM posterior a una infección <sup>(Spodick et al, 1984; Mattila et al, 1989; Valtonen et al, 1993)</sup>.

Las infecciones agudas, además de encender respuestas inflamatorias sistémicas, tiene efectos inflamatorios directo en las placas ateroscleróticas y arterias coronarias. La formación del trombo en la superficie de las placas complicadas es esencial para la evolución de los SICA <sup>(Davies y Thomas, 1984)</sup>, y las infecciones agudas pueden promover el desarrollo de trombos en diversas maneras, ya sea activando directamente a las plaquetas o por la respuesta que éstos desencadenen, causando cambios y desregulación del sistema de coagulación (aumento en la actividad antitrombina y en las concentraciones de proteína C activada) e incrementando los niveles circulantes de factor tisular (FT) <sup>(Fitzgerald et al., 2006; Grando et al, 2002; Shorr et al, 2006)</sup>. Además, las infecciones agudas puede causar vasoconstricción coronaria, estimulando la actividad plaquetaria inducida por fricción y comprimiendo el núcleo ateromatoso que promueve su ruptura o contribuye a la erosión de la placa <sup>(Virmani et al, 2006)</sup>. A la fecha, todavía no está claro si las infecciones son un estímulo crónico para el desarrollo de la aterosclerosis o si las infecciones agudas ejercen un papel especial en precipitar los eventos coronarios agudos. A este respecto, se ha reportado que los niveles elevados de anticuerpos a muchos agentes infecciosos está asociado con un incremento en el riesgo para desarrollar SICA <sup>(Pesonen et al, 2007; Espínola-Klein et al, 2002)</sup>. De tal suerte que, si la probabilidad de un evento vascular está relacionado a las variaciones en los mecanismos que subyacen al estado inflamatorio y función endotelial, posiblemente las infecciones y quizá las vacunas, puedan estar asociadas con un incremento de corta duración en la tasa (índice) del evento.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de su naturaleza crónica, generalmente la aterosclerosis no es diagnosticada previo al desarrollo de sus síntomas o complicaciones. Actualmente continúa habiendo una incidencia elevada de eventos coronarios agudos tanto en la población con enfermedad aterosclerótica declarada como en individuos con enfermedad subclínica. De igual manera, todavía persisten desconocidas las causas por las que muchos pacientes con enfermedad aterosclerótica coronaria severa y extensiva permanecen estables durante años sin desarrollar algún evento coronario agudo, mientras que otros los desarrollan como una primera manifestación, a pesar de tener un proceso aterosclerótico menos severo. A la fecha, los marcadores sistémicos de la inflamación (PCR, fibrinógeno, interleucinas, CD40L soluble), aún cuando tienen utilidad potencial en la estratificación de riesgo cardiovascular, carecen de suficiente especificidad para ser utilizados como predictores de CAD inestable a corto plazo. Por tanto, existe una necesidad inminente de encontrar biomarcadores sistémicos más específicos y sensibles que ayuden a predecir el desarrollo de eventos coronarios agudos.

## JUSTIFICACIÓN

En virtud de que la diferencia entre la presencia de placas de ateroma no trombogénicas generalmente manifestadas como angina estable y un evento coronario agudo con formación de trombos (SICA) implica la ruptura o erosión de la placa, pensamos que es posible y de gran utilidad preventiva la identificación de biomarcadores sistémicos específicos que reflejen y/o pronostiquen la vulnerabilidad de la placa aterosclerótica coronaria. Considerando que la vulnerabilidad de la placa aterosclerótica depende de los procesos immuno-inflamatorios tanto locales como sistémicos; que la estabilidad del ateroma depende en gran medida del balance entre las MMPs y sus inhibidores endógenos (TIMPs); y que diversos estímulos inflamatorios o infecciosos pueden alterar la regulación de la actividad proteolítica de las MMPs, es posible que, mediante la evaluación de la respuesta de los monocitos a ciertos mediadores inflamatorios sistémicos como las citocinas pro- y anti-inflamatorias sobre la producción de dichas proteínas nos permitan conocer la participación de los mecanismos sistémicos que subyacen a la desestabilización de la placa aterosclerótica. Esto último permitiría la identificación temprana de aquellos pacientes que se encuentren en alto riesgo de desarrollar eventos coronarios agudos y distinguirlos de aquellos con bajas probabilidades de presentar complicaciones aterotrombóticas, así como la intervención con tratamientos oportunos enfocados a la estabilización de los ateromas y a la reducción de su trombogénicidad capaces de prevenir eventos catastróficos que pongan en riesgo su vida.

## **HIPÓTESIS**

Los monocitos de pacientes con enfermedad aterosclerótica coronaria (CAD) estable e inestable producen diferentes concentraciones de metaloproteasas (MMPs) e inhibidores endógenos específicos (TIMPs) y por consiguiente distinta proporción entre ambas moléculas que los sujetos sanos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la respuesta de los monocitos pertenecientes a pacientes con diferentes manifestaciones de CAD y de sujetos donadores sanos a la estimulación con citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias sobre la producción de metaloproteasas y sus inhibidores endógenos.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Caracterización de la respuesta inmune sistémica de pacientes con angina de pecho estable (SAP), pacientes con angina inestable/infarto agudo del miocardio sin elevación del segmento ST (UAP/NSTEMI) y de sujetos donadores sanos (C) mediante la determinación de las concentraciones séricas de marcadores inmuno-inflamatorios sistémicos: citocinas pro-inflamatorias (IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-6) y citocinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-10), quimiocinas (MCP-1a, IL-8 e IP-10), Proteína C Reactiva (PCR), antagonista del inhibidor de IL-1 (IL-1ra) y complemento (C3, C4).
- Medición de las concentraciones de IL-1ra, MMP-1, -2, -9 y TIMP-1 en el sobrenadante de cultivos de monocitos obtenidos de pacientes con angina de pecho estable (SAP), pacientes con angina de pecho inestable/infarto agudo del miocardio sin elevación del segmento ST (UAP/NSTEMI) y de sujetos donadores sanos (C).



- Análisis del balance existente entre las concentraciones de MMP-1, -2 y -9 y su inhibidor específico TIMP-1 secretadas por los monocitos cultivados de pacientes con angina de pecho estable (SAP), pacientes con angina de pecho inestable/infarto agudo del miocardio sin elevación del segmento ST (UAP/NSTEMI) y de sujetos donadores sanos (C).
- Evaluación de los efectos del IFN- $\gamma$  e IL-4 en la secreción de IL-1ra, MMP-1, -2 y -9 y de su inhibidor específico TIMP-1, así como su influencia en la proporción MMPs/TIMP-1.

## MATERIAL Y METODOLOGÍA

### **Población de estudio.**

El primer grupo se conformó de 30 pacientes con angina de pecho estable (SAP) cuyos episodios de dolor precordial opresivo duraron menos de 30 min durante el reposo o el ejercicio, cuya angina tuviera al menos 6 meses de aparición y con isquemia demostrada por algún método de diagnóstico coronario, ecocardiográfico o mediante medicina nuclear que hayan acudido a consulta externa del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" (INCICH). Se excluyen a pacientes con angina secundaria.

Un segundo grupo se conformó por 30 pacientes con angina de pecho inestable y pacientes con infarto del miocardio sin elevación del segmento ST (UAP/NSTEMI) ingresados al mismo instituto (INCICH), cuya angina en reposo la habían padecido en el último mes, con desviación del segmento ST y con troponinas no mayores a 1. Se excluyeron aquellos pacientes con infarto agudo del miocardio, enfermedad valvular y bloqueo de la rama izquierda que invaliden los análisis del segmento ST y pacientes candidatos a reperfusión.

El tercer grupo se conformó de 30 individuos donadores de sangre como grupo control (C) sin antecedentes de enfermedad cardíaca que cumplieron con los requerimientos definidos por el Banco de Sangre del INCICH y/o por donadores sanos con historial clínico conocido.

Para todos los grupos se excluyen aquellos sujetos y pacientes que presenten enfermedad valvular, cirugía, traumatismo durante el último mes, cardiomiopatía, enfermedad neoplásica, condiciones febriles, terapia anticoagulante oral durante las últimas 4 semanas, resucitación cardíaca, infecciones, enfermedades autoinmunes o inflamatorias, aneurismas de grandes vasos, enfermedad vascular cerebral, trombosis venosa, embarazo

tratamiento hormonal, insuficiencia renal y enfermedad pulmonar oclusiva crónica (EPOC).

### **Obtención de muestras**

De cada uno de los pacientes y sujetos control se tomaron un total de 10 ml de sangre periférica. 5 ml se colectaron en tubos vacutainer con EDTA para la obtención de células y 5 ml en tubos sin anticoagulante con gel separador y con retractor de coágulo para la obtención de suero. Las muestras sin anticoagulante se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos para separar y obtener los sueros que posteriormente se congelaron hasta su uso en ultracongelador (-76°C). Las muestras con EDTA se centrifugaron en tubos cónicos con 5 ml. de Ficoll Paque a 1600 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se separó el plasma de cada muestra y se mantuvieron bajo las mismas condiciones de congelación que los sueros. Del paquete celular se separaron los monocitos para los cultivos celulares.

### **Obtención de monocitos para cultivos celulares**

El paquete de leucocitos se resuspendió en 5 ml de medio RPMI. Bajo condiciones de esterilidad, se colocaron 500 µl/pozo del resuspendido en placas de 24 pozos para cultivos celulares y se dejaron incubar durante 4 horas a 37°C para permitir la adhesión de los monocitos a la superficie plástica. Se eliminó el sobrenadante y se despegaron los monocitos con PBS/EDTA frío durante 5 min. Se cosecharon los monocitos, se lavaron dos veces con medio RPMI y se contaron en coulter. Se cultivaron  $5 \times 10^5$  cel/pozo en medio RPMI suplementado (con glutamina, 10% de suero fetal bovino, 1% de gentamicina/estreptomicina y 1% de aminoácidos esenciales) y se dejaron incubar durante 24 horas a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub> y se estimularon con 10 ng/ml de IFN-γ y 30 ng/ml de IL-4. A las 48 horas de estimulación, los sobrenadantes se cosecharon y congelaron a -76°C hasta su uso.

### **Determinación de citocinas en suero.**

Se determinó la concentración de las citocinas pro-inflamatorias (IL-12, IL-6, IFN- $\gamma$ ) y anti-inflamatorias (IL-4 e IL-10), IL-1ra y quimiocinas (IL-8, IP-10, MCP-1 $\alpha$ ), en los sueros de cada paciente y controles. La medición tanto de citocinas como de quimiocinas se realizó con kits comerciales (Peprotech) mediante la técnica de ELISA-Sandwich.

Como ensayo paralelo se determinaron estas mismas moléculas en muestras de sangre obtenidas en distintos sitios de pacientes sometidos a cateterismo: Seno Coronario, Arterial Pulmonar, Arteria Femoral y Vena Cava Inferior, utilizando la misma técnica para determinar sus concentraciones séricas, únicamente con la finalidad de corroborar que los hallazgos en muestras de sangre periférica reflejaran lo encontrado en las arterias afectadas.

### **Determinación de los niveles de Proteína C Reactiva (PCR) y proteínas del complemento (C3 y C4) en suero.**

En un equipo de nefelometría cinética (Image 1800, Beckman Coulter), cuyo principio se basa en la medición de la desviación de los rayos de luz al formarse los complejos inmunes entre el reactivo y la PCR y proteínas séricas del complemento (C3 y C4), se determinaron las concentraciones de dichas proteínas en todos los sueros de pacientes y controles. Como ensayos para estandarización, se determinaron los niveles de estas moléculas en plasma para verificar si los valores séricos de PCR fueran comparables a los valores plasmáticos. De igual manera sólo se determinaron los niveles de PCR en distintos sitios de muestreo (Seno Coronario, Arteria Pulmonar, Arteria Femoral y Vena Cava Inferior).

**Determinación de la producción de metaloproteinasas, TIMP-1 e IL-1ra en sobrenadantes de cultivos celulares.** De los mismos sobrenadantes obtenidos de los cultivos de monocitos estimulados con IFN- $\gamma$  e IL-4 de cada uno de los pacientes y controles se determinó, mediante el uso de kits comerciales, la concentración de metaloproteinasas -1, -2 y -9 y TIMP-1, así como de IL-1ra. Todas las mediciones se realizaron mediante la técnica de ELISA-Sandwich.

### **Análisis estadístico.**

Los datos demográficos se muestran mediante medianas (percentil 25 y 75). Para variables categóricas se utilizó la Prueba Exacta de Fisher con un 95% de intervalo de confianza. Para comparaciones entre tres o más grupos se utilizó el análisis de varianza ANOVA, mientras que las diferencias entre grupos se usó la prueba no paramétrica *U* de Mann-Whitney o de Kruskal-Wallis con post-análisis con la prueba de Dunns para la comparación de datos entre dos grupos particulares. Se consideraron estadísticamente significativas las comparaciones con valores de  $p < 0.05$ . Todo el análisis estadístico se desarrolló utilizando el paquete estadístico Prism versión 4.0 (Graphpad Software, San Diego, CA).

# RESULTADOS

## ESTANDARIZACIÓN

### A) MEDICIÓN DE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE PCR EN DISTINTOS SITIOS DE MUESTREO

Con la finalidad de conocer si las muestras tomadas de sangre periférica de los pacientes serían representativas los sucesos inmuno-inflamatorios generados en la circulación central y reflejaran dichos procesos a nivel sistémico, se realizó la medición de la concentración sérica de la Proteína C Reactiva de muestras tomadas en diferentes sitios de la circulación periférica (arteria pulmonar AP, arteria femoral AF y vena cava inferior VCI) y circulación central (seno coronario). Los datos de la Figura 4 indicaron que las concentraciones de PCR fueron muy similares en los distintos lugares de muestreo, tanto en los sueros de pacientes con CAD estable e inestable y aquellos con cardiopatía no isquémica. Por tanto, estos resultados permitieron continuar los experimentos posteriores únicamente con muestras sanguíneas periféricas para simplificar el número de muestras por cada grupo de pacientes y para hacer más sencilla y eficiente su obtención en la clínica.

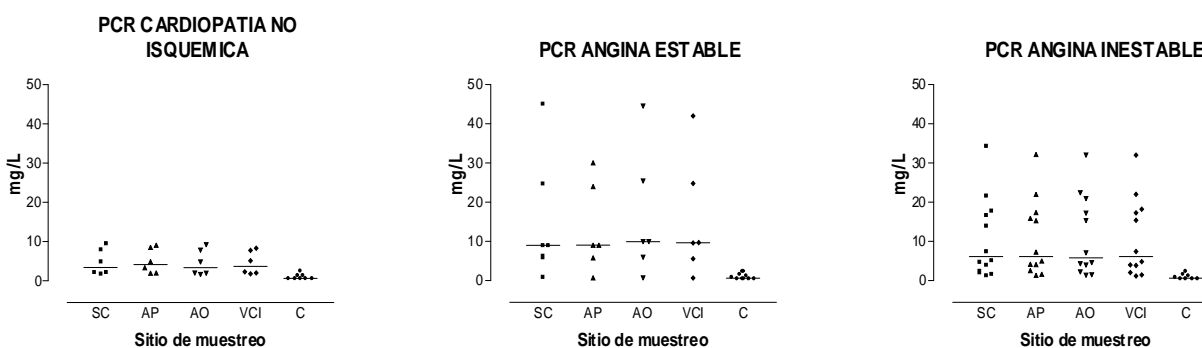


Figura 4. Determinación de la Proteína C Reactiva en sueros de pacientes con distinta cardiopatía y en diversos sitios de la circulación central (SC= seno coronario), y periférica (AP=arteria pulmonar, (AF=arteria femoral y VCI=vena cava inferior). Cada punto en la gráfica representa a un solo paciente.

**B) MEDICIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE PROTEÍNAS CIRCULANTES EN PLASMA Y SUEROS DE PACIENTES CON CAD.**

Con la finalidad de conocer si la detección de diversas proteínas resultaría similar en suero y en plasma, se determinaron los niveles de PCR y complemento (C3 y C4) en las muestras obtenidas de pacientes con presencia y ausencia de enfermedad isquémica coronaria y en sujetos control. La Tabla 1 muestra la diferencia de concentración de dichas proteínas detectadas entre ambos fluidos. Se encontró que las mediciones realizadas en suero fueron mayores que en plasma, donde el porcentaje de variación entre ambas mediciones alcanzó hasta un 57% en el caso de la PCR, un 65% en el caso de C3 y un 44.9% en la determinación de C4. Debido a estos resultados, todas las determinaciones subsecuentes se realizaron únicamente en los sueros de todos los grupos de estudio para obtener una mayor detección de proteínas en circulación.

**Tabla 1. Comparación de las concentraciones de PCR (A) y complemento (B) obtenidas en suero y plasma de sangre periférica de pacientes con angina estable (SAP), inestable (UAP/NSTEMI) y en sujetos con cardiopatía no isquémica (C NO I).**

A) Proteína C Reactiva

PACIENTE	DX	SUERO	PLASMA	% VARIACIÓN
1	SAP	14.2	6.37	55.14
2	SAP	15.3	7.11	53.52
3	SAP	13.1	10.1	23
4	SAP	14.3	6.81	52.3
5	UAP/NSTEMI	26.5	21.1	20.3
6	UAP/NSTEMI	27	21.5	20.3
7	UAP/NSTEMI	28.1	22.3	20.3
8	UAP/NSTEMI	28.6	20.8	27.2
9	C no I	0.485	1.26	15.9
10	C no I	1.86	2.31	36.1
11	C no I	1.63	1.99	22.08

B) Complemento C3 y C4

PACIENTE	DX	C3			C4		
		SUERO	PLASMA	% VARIACIÓN	SUERO	PLASMA	% VARIACION
1	SAP	121	51.5	53	42.7	17.2	50
2	SAP	115	50.4	56	44.9	18.3	54
3	SAP	105	72.7	30.7	36.9	26.7	27.6
4	SAP	120	47.7	60.25	43.8	17.1	60.9
5	UAP/NSTEMI	105	72.1	31.33	39.3	25.9	34.09
6	UAP/NSTEMI	114	80.2	29.64	38.7	28.1	27.3
7	UAP/NSTEMI	113	72.9	35.48	37.3	29.6	22.5
8	UAP/NSTEMI	110	71.1	35.36	38	28	26.3
9	C no I	37.2	28.4	23.65	10.2	7.7	24.5
10	C no I	82.7	55.6	32.76	17.2	12.9	25
11	C no I	75.8	66.9	11.74	18.3	14.6	20.2

**DATOS DEMOGRÁFICOS Y CLÍNICOS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.**

Como se observa en la Tabla 2, tanto los grupos de pacientes como el de los sujetos control ( C ) se aparearon por edad y género, de manera que fueran comparables entre sí. Según los datos obtenidos, únicamente se detectaron diferencias significativas en el uso de  $\beta$ -bloqueadores y tabaquismo entre ambos grupos de pacientes con CAD, siendo mayores en pacientes con UAP/NSTEMI, mientras que no existieron diferencias en el resto de los factores de riesgo, medicación, índice de masa corporal y eventos cardiovasculares previos.



**Tabla 2. Datos demográficos y clínicos de pacientes con angina estable (SAP), angina inestable (UAP/NSTEMI) y sujetos aparentemente sanos como controles (C).**

	UAP/NSTEMI (n=30)	SAP (n=30)	<i>p</i>	Controles (n=30)
Edad, años	61.5 (39-80)	63 (38-81)	ns	54.8 (30-65)
Varones, n (%)	25 (83)	25 (83)	ns	23 (77)
IAM previos, n (%)	16 (53)	19 (63)	ns	0
Factores de riesgo cardiovascular, n (%)				
• Hipertension	21 (70)	21 (70)	ns	0
• Diabetes mellitus	15 (50)	17 (57)	ns	0
• Tabaquismo	25 (83)	16 (53)	<0.05	17 (57)
Laboratorios				
• Colesterol, mg/dL	159 (83-272)	164 (95-261)	ns	-
• LDL, mg/dL	99.8 (35-170)	93 (26-189)	ns	-
• HDL, mg/dL	36.3 (21-60)	37.1 (25-63)	ns	-
• Triglicéridos, mg/dL	134 (59-535)	170.5 (64-386)	ns	-
Medicación				
• Aspirina	29 (97)	28 (93)	ns	-
• Estatinas	27 (90)	28 (93)	ns	-
• β-bloqueadores	24 (80)	14 (47)	<0.05	-

## DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DE LA PROTEÍNA C REACTIVA.

Mediante la técnica de nefelometría, se realizó la determinación de las concentraciones de la PCR en el suero de ambos grupos de pacientes y sujetos control. Los datos de la Figura 5 muestran que los niveles de la PCR en el suero de pacientes con angina inestable (UAP/NSTEMI) son significativamente mayores a los detectados en el suero de pacientes con angina estable (SAP) y sujetos control: mediana mg/L: (3.45 vs 2.13 y 1.08 mg/L, respectivamente). Aunque no resultaron significativamente mayores, las concentraciones de PCR detectadas en los sueros de pacientes con SAP tienden a ser más elevadas que las detectadas en los sueros de sujetos sanos (2.13 vs 1.08 mg /L). Estos datos indican que las concentraciones séricas de PCR son más elevadas en los pacientes con CAD, mayormente en los pacientes con SICA que en los sujetos sanos tal como lo describe la literatura en múltiples estudios previos (Koenig et al, 1999; Ridker, 2000; Rifai et al, 2001; Danesh et al, 200; Mendall et al, 2000; Roivainen et al, 2000; Ridker y Rifai, 2000).

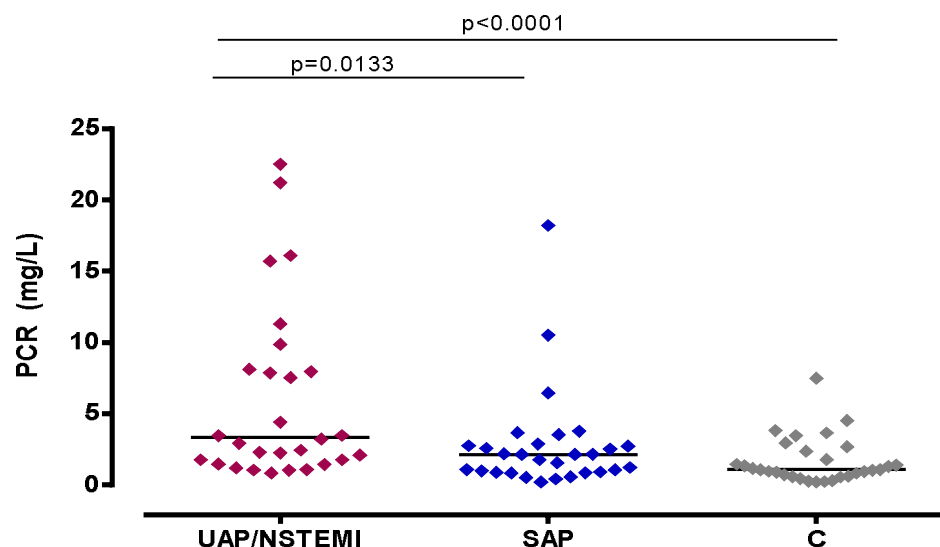
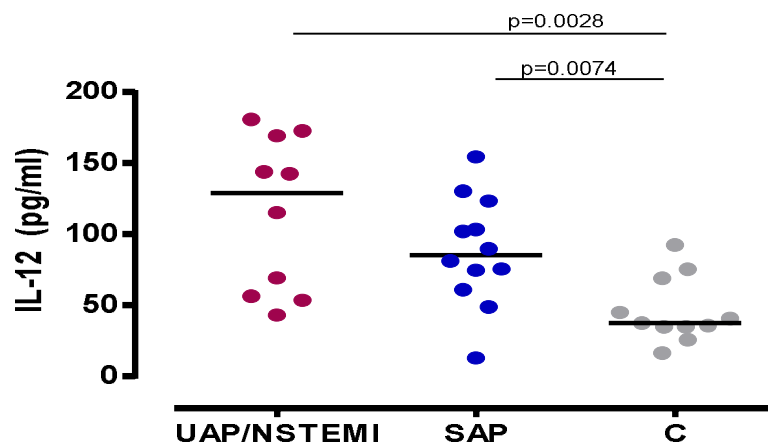


Figura 5. Concentración de PCR en el suero de pacientes con angina inestable (UAP/NSTEMI), angina estable (SAP) y sujetos sanos (C). Cada punto en la gráfica representa a un individuo. La línea horizontal representa la mediana en cada uno de los grupos de estudio. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. Valores de  $p < 0.05$  denotan significancia estadística.

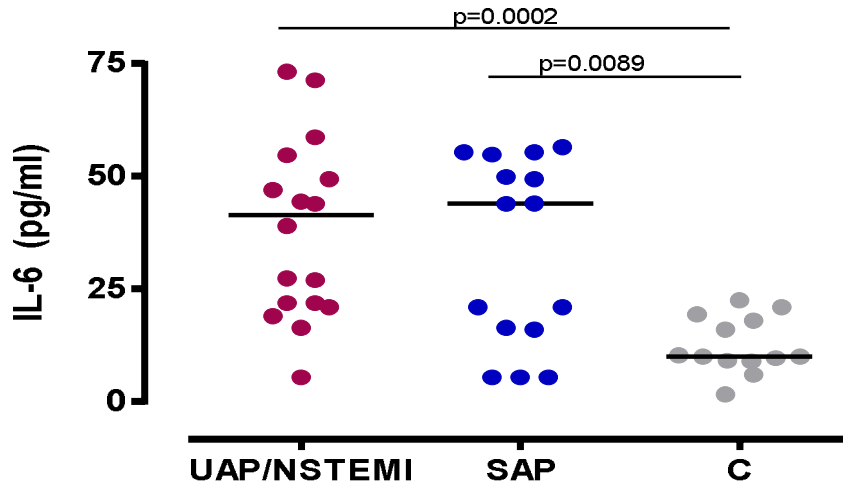
**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS Y ANTI-INFLAMATORIAS EN EL SUERO DE PACIENTES CON CARDIOPATÍA ISQUÉMICA.**

Se realizó la determinación de las citocinas pro-inflamatorias (IL-12, IL-6, IFN- $\gamma$ ) y de citocinas anti-inflamatorias (IL-10, IL-4) en los sueros de ambos grupos de pacientes con CAD. Las concentraciones de estas citocinas determinadas en el grupo de sujetos control fueron tomadas como valores basales de referencia. Los datos de la Figura 6 muestran que los niveles séricos de las citocinas pro-inflamatorias IL-12(A), IL-6 (B), IFN- $\gamma$  (C) detectadas en ambos grupos de pacientes fueron significativamente más elevadas que en los de los sujetos control. Aún cuando no se alcanzaron diferencias estadísticas entre los grupos de pacientes, el grupo UAP/NSTEMI tendió a producir mayores concentraciones de IL-12 e IFN- $\gamma$  que los pacientes con SAP, pero similares concentraciones de IL-6. Por el contrario, los niveles de IL-10 tendieron a ser más elevados en pacientes con SAP en comparación con los pacientes con UAP/NSTEMI y los controles. Las concentraciones de IL-4 en el suero de todos los grupos de estudio fueron similares. Por lo tanto, las citocinas pro-inflamatorias están incrementadas en los pacientes con CAD, particularmente en pacientes con SICA, mientras que las citocinas anti-inflamatorias son similares en pacientes y controles.

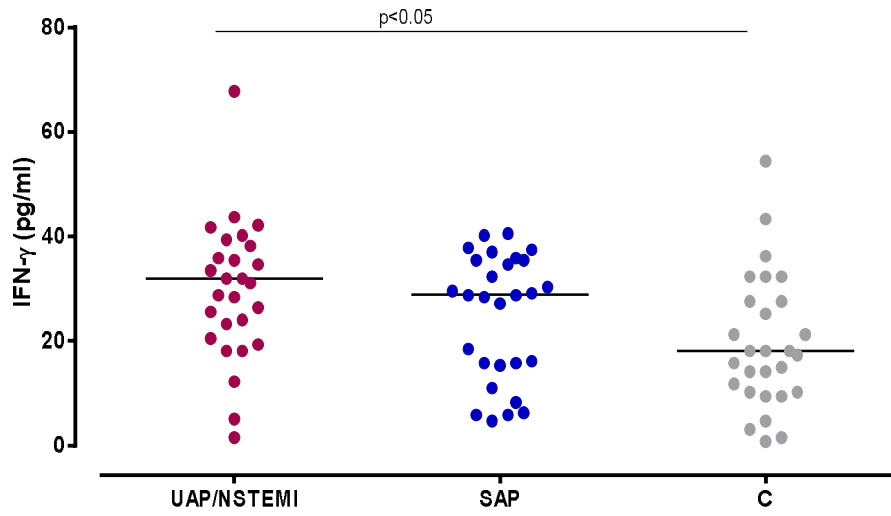
A)



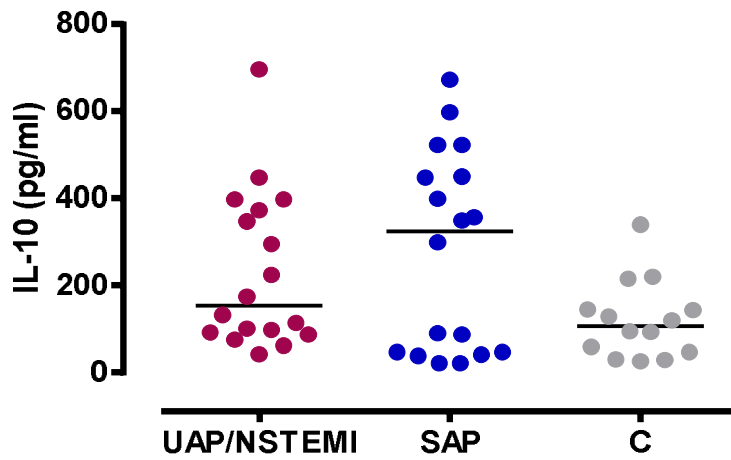
B)



C)



D)



E)

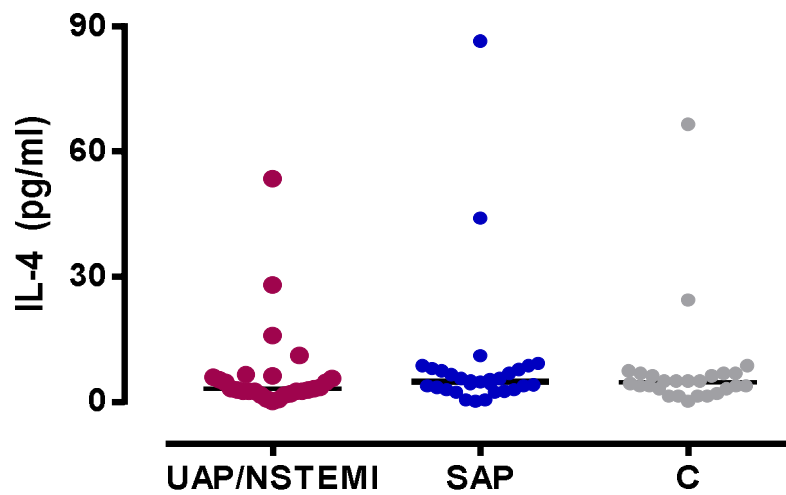
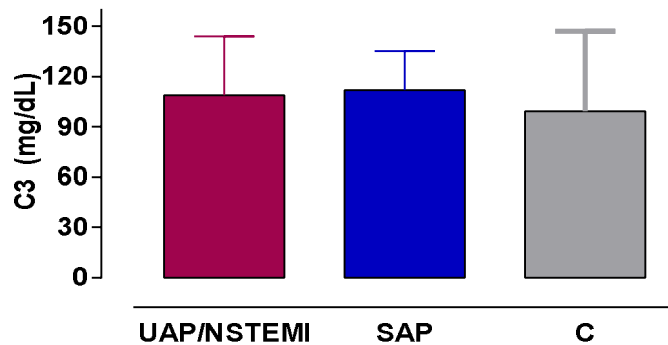


Figura 6. Concentración de citocinas pro-inflamatorias IL-12 (A), IL-6 (B), IFN- $\gamma$  (C) y de citocinas anti-inflamatorias IL-10 (D) e IL-4 (E) (medianas) en sueros de pacientes con angina inestable/IAM sin elevación del segmento ST (UAP/NSTEMI), angina estable (SAP) y sujetos donadores sanos como controles (C). Cada punto en la gráfica representa a un individuo.  $p < 0.05$  con significancia estadística.

### **DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DEL COMPLEMENTO C3 Y C4.**

La determinación de los niveles de C3 y C4 (Figura 7) en los sueros de pacientes con CAD y controles sanos no presentaron ninguna diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo los niveles de C3 tendieron a ser ligeramente mayores en ambos grupos de pacientes con angina (SAP= 112 mg/dL y UAP/NSTEMI= 109 mg/dL) que los controles (99.4 mg/dL), mientras que las concentraciones de C4 tendieron a ser más elevados en los pacientes con UAP/NSTEMI (28 mg/dL) que los pacientes con SAP (24 mg/dL) y donadores sanos (17.5 mg/dL). Por tanto, los datos anteriores indican que las proteínas del complemento no se incrementan durante CAD.

A)



B)

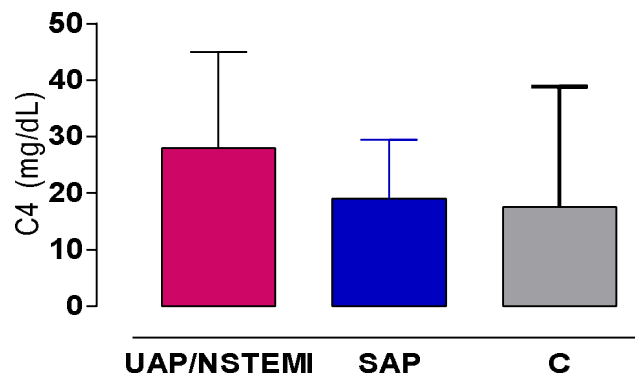


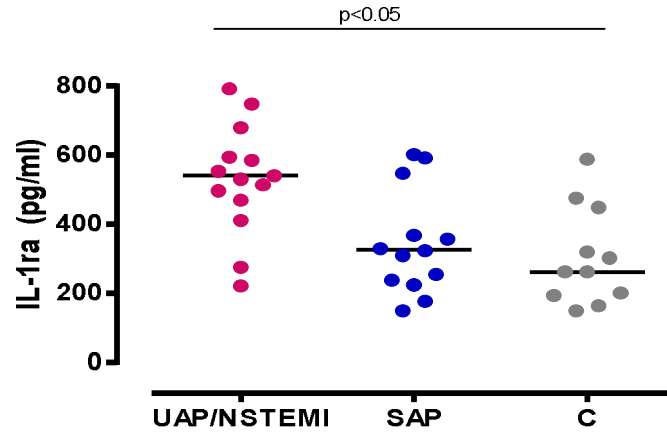
Figura 7. Concentraciones (mediana+rango (mg/dL) de C3 (A) y C4 (B) en el suero de pacientes SAP y UAP/NSTEMI y controles donadores sanos determinados mediante la técnica de Nefelometría.

## **DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE IL-1ra EN SUERO Y CULTIVOS CELULARES**

El antagonista del inhibidor de IL-1 (IL-1ra) resulta indispensable para la inhibición de las funciones pro-inflamatorias generadas por la IL-1 para favorecer el desarrollo y progresión de la placa aterosclerótica, por lo que su determinación tanto en suero como en sobrenadante pudiera reflejar en gran medida el estado inflamatorio sistémico del paciente y la capacidad de los monocitos para producir esta proteína de fase aguda y su asociación de la estabilidad o vulnerabilidad del ateroma. Los datos de la Figura 8A muestran que las concentraciones séricas de IL-1ra fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes con UAP/NSTEMI que en los pacientes con SAP y sujetos control (551 vs 380 y 306 pg/ml, respectivamente). Los datos muestran claramente un incremento en la concentración de IL-1ra en el suero de los pacientes con CAD.

De igual manera, se realizó la determinación de las concentraciones de IL-1ra en los sobrenadantes de cultivos de monocitos obtenidos de pacientes con UAP/NSTEMI, SAP y C estimulados con IFN- $\gamma$  e IL-4. La Figura 8B muestra una producción de IL-1ra significativamente más elevada por los monocitos de pacientes con UAP/NSTEMI que los de pacientes con SAP y controles sanos (2308.9 vs 1631.52 y 466.32 pg/ml, respectivamente). Es importante mencionar que ningún tipo de estimulación indujo modificación en la producción de IL-1ra en los cultivos de monocitos obtenidos de individuos sanos. El estímulo con IFN- $\gamma$  indujo un aumento en la producción de IL-1ra sólo en los monocitos de pacientes, mayormente en los de pacientes con SAP (1631.52 vs 5349.13 pg/ml;  $p=0.0001$ ) y menor en pacientes con UAP/NSTEMI (2308.9 vs 3432.16 pg/ml ;  $p= 0.0028$ ). La estimulación con IL-4 abatió la síntesis de IL-1ra en los cultivos celulares de pacientes con UAP/NSTEMI (2308.96 vs 1091.74 pg/ml;  $p<0.0001$ ), pero interesantemente incrementó en los cultivos de pacientes con SAP (1631.52 vs 3661.28 pg/ml;  $p=0.0010$ ), mostrando una clara diferencia entre los monocitos de ambos tipos de angina para responder a la exposición de IL-4, al menos para la producción de IL-1ra.

A)



B)

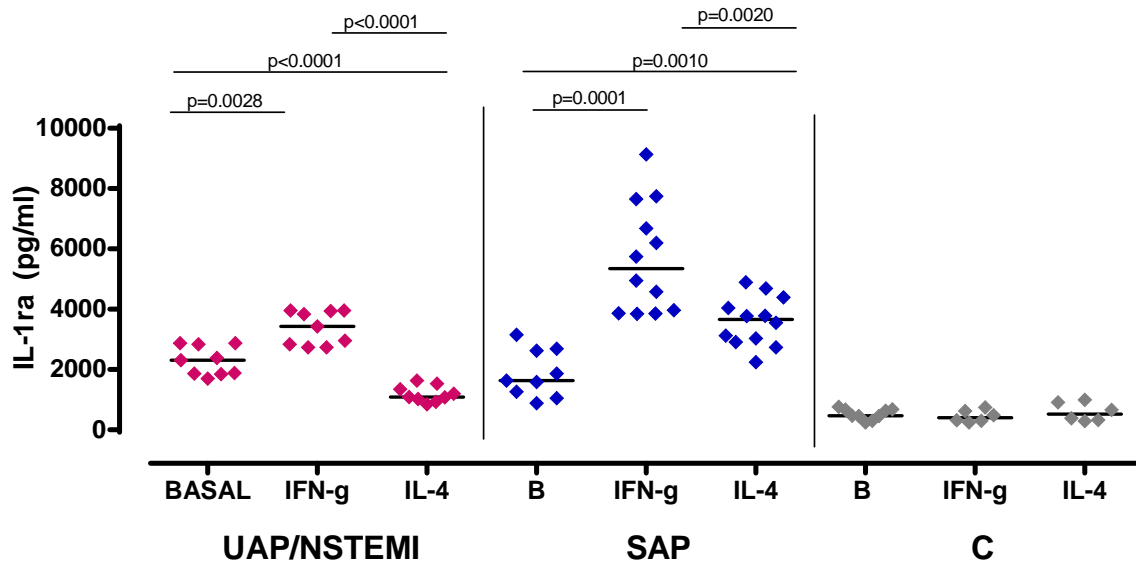


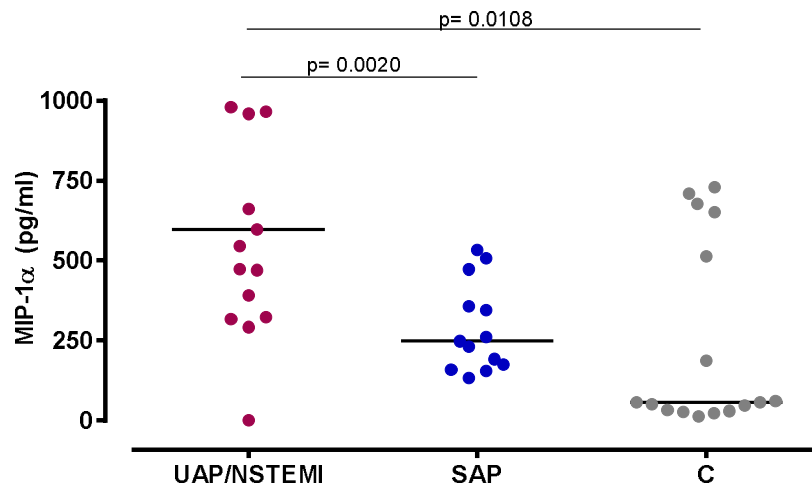
Figura 8. Concentración de IL-1ra (mediana, pg/mL) en suero (A) y en los sobrenadantes (B) de cultivos de monocitos de pacientes con SAP, UAP/NSTEMI y sujetos sanos (C) estimulados con IFN- $\gamma$  e IL-4. Cada punto en la gráfica representa a un individuo. Los valores de  $p < 0.05$  denotan significancia estadística.



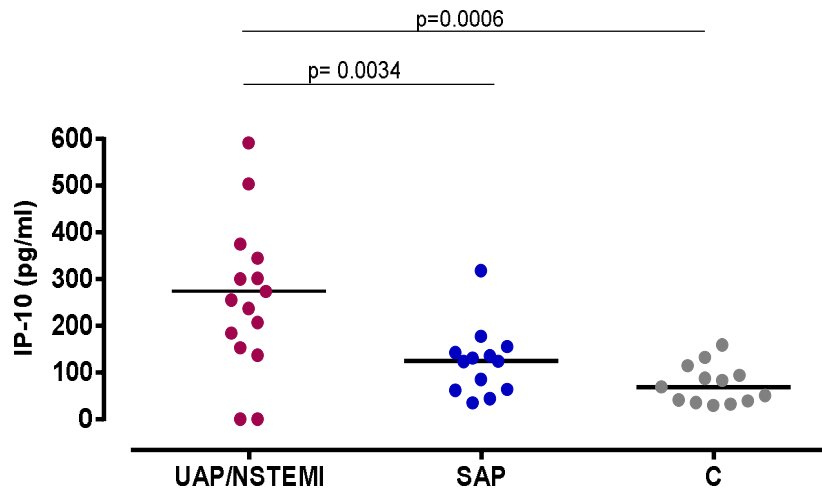
## DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE QUIMIOCINAS EN SUERO.

La Figura 9A muestra que los pacientes con UAP/NSTEMI tienen significativamente mayores concentraciones séricas de MIP-1 $\alpha$  más elevados que los pacientes con SAP y que los controles (749 vs 290 y 289 pg/ml, respectivamente). A su vez, los niveles de los sujetos control fueron más bajos que los detectados en el grupo de pacientes con SAP. De igual manera, los niveles de IP-10 e IL-8 (Figura 9B y 9C) fueron más altos en pacientes con CAD en comparación con los sujetos control. Comparando ambos grupos de pacientes, los niveles más altos de IP-10 se detectaron en el grupo de pacientes con UAP/NSTEMI (329 vs 123 pg/ml) mientras que los niveles séricos de IL-8, aunque sin significancia estadística, fueron más elevados en el grupo de pacientes con SAP (248 vs 186 pg/ml).

A)



B)



C)

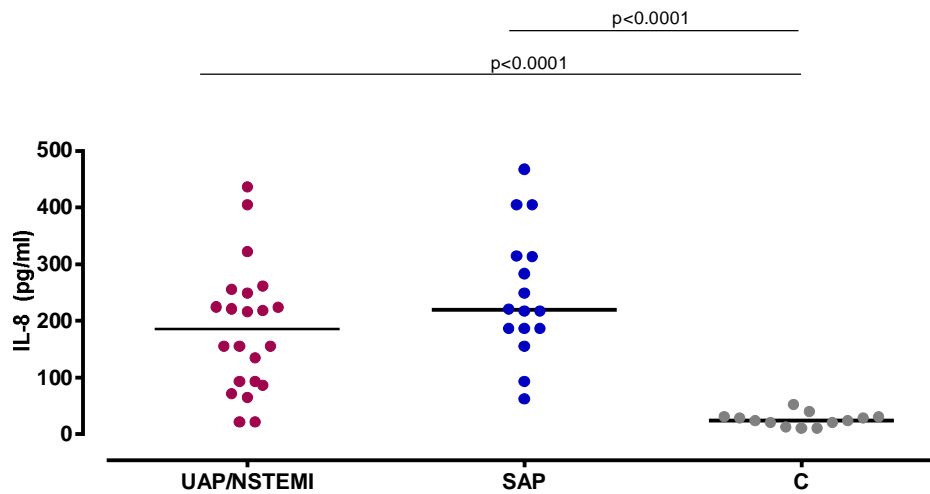


Figura 9. Concentración (mediana) de quimiocinas MIP-1 $\alpha$  (A) IP-10 (B) e IL-8 (C) en los sueros de pacientes con UAP/NSTEMI, SAP y sujetos sanos (C), determinados mediante la técnica de Nefelometría. Cada punto en la gráfica representa a un individuo. Los valores de  $p<0.05$  se consideraron con significancia estadística.

### **DETERMINACION DE LA PRODUCCIÓN DE METALOPROTEASAS E INHIBIDOR DE METALOPROTEASA-1 EN CULTIVOS DE MONOCITOS ESTIMULADOS.**

Con la finalidad de evaluar las diferencias en la capacidad productora de proteasas e inhibidores entre los monocitos de pacientes con diferentes manifestaciones de CAD y los de sujetos sanos y de los efectos de su estimulación con citocinas pro- y anti-inflamatorias, se determinaron las concentraciones de MMP-1, MMP-2, MMP-9 y TIMP-1 en los sobrenadantes de cultivos de monocitos estimulados con IFN- $\gamma$  e IL-4. Se consideraron como concentraciones basales a los cultivos celulares sin estimulación de cada uno de los grupos de estudio.

Los datos de la Tabla 3 muestra que los monocitos obtenidos de pacientes con CAD (SAP y UAP/NSTEMI) y de sujetos donadores sanos produjeron concentraciones basales similares de MMP-1. Aún cuando no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos, los monocitos de pacientes con SAP fueron menores productores de MMP-1 (1.5 veces menos) que las células de pacientes con UAP/NSTEMI y que las de sujetos control.

La estimulación con IFN- $\gamma$  (Figura 10 A) no promovió ninguna alteración significativa en los niveles basales de MMP-1 en todos los grupos de estudio. A pesar que los monocitos de pacientes con CAD incrementaron ligeramente su producción con la exposición con IFN- $\gamma$  (UAP/NSTEMI= 8.52 vs 9.85 ng/ml; SAP= 5.44 vs 6.72 ng/ml) y las células de los controles disminuyó escasamente (8.02 vs 6.60 ng/ml), no se alcanzaron diferencias significativas entre todos los grupos de estudio. En contraste, la estimulación con IL-4 indujo un abatimiento estadísticamente significativo en la producción de MMP-1 tanto en las células de pacientes como en los monocitos de sujetos donadores sanos. La exposición con IL-4 abatió hasta 3.5 veces la síntesis basal de MMP-1 en los monocitos de pacientes con UAP/NSTEMI (8.52 vs 2.43 ng/ml;  $p=0.0002$ ), hasta 12 veces en las células de pacientes con SAP (5.44 vs 0.46 ng/ml;  $p<0.0001$ ), y 7 veces en los monocitos de sujetos control (8.02 vs 1.09 ng/ml;  $p<0.0001$ ).

Tabla 3. Concentración (mediana + rango intercuartilar 25-75) de MMPs y TIMP-1 en el sobrenadante de cultivos de monocitos estimulados con IFN- $\gamma$  o IL-4. Valores de p=0.01 (\*); p=0.001(\*\*) y p=0.0001(\*\*\*). (+) denota significancia estadística entre grupo de pacientes (UAP/NSTEMI y SAP) vs Controles y (\*) entre pacientes con SAP vs pacientes con UAP/NSTEMI (\*).

MARCADOR	UAP/NSTEMI	SAP	CONTROL
<b>MMP-1</b>			
<b>BASAL</b>	8.52 (5.90 -16.59)*	5.44 ( 1.47 - 10.77)	8.02 (3.47 - 14.16)
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	9.85 (5.16 -13.03)	6.72 (4.55 - 9.90)	6.60 (4.23 - 11.26)
<b>IL-4</b>	2.43 (1.36 - 4.61)*,+	0.46 (0.01 - 0.97)+++	1.09 (0.94 - 2.20)
<b>MMP-2</b>			
<b>BASAL</b>	1.07 (0.03 - 4.45)++	2.83 (0.75 - 5.09)+	5.84 (2.63 - 12.42)
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	5.21 (0.67 - 11.05)	8.44 (4.5 - 12.94)	3.42 (1.33 - 11.70)
<b>IL-4</b>	2.84 (1.39 - 3.87)***	0.64 (0.03 - 1.15)++	1.16 (0.96 - 3.14)
<b>MMP-9</b>			
<b>BASAL</b>	190 (109.2 - 488.4)***	30.05 (14.0 - 90.2)+++	120.15 (94.63 - 194.20)
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	1005 (600.5 - 1531.1)	540.65 (192.7 - 1078.38)	792.8 (426.93 - 1043.40)
<b>IL-4</b>	124.7 (14.0 - 467.3)	90.45 (14.0 - 486.53)++	518.35 (204.28 - 901.20)
<b>TIMP-1</b>			
<b>BASAL</b>	386.1 (119.1 - 849.5)*	981.95 (568.33 - 1249.83)	593.15 (126.05 - 1394.85)
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	166.0 (7.0 - 501.6)++	180.55 (8.43 - 732.1)+	547.45 (277.50 - 1024.10)
<b>IL-4</b>	529.3 (351.4 - 881.4)**	997 (627.83 - 1360.68)+	579.50 (416.53 - 1034.48)

De manera que, los monocitos de pacientes con SAP mostraron una mayor respuesta a los efectos inhibidores de la IL-4 que los monocitos de pacientes con UAP/NSTEMI y que los monocitos de los donadores sanos , aún cuando las células de pacientes con UAP/NSTEMI fueron 5 veces más productoras que las células de SAP, mientras que el doble de las de los controles.

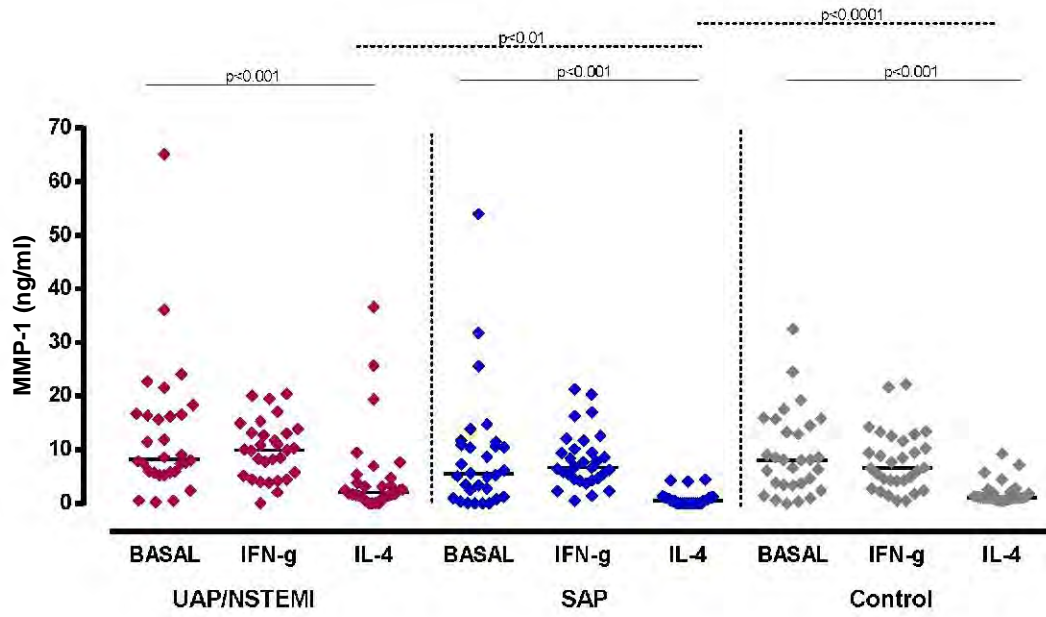
Contrariamente a lo observado con los niveles basales de MMP-1, la Tabla 3 muestra que los monocitos obtenidos de sujetos control produjeron niveles de MMP-2 significativamente más elevados (2 veces) que los monocitos obtenidos de pacientes con SAP (5.84 vs 2.83 ng/ml,  $p=0.0128$ ) y casi 4 veces más que los monocitos de pacientes con UAP/NSTEMI (5.84 vs 1.07 ng/ml,  $p=0.0012$ ). A pesar de no existir una diferencia significativa en la producción basal de MMP-2 entre los monocitos de ambos grupos de pacientes, los monocitos de pacientes con SAP produjeron 1.8 veces más MMP-2 que los monocitos de pacientes con UAP/NSTEMI. El estímulo con IFN- $\gamma$  (Figura 10 B) incrementó hasta 4 veces la producción basal de MMP-2 en los monocitos de pacientes con UAP/NSTEMI (1.07 vs 5.21 ng/ml;  $p=0.0155$ ), hasta 3 veces en los de pacientes con SAP (2.83 vs 8.44 ng/ml;  $p=0.0025$ ), pero no produjo ninguna alteración en la síntesis de esta proteasa en los monocitos del grupo control. Careciendo de diferencia significativa y contrariamente a lo observado con la producción de MMP-1, los monocitos estimulados de pacientes con SAP fueron mayores productoras de MMP-2 (8.44 vs 5.21 ng/ml), hasta 1.5 veces más que los monocitos de pacientes con UAP/NSTEMI, aunque estos últimos resultaron ser más respondedores a la estimulación con IFN- $\gamma$ , incrementando mayor número de veces su síntesis basal. La estimulación con IL-4 suprimió significativamente la producción basal de MMP-2 (4 veces) en los monocitos de pacientes con SAP (2.83 vs 0.64 ng/ml;  $p=0.0082$ ) y hasta 5 veces en los de sujetos sanos (5.84 vs 1.16 ng/ml;  $p=0.0002$ ), pero no alteró los niveles en las células de pacientes con UAP/NSTEMI, lo que demuestra una respuesta diferencial entre los monocitos de ambos grupos de pacientes para la síntesis de MMP-2 cuando son estimulados con IL-4.

Los monocitos de pacientes con UAP/NSTEMI produjeron mayores niveles basales de MMP-9 (6 veces) que los monocitos de pacientes con SAP (190 vs 30.5 ng/ml;  $p<0.0001$ ), aunque similares a los de los sujetos control (Tabla 3). La estimulación con IFN- $\gamma$  (Figura 10 C) indujo un incremento en la producción de MMP-9 tanto en los monocitos de pacientes como de los controles, incrementando 5 veces la concentración de esta

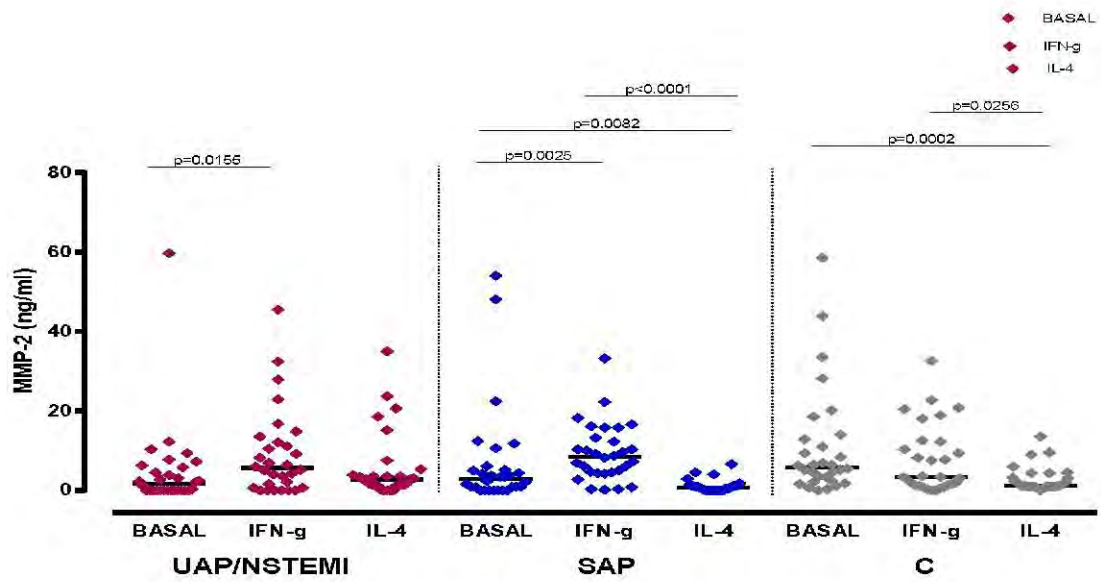
proteasa en los monocitos de los pacientes con UAP/NSTEMI (190 vs 1005 ng/ml,  $p<0.0001$ ), hasta 17 veces en los de pacientes con SAP (30.5 vs 540.65 ng/ml,  $p<0.0001$ ) y aproximadamente 7 veces en las células de los controles (120.15 vs 792.8 ng/ml,  $p<0.0001$ ). A pesar de que los monocitos de pacientes con SAP produjeron menores concentraciones de MMP-9 que los de pacientes con UAP/NSTEMI, éstos resultaron más respondedores a los efectos estimuladores del IFN- $\gamma$  para la síntesis de MMP-9. Interesantemente, la estimulación con IL-4 indujo un incremento de hasta 4 veces la producción basal de MMP-9 en los monocitos de los controles (120.1 vs 518.3 ng/ml,  $p=0.0010$ ), pero no alteró la producción en los monocitos de ambos grupos de pacientes, demostrando una falta de respuesta de los monocitos de pacientes con CAD a la estimulación con IL-4 para la síntesis de MMP-9, a diferencia de los monocitos de sujetos control.

Los datos de la Tabla 3 muestran una mayor capacidad de los monocitos de pacientes con SAP para producir TIMP-1 (aproximadamente 2.5 veces más) en comparación con las células de pacientes con UAP/NSTEMI (982 vs 386 ng/ml,  $p=0.0399$ ) y sujetos control (982 vs 593 ng/ml) aún cuando no se alcanzó diferencia significativa con éste último. La estimulación con IFN- $\gamma$  (Figura 10 D) no modificó la producción de TIMP-1 en los monocitos del grupo control. En contraste, se observó sólo una respuesta al IFN- $\gamma$  de los monocitos de pacientes con CAD para alterar la producción de este inhibidor, promoviendo un abatimiento hasta de 3.5 veces la producción de TIMP-1 en los monocitos de pacientes con UAP/NSTEMI (386 vs 166 ng/ml,  $p=0.0165$ ) y de 5.5 veces en los de pacientes con SAP (982 vs 181 ng/ml,  $p=0.0021$ ), demostrando una mayor respuesta de las células del grupo de pacientes con SAP a los efectos inhibidores del IFN- $\gamma$ . Por último, la estimulación con IL-4 no modificó los niveles basales de TIMP-1 en las células tanto de pacientes como de los sujetos control.

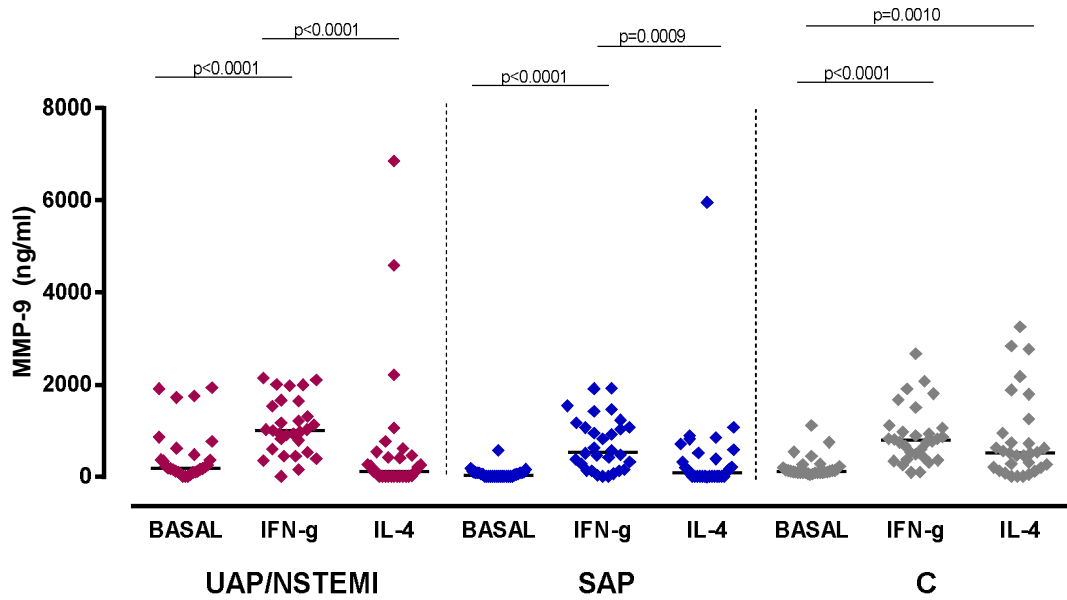
A)



B)



C)



D)

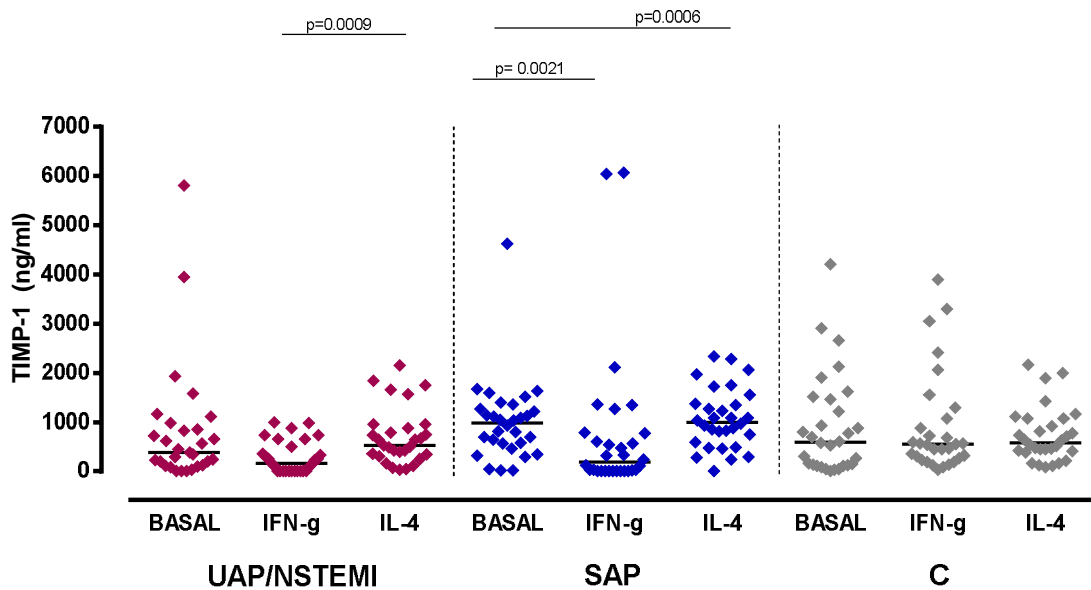


Figura 10. Concentración (medianas (ng/mL) de MMP-1 (A), MMP-2 (B), MMP-9 (C) y TIMP-1 (D) en los sobrenadantes de cultivos de monocitos de pacientes con angina inestable/IAM sin elevación ST (UAP/NSTEMI), angina estable (SAP) y sujetos sanos (C) posterior a su estimulación con IFN- $\gamma$  e IL-4. Cada punto en la gráfica representa a un individuo. Los valores  $p < 0.05$  se consideraron con significancia estadística.



### **DETERMINACIÓN DE LAS PROPORCIONES MMPS/TIMP-1**

La proporción entre las MMP-1, -2 y -9 y el inhibidor endógeno TIMP-1 se calculó a partir de las concentraciones detectadas en los sobrenadantes de todos los cultivos de monocitos no estimulados y estimulados con IFN- $\gamma$  e IL-4. Se tomaron como valores de referencia a la proporción entre las concentraciones basales de las MMPs y TIMP-1 de los cultivos celulares sin estimulación.

La Figura 11 A muestra claramente que los pacientes con UAP/NSTEMI presentaron una proporción basal de MMP-1/TIMP-1 mayor al resto de los grupos de estudio. El desbalance MMP-1/TIMP-1 en los pacientes con UAP/NSTEMI fue de 9 veces mayor que la de pacientes con SAP y 18 veces mayor a los sujetos control (0.36 vs .04 y 0.02), respectivamente). De hecho, en el grupo de controles dicha razón fue muy escasa (0.02), mientras que en el grupo de pacientes con SAP aún cuando fue muy baja el doble a la de los sujetos donadores sanos (0.04 vs 0.02). La estimulación con IFN- $\gamma$  indujo un aumento de la razón MMP-1/TIMP-1 sólo en los grupos de pacientes, mientras que no alteró esta proporción en los sujetos donadores. A saber, el IFN- $\gamma$  incrementó hasta de 7 veces la proporción de MMP-1/TIMP-1 en pacientes con SAP (0.04 vs 0.034) y 1.5 veces la proporción de pacientes con UAP/NSTEMI (0.36 vs 0.66).

La estimulación con IL-4 indujo la disminución de la razón basal MMP-1/TIMP-1 en ambos grupos de pacientes pero no alteró dicha proporción en el grupo control. La IL-4 promovió una reducción hasta 3.5 veces la proporción de MMP-1 y TIMP-1 de los pacientes con UAP/NSTEMI (.036 vs 0.01) y de 40 veces la de los pacientes con SAP (0.04 vs .001).

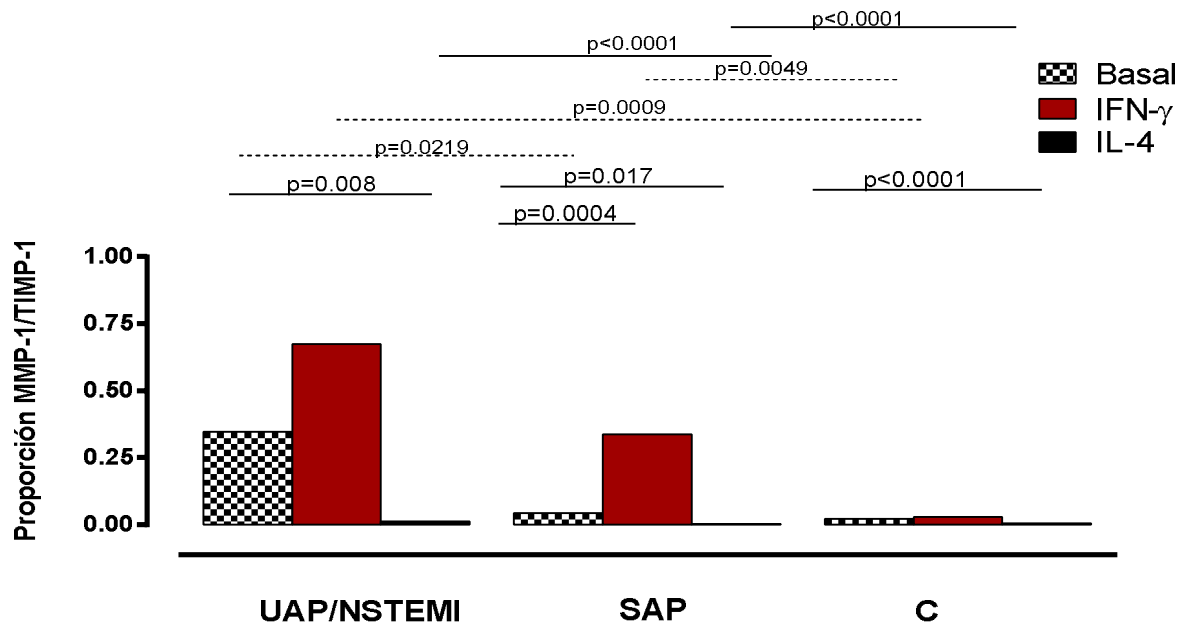
La proporción basal de MMP-2/TIMP-1 (Figura 11 B) resultó mayor en los sujetos control (0.21) que ambos grupos de pacientes (SAP=0.16; UAP/NSTEMI=0.03). Interesantemente, la estimulación con IFN- $\gamma$  abatió 7 veces la proporción basal de MMP-2/TIMP-1 sólo en el grupo control (0.21 vs .03), mientras que incrementó en ambos grupos de pacientes (SAP=0.16 vs .056; UAP/NSTEMI= 0.03 vs 0.34), aumentando 3.5

veces la producción basal en los pacientes con SAP y hasta 11 veces en los pacientes con UAP/NSTEMI.

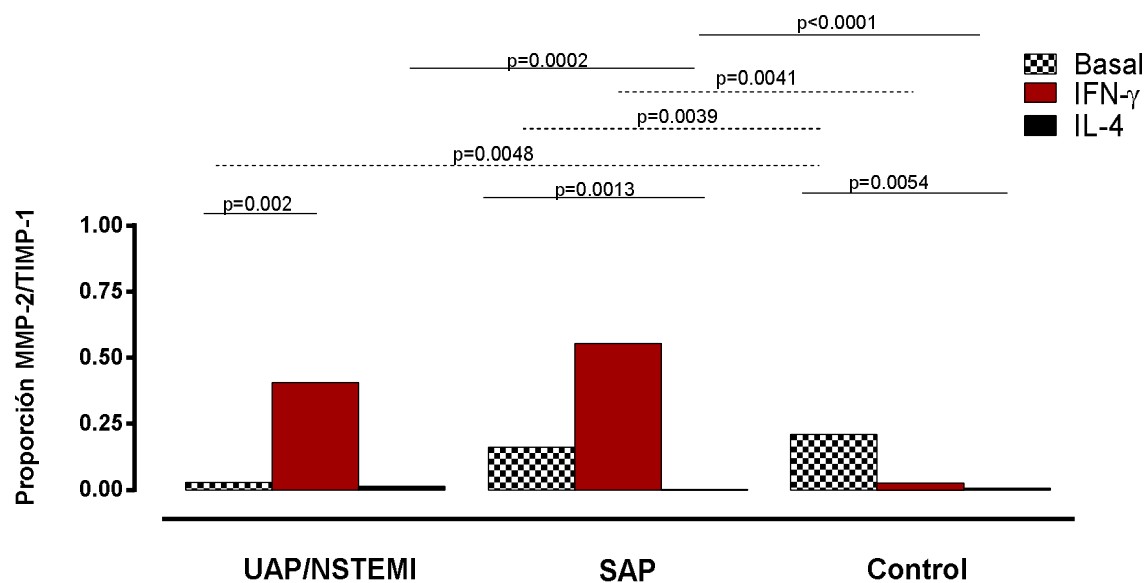
De manera significativa, la estimulación con IL-4 abatió 21 veces el desbalance basal de MMP-2/TIMP-1 en el grupo control (0.21 vs 0.01), hasta 160 veces en el de pacientes con SAP (0.16 vs 0.001). Aunque no alcanzó significancia estadística, la IL-4 abatió hasta 3 veces la proporción de MMP-2/TIMP-1 en los pacientes con UAP/NSTEMI (0.03 vs .01).

En condiciones basales, el grupo de pacientes con UAP/NSTEMI presentó una proporción basal mayor de MMP-9/TIMP-1 que el resto de los grupos (Figura 11 C). La proporción MMP-9/TIMP-1 en el grupo de pacientes con UAP/NSTEMI fue 20 veces mayor que en pacientes con SAP (4.4 vs 0.22) y casi 5 veces mayor que en el grupo de controles (4.4 vs 0.9). La estimulación con IFN- $\gamma$  indujo un incremento en dicha proporción sólo en los pacientes pero no en los controles, aumentando 13 veces en los pacientes con UAP/NSTEMI (4.4 vs 59.3 ) y 214 veces dicha razón en los pacientes con SAP (0.22 vs 47.2). En contraste, la exposición con IL-4 no alteró la proporción MMP-9/TIMP-1 en ninguno de los grupos de estudio.

A)



B)



C)

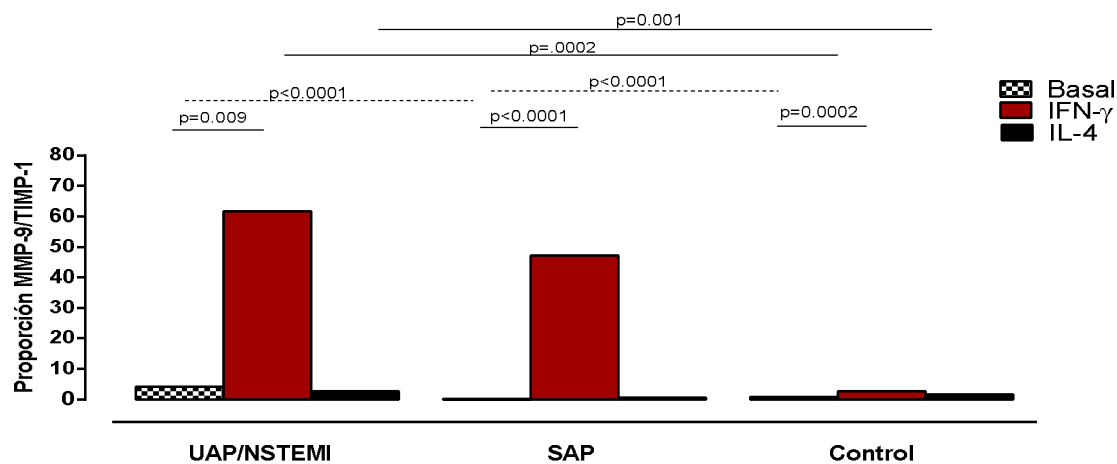


Figura 11. Proporción expresada en unidades relativas entre los niveles de MMP-1/TIMP-1 (A); MMP-2/TIMP-1 (B) y MMP-9/TIMP-1 (C) por los monocitos de pacientes con angina inestable/IAM sin elevación ST (UAP/NSTEMI), angina estable (SAP) y sujetos sanos (C) estimulados con IFN- $\gamma$  e IL-4. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## DISCUSIÓN GENERAL

La destrucción de la MEC es una de las causas más frecuentes de la ruptura de la placa aterosclerótica que conlleva al desarrollo de la mayoría de los SICA <sup>(Virmani et al, 2006)</sup>. El balance entre la síntesis y la degradación de los diferentes componentes de la MEC es regulado por el equilibrio entre las MMPs que favorecen su degradación y sus inhibidores específicos (TIMPs) que regulan sus actividades proteolíticas. De tal suerte que, cualquier alteración en dicho balance debido a estímulos inflamatorios o infecciosos contribuye a la progresión e inestabilidad de la placa aterosclerótica. Por consiguiente, las MMPs tienen la habilidad de promover o prevenir la ruptura del ateroma <sup>(Newby, 2005)</sup>, y qué acción predomine depende del espectro de MMPs que se exprese, de sus niveles de actividad, del estado de desarrollo de la placa aterosclerótica, así como de la proporción que guarden con sus inhibidores específicos <sup>(Newby, 2007)</sup>. Sin embargo, la activación de los mecanismos inflamatorios que subyacen a la desestabilización de la placa ateromatosa en los SICA no está limitada a las lesiones coronarias, sino incluye la estimulación de los leucocitos circulantes <sup>(Mazzone et al, 1993; Jude et al, 1994)</sup>. Amplia evidencia sugiere que los cambios inflamatorios y la activación de los monocitos están involucradas en la fase aguda de CAD <sup>(Azar y Waters, 1996)</sup>, donde los niveles basales elevados de ciertas citocinas aterogénicas (IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  y MCP-1) <sup>(Ross, 1993)</sup>, la expresión de moléculas de adhesión y del factor tisular (FT) entre otros, particularmente en los pacientes con SICA, son indicadores de su estado activado. La activación de los linfocitos T también ha sido detectada en circulación, donde los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> circulantes tienen incrementada la expresión de HLA-DR durante la enfermedad coronaria <sup>(Serneri et al, 1997)</sup>. Enormes esfuerzos de muchos grupos de investigadores se han enfocado a estudiar la presencia e incremento de la actividad de ciertas MMPs en la región vulnerable de la placa <sup>(Galis et al, 1994)</sup>, las concentraciones elevadas de diversas MMPs e inhibidores (MMP-1, MMP-9, TIMP-1) <sup>(Tanindi et al, 2011)</sup> y el desequilibrio de ambas (i.e. MMP-9/TIMP-1) en el suero de

pacientes con CAD (Cheng et al,2008). Recientemente, se ha descrito un desbalance en la expresión de MMPs/TIMPs en los monocitos CD14 en pacientes con etapas avanzadas de CAD (Brunner et al, 2010). A pesar de ello, poco se sabe si los monocitos de pacientes con CAD estable e inestable producen diferente perfil de proteasas y si responden diferencialmente ante el estímulo con diversos tipos de citocinas. Con la finalidad de ampliar estos hallazgos, el presente estudio evaluó la respuesta de los monocitos de pacientes con diferentes manifestaciones de CAD y sujetos donadores sanos a la exposición con estímulos pro- y anti-inflamatorios sobre la producción de MMPs y TIMPs, así como los efectos en su proporción. A pesar de que los mecanismos de desestabilización son principalmente atribuidos a los procesos llevados a cabo dentro de la placa, también los monocitos circulantes son capaces de generar y secretar mediadores inflamatorios, degradación de la matriz y factores trombogénicos que pudieran influir en la condición inestable del ateroma.

Nuestros datos indican que en condiciones basales, aún cuando produjeron el mismo perfil, los monocitos obtenidos de pacientes con diferentes manifestaciones de CAD y los de donadores sanos presentaron una producción diferencial de MMP-1, MMP-2, MMP-9 y TIMP-1. Así mismo, se describe una respuesta diferencial a la estimulación con IFN- $\gamma$  e IL-4 entre los monocitos de pacientes y los individuos control, que promovió alteraciones en la síntesis y en las proporciones basales exhibidas entre las MMPs y su inhibidor TIMP-1.

El hecho que los monocitos de los controles sanos produjeran mayores niveles de MMP-2 que los monocitos de pacientes con CAD; que las células de pacientes con UAP/NSTEMI fueran mayores productores de MMP-9 en comparación con las de pacientes con SAP; mientras que los monocitos de este último grupo produjeran niveles más elevados de TIMP-1 que los de los controles y los pacientes con UAP/NSTEMI, sugiere que los monocitos que sintetizan mayores niveles de MMP-2 y de TIMP-1, pero menores

concentraciones de MMP-9, están mayormente asociados con una condición estable de la placa aterosclerótica, mientras que los monocitos productores de concentraciones más elevadas de MMP-9 pero menores de MMP-2 y TIMP-1 se asocian más con su condición inestable. Estas observaciones se correlacionan con reportes previos que describen una asociación entre los niveles elevados de MMP-9 en suero con placas vulnerables, así como con CAD severa y más extensiva (Inoue et al, 2003; Kai et al, 1998; Fiotti et al, 2009; Elmas et al, 2007; Furenes et al, 2009; Ding et al, 2006; Derosa et al, 2007; Fukuda et al, 2006; Brunner et al, 2010; Nanni et al, 2007; Zeng et al, 2005; Gresele et al, 2010; Yasuda et al, 2007; Tziakas et al, 2004; Alsheikh-Ali et al, 2010; Sluijter et al, 2006; Hwang et al, 2009; Tanindi et al, 2011), lo que sugiere que el incremento en la concentración sérica de MMP-9 que se detecta durante la enfermedad coronaria está en parte determinada por los niveles secretados por los monocitos. A pesar de que estos estudios también asocian los niveles elevados de MMP-1 con una condición inestable de la placa, la similitud que se observó en la producción de esta enzima entre los monocitos de pacientes y controles indicó no estar correlacionada con dicha condición.

A pesar de que diversas MMPs solubles son ahora consideradas como biomarcadores potenciales de la ruptura de la placa y riesgo de SICA, especialmente MMP1 y MMP-9 (Liu et al, 2006; Lehrke et al, 2009; Sukhova et al, 1999), ciertas MMPs como la MMP-2 pueden participar en la estabilidad de la placa (Fabunmi et al, 1998). A diferencia de otros estudios que describen elevadas concentraciones séricas de MMP-2 en pacientes con CAD (Kai et al, 1998) nuestros datos las correlacionan con una mayor estabilidad de la placa, similarmente a aquellos que asocian estos incrementos con el engrosamiento de la capa fibrosa y con la vasculatura normal (Dollery y Libby, 2006), y de otros autores que reportan disminución de MMP-2 en pacientes con CAD prematura (Nanni et al, 2007). Por otro lado, mientras que algunos autores han asociado una elevación de TIMP-1 con la vulnerabilidad de la placa (Inokubo et al, 2001; Cavusoglu et al, 2006; Lubos et al, 2006; Hirohata et al, 1997), nuestros datos, junto con otros previamente reportados, sugieren su participación en la estabilidad del ateroma (Tayebjee et al, 2005; Orbe et al, 2003). De manera similar al estudio ARIC (1989), no encontramos asociación entre los niveles de MMP-1 y TIMP-1 y CAD. Interesantemente, las células de SAP y los de

sujetos control mostraron un comportamiento similar, produciendo niveles basales elevados de MMP-2 y TIMP-1.

Debido a que los resultados tanto en humanos como en animales sobre la asociación de las MMPs y TIMPs con CAD no han sido concluyentes, las proporciones entre ellas parecen ser más importantes para determinar la contribución de estos marcadores a los mecanismos que subyacen a la desestabilización de la placa ateromatosa. Bajo esta premisa, se observó que el desequilibrio basal de MMP-1/TIMP-1 y MMP-9/TIMP-1 fue mayor en los pacientes con CAD, particularmente en pacientes con UAP/NSTEMI, en comparación con las observadas en los sujetos control. Interesantemente, la proporción de MMP-2/TIMP-1 fue lo inverso al resto de las proporciones, donde su mayor desbalance se encontró en el grupo control y el menor en los pacientes con UAP/NSTEMI. En particular, el desbalance de MMP-9/TIMP-1 que se observó en el grupo de pacientes con UAP/NSTEMI correlaciona con las observaciones descritas previamente por Brunner y cols, quienes reportan también un desbalance significativo de MMP-9/TIMP-1 no sólo en el suero de estos pacientes, sino también en los monocitos CD14 cultivados de pacientes con etapas avanzadas de CAD (Brunner et al, 2010).

Por ahora se conoce que la capacidad para sintetizar diferentes concentraciones de MMPs y TIMPs entre los monocitos de pacientes y controles está asociada con las alteraciones en ciertos marcadores inflamatorios sistémicos que se describen entre las diferentes etapas de CAD en comparación con los niveles caracterizados en condiciones normales (Haverkate et al, 1997; Heeschen et al, 2000; Verheggen et al, 1999; Morrow et al, 2000; Mazzone et al, 1993; Biasucci et al, 1995; Shah, 2001). Bajo esta premisa, el estatus inflamatorio sistémico de un paciente con enfermedad aterosclerótica resulta crucial para determinar o alterar las capacidades funcionales de los monocitos. Previamente se ha descrito que los niveles incrementados de MMP-9 en circulación se han asociado directamente con las concentraciones de PCR, IL-6 y fibrinógeno (Ferroni et al, 2003). A este respecto, los niveles más elevados de PCR, IFN- $\gamma$ ,

IL-1ra, MIP-1 $\alpha$  e IP-10 que se encontraron en los sueros se asociaron con los niveles más altos de MMP-9 sintetizados por las células de los pacientes con UAP/NSTEMI, mientras que los niveles menores de estas proteínas con mayores niveles de MMP-2 y TIMP-1 producidos por los monocitos de los pacientes con SAP y controles. Ciertos investigadores han reportado niveles bajos de IL-10 en pacientes con SICA comparados con aquellos con SAP y sujetos control <sup>(Pasqui et al, 2005; Tziakas et al, 2003)</sup>, sugiriendo que niveles reducidos de esta citocina puede favorecer la inestabilidad de la placa <sup>(Rajappa et al, 2009)</sup>. De igual manera, aún cuando no encontramos diferencias significativas en los niveles de IL-10 entre pacientes y controles, las concentraciones más bajas se observaron en los sueros de UAP/NSTEMI. En congruencia con nuestros resultados, a pesar que diversas investigaciones no han encontrado diferencias de esta citocina entre pacientes con SAP e individuos sanos, se ha propuesto que la proporción TNF- $\alpha$ /IL-10; IL-6/IL-10 e IL-8/IL-10 está incrementado en pacientes con SICA <sup>(Alam et al, 2004, Rajappa et al, 2009)</sup>. Además, las concentraciones mayores de IL-10 detectados en los sueros de pacientes con SAP y controles correlacionaron mayormente con los niveles más elevados de MMP-2 como se ha descrito anteriormente por algunos autores <sup>(Lee et al, 1999; Biasucci et al, 1999; Heeschen et al, 2000)</sup>. Desde hace varias décadas, Wang y su equipo (1995), describieron que la IL-10 inhibe el factor nuclear NF- $\kappa$ B en los monocitos humanos, mientras que Metz y col. (1994) han reportado que esta citocina anti-inflamatoria suprime la producción de MMPs mediante un mecanismo dependiente de prostaglandinas <sup>(Methe et al, 1994)</sup>.

Los monocitos son considerados como células con gran plasticidad y adaptabilidad al ambiente local. De manera que, la adquisición de diferentes capacidades no sólo de adhesión, migratorias o fagocíticas, sino también para la síntesis de MMPs y TIMPs, está relacionada a cambios funcionales inducidos cuando los monocitos son expuestos a diferentes perfiles de citocinas, diferentes concentraciones o bien a la combinación de éstas en circulación <sup>(Zhou et al, 2003; Zhang et al, 1998; Opednakker et al, 2001; Saren et al, 1996)</sup>. A este respecto,



la activación de los monocitos puede ser mediada por varios mecanismos, incluyendo la liberación de IFN- $\gamma$  por los linfocitos T activados. Por ahora se ha identificado una subpoblación inusual de células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> en pacientes con SICA pero no en pacientes con SAP, con gran capacidad para producir IFN- $\gamma$  como consecuencia de una larga exposición antigénica (Liuzzo et al, 1999). De manera que es concebible que la producción basal diferencial de MMPs y TIMP-1 observada entre los monocitos de ambos grupos de pacientes y los de sujetos control, haya sido causado por el distinto microambiente de citocinas a las que estuvieron expuestas estando todavía en circulación, considerando que los niveles de citocinas pro-inflamatorias (i.e. IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6), particularmente los del IFN- $\gamma$ , están más elevados en pacientes con UAP/NSTEMI comparados con la enfermedad aterosclerótica estable y condiciones normales como se ha descrito ampliamente por múltiples autores (Haverkate et al, 1997; Heeschen et al, 2000; Verheggen et al, 1999; Morrow et al, 2000; Mazzone et al, 1993; Biasucci et al, 1995; Simiti et al, 1998; Nishiyama et al, 1998; Shah, 2000). En virtud de que la estimulación con IFN- $\gamma$  alteró la síntesis de MMP-9 en todos los grupos de estudio pero únicamente la producción de MMP-1 y MMP-2 en los monocitos de pacientes, sugiere un cambio evidente en la respuesta de las células de estos últimos, posiblemente como consecuencia a la exposición previa a los niveles elevados de IFN- $\gamma$  circulantes.

La estimulación con IL-4 modificó la producción basal de MMP-1, MMP-2 y MMP-9 por monocitos de los controles, mientras que alteró la producción de MMP-1 y MMP-2 en los monocitos de pacientes con SAP y únicamente la producción de MMP-1 en los de pacientes con UAP/NSTEMI. Comparando con los monocitos de sujetos sanos, esto último demuestra una mayor sensibilidad al IFN- $\gamma$ , así como una falta de respuesta a los efectos de la IL-4 de los monocitos de pacientes con CAD, posiblemente como consecuencia de un estado "pre-activado" adquirido en circulación que les confirió una mayor capacidad de respuesta al estímulo adicional con IFN- $\gamma$ .

Como se esperaba, el comportamiento de los monocitos estimulados con IFN- $\gamma$  o IL-4 de

pacientes con CAD estable y pacientes con SICA fue similar, por lo que las diferencias observadas radicarón en el grado de respuesta que condujo a una producción diferencial de estas proteasas y TIMP-1. Particularmente los monocitos de pacientes con SAP, las cuales resultaron mayormente respondedoras al IFN- $\gamma$ , indujeron alteraciones más acentuadas sobre la síntesis de MMP-2 y de MMP-9, así como un mayor abatimiento en la producción de TIMP-1. De igual manera, aún cuando los monocitos de ambos tipos de pacientes no modificaron la producción de MMP-9 ni de TIMP-1, disminuyeron la síntesis de MMP-1 al estimularlos con IL-4, los monocitos de pacientes con SAP también resultaron mayormente respondedoras a dicha estimulación promoviendo mayor abatimiento en la síntesis de MMP-2 que las células de UAP/NSTEMI.

Aún cuando algunos investigadores reportan que el IFN- $\gamma$  inhibe la producción de MMP-1 y MMP-9 por los monocitos <sup>(Lacraz et al, 1992; Mach et al, 1997; Zhou et al, 2003; Castrillo et al, 2003; Shapiro et al, 1990; Saren et al, 1996)</sup> de manera similar a la IL-4 <sup>(Concoran et al, 1992; Lacraz et al, 1992)</sup>, nuestros datos describen un efecto distinto entre ambas citocinas. Mientras que la estimulación con IFN- $\gamma$  no alteró la síntesis de MMP-1 en ninguno de los grupos de estudio, la IL-4 abatió significativamente su síntesis en todos. Además, el IFN- $\gamma$  incrementó significativamente la producción de MMP-9 tanto en el grupo de pacientes como en el de los controles. Más aún, los monocitos de pacientes con CAD estimulados con IFN- $\gamma$  inhibió la producción de TIMP-1, mientras que la IL-4 no lo modificó.

Debido a que los monocitos de los pacientes y controles no se mostraron respondedores al IFN- $\gamma$  para la síntesis de MMP-1, es probable que para su producción sean necesarias otras dosis o la combinación con otras citocinas como han sugerido Shou y sus cols. (2003). A pesar que ellos también reportan la misma condición para la síntesis de MMP-9 <sup>(Shou et al, 2003)</sup>, nuestros datos demuestran una clara respuesta de las células tanto de pacientes como de los controles al estímulo con IFN- $\gamma$  para alterar su producción. Similarmente, debido a que los monocitos de los sujetos sanos no respondieron a la

estimulación con ambas citocinas para alterar la síntesis de TIMP-1, también es probable la presencia de niveles más elevados de MMPs, de otras citocinas como la IL-10 (Noki et al, 2003) o de ciertos mediadores inflamatorios como las oxLDLs (Newby, 2008) para inducir o alterar su síntesis.

Por otro lado, mientras que la exposición al IFN- $\gamma$  de los monocitos de pacientes con CAD modificó la producción basal MMP-2, MMP-9 y TIMP-1, la IL-4 alteró negativamente la producción de MMP-1 y MMP-2 en los monocitos de pacientes con SAP y únicamente la producción de MMP-1 en los de pacientes con UAP/NSTEMI. Estos datos evidencian la falta de respuesta de los monocitos con CAD a los efectos de la IL-4 para la síntesis de MMP-9. Ello indica que los monocitos de pacientes con CAD resultan mayormente respondedores al IFN- $\gamma$ , alterando no sólo la producción de MMP-9, sino de MMP-2 e importantemente de TIMP-1. Estos resultados demuestran una clara diferencia entre los monocitos de pacientes con CAD y monocitos normales. En virtud de que los monocitos de pacientes hayan sido más respondedores a la estimulación con IFN- $\gamma$ , sigue un estado pre-activado o sensibilizado de estas células como consecuencia a la exposición de niveles incrementados de IFN- $\gamma$  que caracterizan a las diferentes etapas de CAD.

Varios autores reportan que tanto el IFN- $\gamma$  como la IL-4 inhiben la síntesis de MMP-1 y MMP-9 por los monocitos (Lacraz et al, 1992; Mach et al, 1997; Zhou et al, 2003; Castrillo et al, 2003; Shapiro et al, 1990; Saren et al, 1996, Tanindi et al, 2011) y por macrófagos alveolares en humanos (Concoran et al, 1992; Lacraz et al, 1992). Contrariamente, nuestros resultados mostraron que los monocitos normales no modificaron la producción de MMP-1 en respuesta al IFN- $\gamma$  pero fue inhibida por la IL-4, además de que dichas células incrementaron la síntesis de MMP-9 con ambas citocinas. Resultados de diversos estudios clínicos son inconsistentes con respecto a la síntesis de MMP-9. Se ha reportado que una serie de factores (i.e. MCP-1, IL-1 $\beta$ , PGE-2) puede inducir la producción de MMP-9 por los monocitos (Stuve et al, 1997; Lafreinie et al, 1997), mientras que es negativamente regulado por la IL-4. Otros autores fundamentan que los

macrófagos estimulados con ambas citocinas inhiben la producción de MMP-9 (Opdenakker et al, 2001; Corcoran et al, 1992)

A pesar de que la estimulación con IFN- $\gamma$  incrementó la proporción de todas las MMPs/TIMP-1 en los pacientes con CAD como una probable consecuencia del abatimiento en la síntesis de TIMP-1, las proporciones de MMP-1/TIMP-1 y MMP-2/TIMP-1 resultaron  $<1$ , y sólo el incremento en el desbalance de MMP-9/TIMP-1 ( $<1$ ) fue de relevancia para términos de la desestabilización de la placa aterosclerótica. A nuestro conocimiento, la proporción MMP-9/TIMP-1 es la única que hasta ahora ha sido significativa en el estudio de los mecanismos desestabilizadores en la angina inestable. Debido a que los monocitos de pacientes con CAD muestran un mismo patrón de desequilibrio entre MMP-9 y TIMP-1 como se ha descrito para los macrófagos de la placa, ello pudiera fundamentar la idea que la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria sistémica (Brunner et al, 2010), y sugiere que los monocitos son previamente activados de manera diferencial en circulación. Por lo anterior, debido a que la aterosclerosis es un padecimiento crónico, difuso y multisistémico que involucra a los sistemas vascular, metabólico e inmunológico con diversas manifestaciones locales y sistémicas, las células sanguíneas circulantes, particularmente los monocitos, resultan buena fuente de información para analizar los mecanismos inflamatorios sistémicos en la aterosclerosis. Los monocitos pueden ser activados por una variedad de estímulos, y el más potente es el IFN- $\gamma$  que induce su máxima capacidad fagocítica, invasiva y secretora (Arai et al, 1990). A este respecto, se ha demostrado que el repertorio de células T en pacientes con angina inestable está alterado, mediante la sobreexpresión de células T CD4+ CD28<sup>null</sup>, mismas que son muy poco frecuentes en la angina estable y en sujetos sanos. Estos linfocitos producen exceso de IFN- $\gamma$  cuando son estimulados y presentan la tendencia de abandonar más fácilmente la circulación para migrar a los tejidos (Luizzo et al, 1999). Ellos sugieren que los pacientes con UAP/NSTEMI tienen monocitos pre-activados o sensibilizados por el IFN- $\gamma$ , asociado a la presencia de complejos STAT-1 en el núcleo y a un aumento en la expresión

de CD64 e IP-10 cuyos genes son inducibles por esta citocina pro-inflamatoria. A este respecto se ha visto que la exposición de los monocitos/macrófagos al IFN- $\gamma$  durante la cronicidad de CAD induce una mayor capacidad de respuesta cuando son expuestos a estimulaciones posteriores. De manera que la correlación entre la presencia de células T productoras de IFN- $\gamma$  y la activación de los monocitos/macrófagos apunta hacia una desregulación inmunológica como un mecanismo primario en el desarrollo de CAD. Posteriormente, este mismo grupo ha reportado una respuesta incrementada a la estimulación con LPS para la síntesis de IL-6 de los monocitos de pacientes con UAP con elevados niveles de PCR, mientras que otros autores han descrito una variabilidad de respuesta para la producción de citocinas por monocitos tras estimularlos con endotoxinas, así como una variabilidad de respuestas inflamatorias contra las oxLDLs (Chapoval et al, 1998; Kamdar et al, 1997). Ambos estudios sugieren que los monocitos de pacientes con UAP/NSTEMI al estar expuestos a niveles elevados de PCR e IL-6 muestran una mayor respuesta para producir más citocinas y ROS en respuesta a estímulos subumbrales, donde el IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y M-CSF predisponen las funciones de dicha células.

Por otro lado, considerando que la producción de IL-1ra aumenta bajo las mismas condiciones inflamatorias que estimulan la IL-1 (Dinarello y Pomerants, 2001; Nijm et al, 2005), los niveles más elevados de IL-1ra fueron detectados en los grupos de pacientes con CAD, mayores en pacientes con UAP/NSTEMI, tal como lo han descrito estudios previos (Patti et al, 2002; Biasucci et al, 1999), mientras que los monocitos de sujetos sanos no alteraron la producción de IL-1ra ante ambos tipos de estimulación. Tanto los niveles séricos como la producción basal y bajo estimulación, los monocitos de pacientes muestran también un comportamiento y síntesis diferencial de IL-1ra.

Por ahora se sabe que la inflamación sistémica puede variar en respuesta a infecciones y a otros estímulos pro-inflamatorios y que estos cambios intermitentes pueden estar asociados con un mayor riesgo para desarrollar eventos coronarios agudos.

Tras la estimulación con IFN- $\gamma$ , a pesar de que los monocitos de pacientes con UAP/NSTEMI fueron los mayores productores de MMP-9, los monocitos de pacientes con SAP mostraron una mayor respuesta. Nuestros resultados indican que los monocitos de pacientes con SAP están pre-activados y pueden desarrollar un fenotipo funcional que puede disparar la inestabilidad de la placa mediante un incremento en el desbalance MMP-9/TIMP-1 cuando son estimulados con IFN- $\gamma$ , una típica citocina inflamatoria que se produce en elevadas concentraciones durante la infección, especialmente durante las infecciones virales como la influenza. Por lo tanto, los mediadores derivados de los procesos inmuno-inflamatorios no relacionados con el proceso aterosclerótico, pudieran también influir en la condición estable o vulnerable de las placas ateroscleróticas. A este respecto, nuestros datos pudieran ayudar a explicar la asociación entre las infecciones agudas y el desarrollo de SICA (consultar artículo anexo "Interferon-gamma increases the ratio of matrix metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in peripheral monocyte from patients with coronary artery disease". (Springall R y Amezcua-Guerra LM et al, 2013).

En congruencia con investigaciones previas (Brunner et al, 2010), nuestros resultados indican que las concentraciones elevadas de MMP-9 en el suero de pacientes con SICA pueden resultar no sólo de su liberación a la circulación al momento de la ruptura de la placa, sino que puede ser un reflejo de una respuesta inflamatoria sistémica con la secreción adicional de los monocitos circulantes. De tal suerte que el desbalance entre la MMP-9 y su inhibidor TIMP-1 observado en los monocitos de pacientes con SICA pudiera ser el resultado de un microambiente alterado de citocinas pro y anti-inflamatorias en los estados avanzados de CAD. El incremento de linfocitos T vírgenes hacia un fenotipo Th1, con niveles elevados en la expresión de IFN- $\gamma$  (Methe et al, 2005), junto con la presencia de linfocitos TCD4<sup>+</sup>CD8<sup>null</sup> productores de grandes cantidades de IFN- $\gamma$  descritas en pacientes con SICA, parecen alterar la síntesis de MMP-9 por los monocitos CD14<sup>+</sup>, mientras que los niveles bajos de IL-10 en estos pacientes parecen atenuar la expresión y síntesis de TIMP-1 (Oliveira et al, 2009).

Por tanto, los monocitos pertenecientes a diferentes manifestaciones de CAD, que difieren en las concentraciones séricas de diversos mediadores de inflamación como la PCR y de citocinas (Haverkate et al, 1997; Heeschen et al, 2000; Verheggen et al, 1999; Morrow et al, 2000; Mazzone et al, 1993; Biasucci et al, 1999; Simiti et al, 1998; Nishiyama et al, 1998; Shah, 2000), pueden tener distinta participación en la vulnerabilidad de la placa mediante la producción diferencial de MMPs e inhibidores. Aún cuando la presencia de diversos factores presentes en la pared arterial lesionada inducen su diferenciación hacia macrófagos, los monocitos estando todavía en circulación, pueden inicialmente sufrir cambios en su comportamiento (plasticidad) o adquirir fenotipos funcionalmente distintos (heterogeneidad) que definen las respuestas inmuno-inflamatorias en el sitio de la lesión, contribuyendo en última instancia a la condición estable o inestable de la placa ateromatosa.

Los monocitos parecen estar activamente involucrados en las etapas claves de los SICA, participando en los procesos que subyacen a la condición estable o inestable de la placa aterosclerótica. Por tanto, son necesarios estudios futuros que ayuden a entender el papel de los monocitos no sólo en los SICA, sino su comportamiento en la enfermedad coronaria estable. Tornando la vulnerabilidad de la placa hacia una condición estable es una consideración terapéutica atractiva que pudiera requerir de una reprogramación del sistema inmune desde un estado inflamatorio (i.e. degradación de la colágena, acumulación acelerada de células inflamatorias) hacia un estado regulador sobre la síntesis de colágena, reducción de la acumulación de células inflamatorias o movilización de células que promuevan la resolución de la inflamación y por tanto, la estabilidad de la placa aterosclerótica.

## CONCLUSIONES

- Los monocitos de pacientes con diferentes manifestaciones de CAD y de sujetos donadores sanos exhiben una producción basal diferencial de MMPs y TIMP-1.
- Los niveles elevados de MMPs y TIMPs circulantes que se describen en los pacientes con CAD no se deben únicamente a los liberados por las placas vulnerables, sino también como resultado de su producción por los monocitos activados.
- Los niveles basales más elevados de MMP-9 se correlacionan mayormente con la inestabilidad de la placa, mientras que las concentraciones mayores de MMP-2 y TIMP-1 con su estabilidad.
- La producción basal elevada de MMP-9 por los monocitos de pacientes con SICA se correlaciona con los niveles séricos elevados de PCR, IFN- $\gamma$ , IL-1ra, MIP-1 $\alpha$  e IP-10.
- Los pacientes con SICA exhiben un desequilibrio mayor en la proporción basal de MMP-9/TIMP-1, mientras que los pacientes con SAP muestran un comportamiento similar a los sujetos donadores sanos.
- La respuesta diferencial a la estimulación con IFN- $\gamma$  sobre la síntesis de MMPs y TIMP-1 evidencia un estado funcional alterado (mayor sensibilidad) de los monocitos de pacientes con CAD que los hace mayormente repondedores a la exposición de concentraciones adicionales de IFN- $\gamma$ .
- El incremento de la proporción MMP-9/TIMP-1 por los monocitos de pacientes con CAD estimulados con IFN- $\gamma$  se debe a una inhibición significativa en la síntesis de TIMP-1.



- La estimulación con IFN- $\gamma$  induce un drástico desbalance en la proporción de MMP-9/TIMP-1 en pacientes con SAP similar a la que exhiben los pacientes con SICA.
- La proporción MMP-9/TIMP-1 podría servir como un biomarcador útil de la vulnerabilidad de la placa.

## **IMPLICACIÓN CLINICA**

Debido a que la producción de IFN- $\gamma$  es inducida durante la infección aguda, regula la producción de MMPs y TIMPs e induce un incremento en el desbalance de MMP-9/TIMP-1, la sensibilidad exacerbada de los monocitos de los pacientes con CAD estable a la estimulación con IFN- $\gamma$  pudiera explicar la asociación entre las infecciones respiratorias agudas y el desarrollo de los SICA.

## **APENDICE I**

### **ARTÍCULO CENTRAL DE LA TESIS**

# Interferon-Gamma Increases the Ratio of Matrix Metalloproteinase-9/Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in Peripheral Monocytes from Patients with Coronary Artery Disease

Rashidi Springall<sup>1\*</sup>, Luis M. Amezcua-Guerra<sup>1\*</sup>, Hector Gonzalez-Pacheco<sup>2</sup>, Janette Furuzawa-Carballeda<sup>3</sup>, Lorena Gomez-Garcia<sup>1</sup>, Ricardo Marquez-Velasco<sup>1</sup>, Ana Maria Mejia-Dominguez<sup>4</sup>, Jorge Cossio-Aranda<sup>5</sup>, Carlos Martínez-Sánchez<sup>2</sup>, Rafael Bojalil<sup>1,6\*</sup>

**1** Department of Immunology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio, Chávez, Mexico City, Mexico, **2** Coronary Care Unit, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio, Chávez, Mexico City, Mexico, **3** Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico, **4** Blood Bank Unit, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio, Chávez, Mexico City, Mexico, **5** Cardiology Outpatient Clinic, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio, Chávez, Mexico City, Mexico, **6** Department of Health Care, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Mexico City, Mexico

## Abstract

Acute coronary syndromes (ACS) may be triggered by acute infections. Systemic production of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) is induced during infection and regulates the production of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs), both important in plaque stability. This study evaluates the effect of IFN- $\gamma$  on the MMPs/TIMP-1 ratio in cultured monocytes from 30 patients with stable coronary artery disease (CAD), 30 with unstable angina (UA) or non-ST-segment elevation myocardial infarction (NSTEMI), and 30 healthy blood donors. Supernatant concentrations of MMP-1, -2, -9, and TIMP-1 were measured by enzyme-linked immunoassays. Basal concentration of MMP-1 and TIMP-1 was similar between groups, while MMP-2 was higher in healthy individuals and MMP-9 in patients with UA/NSTEMI. Upon IFN- $\gamma$  stimulation, MMP-9 secretion increased in all groups, while TIMP-1 decreased only in patients with CAD, which in turn result in a strikingly elevation in their mean MMP-9/TIMP-1 ratio. MMP-1/TIMP-1 and MMP-2/TIMP-1 ratios were <1.0 in basal conditions and after stimulation in all groups. Our results suggest that nonstimulated monocytes from patients with stable CAD show a similar behavior than those from healthy individuals. However, stimulation with IFN- $\gamma$  induces an increase on the MMP-9/TIMP-1 ratio as high as that found in patients with ACS. Thus, it may bring biological plausibility to the association between acute infections and the development of ACS.

**Citation:** Springall R, Amezcua-Guerra LM, Gonzalez-Pacheco H, Furuzawa-Carballeda J, Gomez-Garcia L, et al. (2013) Interferon-Gamma Increases the Ratio of Matrix Metalloproteinase-9/Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in Peripheral Monocytes from Patients with Coronary Artery Disease. PLoS ONE 8(8): e72291. doi:10.1371/journal.pone.0072291

**Editor:** Paul G. Thomas, St. Jude Children's Research Hospital, United States of America

**Received:** April 26, 2013; **Accepted:** July 14, 2013; **Published:** August 12, 2013

**Copyright:** © 2013 Springall et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** RS is in the Biomedical Research PhD Program at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and was recipient of a CONACyT scholarship. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: bojraf@yahoo.com

© These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Atherosclerotic coronary artery disease (CAD) is the leading cause of death and a main source of morbidity worldwide [1,2]. Nowadays, it is clear that inflammation is important in CAD, in which circulating monocytes and tissue-invading macrophages play a role in the maintenance of plaque's homeostasis [3]. Nonetheless, transition from plaque stability to instability is barely understood. In support to the existence of immune-

based mechanisms, growing evidence suggests that acute coronary syndromes (ACS) could be triggered by infection [4]. The original interest in chronic bacterial infections as precipitants of myocardial infarction (MI) and stroke has been moving forward to acute respiratory infections with an emphasis on influenza viruses. Indeed, several epidemiological studies support a temporal association between acute respiratory virus infections and the development of ACS. After

adjustment for potential environmental confounding factors [5–7].

Apart from the ecological evidence linking acute respiratory infections with ACS, mechanisms underlying this association are unclear. The currently favored mechanism points toward that acute infection may trigger plaque instability and rupture through a systemic response to inflammatory stimuli [8]. In this vein, infection by influenza induces the systemic production of inflammatory cytokines, especially interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) which is a main regulator of the production of tissue matrix metalloproteinases (MMPs) and their endogenous inhibitors (TIMPs) by inflammatory cells such as circulating monocytes and infiltrating macrophages [9]. MMPs belong to a large family of zinc-dependent endopeptidases referred to numerically from 1 through 28; collectively, MMPs are capable of degrading all the extracellular matrix components of the fibrous cap that separates the necrotic core of the atherosclerotic lesion from blood flow in the arterial lumen [10]. Among this family of related proteases, MMP-1 (also called interstitial collagenase), MMP-2 (gelatinase-A), and MMP-9 (gelatinase-B) have been consistently described as significant contributors in several cardiovascular diseases including atherosclerosis, hypertension, CAD, and ACS [10]. In this regard, balance between synthesis and degradation of extracellular matrix components is crucial for the stability or vulnerability of atherosclerotic plaques [11]. Depending on the width, composition, and integrity of their fibrous cap, stable plaques may result in the development of stable CAD while vulnerable plaques may become disrupted, which in turn results in the development of ACS. Given their central role in tissue remodeling and inflammation, the effect of MMPs inhibition in the reduction of inflammation and the prevention of ACS is under study [10].

In patients with stable CAD, circulating leukocytes do not have increased expression of MMP-9 or TIMP-1 but an imbalance of the MMP-9/TIMP-1 ratio has been recently demonstrated in unstimulated monocytes from patients with ACS [12]. However, whether stimulation with IFN- $\gamma$  actually induces an imbalance in the MMP/TIMP ratios in circulating monocytes from patients with stable CAD or ACS has not been elucidated.

The present study was aimed to evaluate the effect of IFN- $\gamma$  on the secretion of MMP-1, MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 as well as on the MMPs/TIMP-1 ratio, in cultured monocytes from patients with either stable CAD or ACS.

## Material and Methods

### Ethics statement

The study protocol was approved by the Research and Bioethics Commissions of the Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. All participants provided a written informed consent, also approved by the Bioethics Commission. All procedures were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and local regulations.

### Study Population

This study was conducted in consecutive patients admitted to the Coronary Care Unit with diagnosis of unstable angina (UA) or non-ST-segment elevation MI (NSTEMI), in age- and gender-matched patients with an established diagnosis of stable CAD recruited from the Cardiology Outpatient Clinic, and in healthy blood donors.

Patients with a diagnosis of ACS were identified and classified based on clinical characteristics, electrocardiographic changes, and biochemical markers of cardiac necrosis (MB isoenzyme of creatine kinase or T-troponin) according to the definitions proposed by the American College of Cardiology [13]. Briefly, NSTEMI was defined as an ACS in which there is cardiac marker evidence of myocardial necrosis without new ST-segment elevation. UA was defined as angina pectoris (or equivalent type of ischemic discomfort) with any of the 3 following features: (a) angina occurring at rest and prolonged, usually greater than 20 minutes; (b) new-onset angina; (c) recent acceleration of angina reflected by an increase in its severity. Stable CAD was defined as  $\geq 6$  months history of chest/arm discomfort reproducible with physical exertion or stress, or  $> 1$  mm ST-segment depression on the exercise test electrocardiogram.

Patients with chronic inflammatory disease such as rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus, recent MI or stroke (within the last 6 months), concurrent serious infection or trauma, atrial fibrillation, malignancy, end-stage renal or liver disease, or surgery (including catheterization) were not included.

### Laboratory assessments

For patients with UA/NSTEMI, blood samples were obtained at the time of admission to the Coronary Care Unit, while for those with stable CAD these were collected in their programmed medical consultation. In healthy individuals, samples were collected at the time of blood donation.

Five mL of peripheral blood were centrifuged (600 g for 15 min at 4° C), and sera were stored in aliquots at -75° C until use. Additionally, 5 mL of peripheral blood were centrifuged at 151 g during 30 min with Hystopaque-1077 (Sigma Aldrich, St Louis MO, USA), and the interface band of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was collected. Leukocytes were incubated in RPMI-1640 medium (GIBCO, Grand Island NY, USA) containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (GIBCO), 25 mM HEPES buffer, L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, and 1% nonessential amino acids. Cells were incubated for 24 hours at 37° C in a humidified atmosphere with 5% of CO<sub>2</sub>. Non-adherent leukocytes were removed by washing with PBS, and adherent monocytes were recovered with cold PBS/EDTA and counted in a LH750 analyzer (Beckman Coulter, Brea CA, USA). 5 X 10<sup>5</sup> monocytes/well were incubated in 24-well plates (Nunc, Houston TX, USA) with RPMI-1640 supplemented medium and stimulated with 10 ng/mL (corresponding to a concentration of 200 U/mL) of recombinant human IFN- $\gamma$  (PeproTech, Rocky Hill NJ, USA) at 37° C. Previously, it has been shown that the minimum concentration of IFN- $\gamma$  to induce significant decrements in the *in vitro* production of TIMP-1 is around 150

U/mL [14]. After 48 hours of incubation, supernatants were withdrawn and stored at  $-75^{\circ}\text{C}$  until use.

Finally, serum levels of IFN- $\gamma$  and supernatant concentrations of MMP-1, MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 were measured by enzyme-linked immunosorbent assays using commercial kits (R&D Systems, Minneapolis MN, USA) according to instructions provided by the manufacturer.

**Statistical analyses**

Frequencies and proportions were utilized to describe categorical data and differences were analyzed using the chi-square test. Continuous variables were expressed as median and interquartile range (IQR, 25<sup>th</sup> to 75<sup>th</sup> percentile) and compared using the Wilcoxon's matched pairs test (basal versus stimulated) or the Mann-Whitney test (independent groups) as correspond. The Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons tests were performed when more than 2 groups were compared.

The ratio of MMPs/TIMP-1 was first obtained for each patient and these individual data were used to obtain the arithmetic mean of the whole group and used to express the overall ratios. All analyses were two-sided, and significance was set at  $p < 0.05$ . The GraphPad Prism ver. 4.02 (GraphPad Inc, San Diego CA, USA) statistical software was used for calculations.

**Results**

The study was conducted in 30 patients with UA/NSTEMI (83% male, median age 61.5 years), 30 patients with stable CAD (83% male, median age 63 years), and 30 healthy blood donors. Demographic and clinical characteristics are described in Table 1. No differences were found in terms of hypertension and diabetes, previous use of aspirin and statins and other clinical data including lipid profile. However, the frequency of smoking (83 versus 53%;  $p < 0.05$ ) and the use of  $\beta$ -blockers (80 versus 47%;  $p < 0.05$ ) was higher in patients with UA/NSTEMI than in those with stable CAD.

Serum levels of IFN- $\gamma$  were similar in patients with UA/NSTEMI or stable CAD (median 31.5, 23-39 versus 28, 15-35 pg/ml;  $p = \text{ns}$ ), and these were higher to those found in blood donors (18, 10-31 pg/ml;  $p < 0.05$ ).

The concentrations of MMP and TIMP-1 in the supernatants of non-stimulated and IFN- $\gamma$ -stimulated monocytes are described in Table 2. As noted, basal levels of MMP-1 were similar between groups, and this was not modified upon stimulation. Basal MMP-2 was higher in healthy controls than in both groups of patients, although its concentration significantly increased after IFN- $\gamma$  stimulation only in the latter. In basal conditions, levels of MMP-9 were higher in patients with UA/NSTEMI than in the other groups; after stimulation, levels sharply increased in all groups. Levels of TIMP-1 were similar in the basal; after stimulation, TIMP-1 production was unchanged in cells from healthy donors but a three to five-fold drop was observed in monocytes from patients.

Regarding the MMP-1/TIMP-1 ratios, these were  $< 1.0$  in basal conditions and after stimulation in all groups. Similar results were found for the MMP-2/TIMP-1 ratio (data not shown). In contrast, mean MMP-9/TIMP-1 baseline ratio was

**Table 1.** Characteristics of patients and healthy individuals.

	UA/NSTEMI (n=30)	Stable CAD (n=30)	p	Healthy (n=30)
Age, years	61.5 (39-80)	63 (38-81)	ns	54.8 (30-65)
Male, n (%)	25 (83)	25 (83)	ns	23 (77)
History of myocardial infarction, n (%)	16 (53)	19 (63)	ns	0
Cardiovascular risk factors, n (%)				
Hypertension	21 (70)	21 (70)	ns	0
Diabetes mellitus	15 (50)	17 (57)	ns	0
Smoking	25 (83)	16 (53)	$< 0.05$	17 (57)
Laboratory data				
Cholesterol, mg/dL	159 (83-272)	164 (95-261)	ns	-
LDL, mg/dL	99.8 (35-170)	93 (26-189)	ns	-
HDL, mg/dL	36.3 (21-60)	37.1 (25-63)	ns	-
Triglycerides, mg/dL	134 (59-535)	170.5 (64-386)	ns	-
C-reactive protein, mg/L	3.3 (0.8-127)	2.1 (0.2-42)	$< 0.05$	1 (0.2-7.5)
Medications at admission				
Aspirin	29 (97)	28 (93)	ns	-
Statins	27 (90)	28 (93)	ns	-
$\beta$ -blockers	24 (80)	14 (47)	$< 0.05$	-

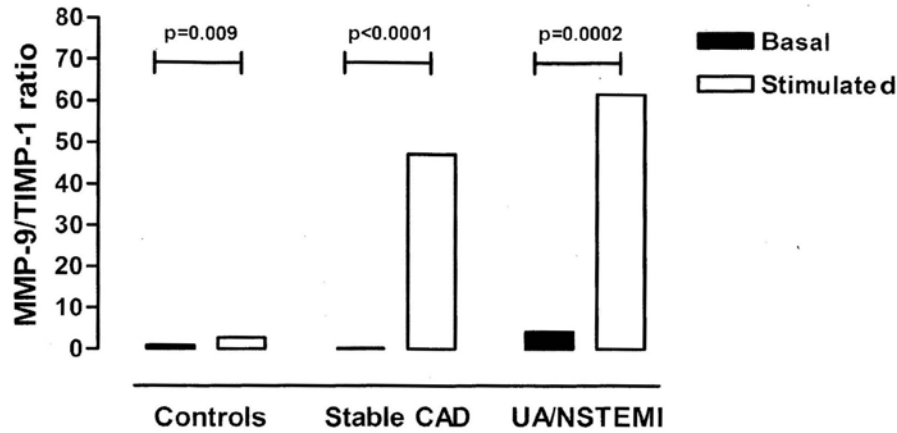
Data are expressed as median (range) unless otherwise specified.  
 UA, unstable angina; NSTEMI, non-ST segment elevation myocardial infarction;  
 CAD, coronary artery disease.

imbalanced ( $> 1.0$ ) only in patients with UA/NSTEMI (ratio 4.4). As noted above, MMP-9 secretion increased in all groups while TIMP-1 decreased only in patients following the stimulation with IFN- $\gamma$ . As a consequence, monocytes from both groups of patients strikingly increased their mean secreted MMP-9/TIMP-1 ratios (Figure 1). The MMP-9/TIMP-1 ratio from patients with UA/NSTEMI rose to 59 whilst this figure was 47 for patients with stable CAD but in healthy controls it only increased to 2.8.

**Discussion**

In the present study, we have demonstrated that stimulation with IFN- $\gamma$ , a prototypal antiviral and inflammatory cytokine, induces an imbalance on the MMP-9/TIMP-1 ratio in monocytes from patients with stable CAD as high as those from patients with ACS.

In the notion that stimulation with IFN- $\gamma$  induces a dramatic imbalance on the MMP-9/TIMP-1 ratio, it is interesting that the serum levels of IFN- $\gamma$  were significantly higher in patients with CAD than in healthy individuals. Although the present study did not evaluate the possible cellular sources of IFN- $\gamma$ , it is largely known that this cytokine is synthesized by innate immune cells such as natural killer cells, monocytes, and macrophages as



**Figure 1.** Matrix metalloproteinase-9 / Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 (MMP-9/TIMP-1) ratio in the supernatants of unstimulated (black column) and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) stimulated (white column) monocytes from healthy donors and patients with stable coronary artery disease (CAD) or unstable angina/non-ST-segment elevation myocardial infarction (UA/NSTEMI).

doi: 10.1371/journal.pone.0072291.g001

**Table 2.** Concentration of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 (TIMP-1) measured in the supernatants of non-stimulated (basal) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) stimulated monocytes.

Marker	ng/mL	Condition	UA/NSTEMI	Stable CAD	Controls	p
MMP-1	ng/mL	Basal	8.2 (5.8-16.5)	5.4 (1.5-10.8)	8 (3.5-14.2)	ns
		Stimulated	9.9 (5.3-13.1)	6.7 (4.6-9.9)	6.6 (4.2-11.3)	
MMP-2	ng/mL	Basal	1.5 (0.5-4)	2.8 (0.8-5)	5.8 (2.6-12.4)	0.002
		Stimulated	5.6 (0.9-11.8)**	8.4 (4.5-12.9)*	3.4 (1.3-11.7)	
MMP-9	ng/mL	Basal	187 (105-460)	30 (14-90)	120 (95-194)	0.0001
		Stimulated	1016 (649-1610)***	541 (193-1078)***	793 (427-1043)***	
TIMP-1	ng/mL	Basal	416 (139-951)	982 (568-1250)	594 (126-1395)	ns
		Stimulated	158 (7-465)*	181 (9-732)*	548 (277-1024)	

Data are expressed as the median and interquartile range (25<sup>th</sup> to 75<sup>th</sup> percentile). UA, unstable angina; NSTEMI, non-ST segment elevation myocardial infarction; CAD, coronary artery disease.

The column on the far right denotes the 'p value' when comparing basal concentrations throughout the three groups (Kruskal-Wallis tests). Meanwhile, significant differences between basal versus stimulated conditions for each group (Wilcoxon's matched pairs tests) are represented with asterisks as follows: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

well as by several adaptive immune cells including CD4+ helper T cells [15]. Also, it is well-recognized that IFN- $\gamma$  is highly expressed within atherosclerotic lesions thus locally increasing the recruitment of inflammatory cells, impairing reverse cholesterol transport, and enhancing the production of MMPs and other inflammatory cytokines [16]. Hence, a sudden increase in the production of circulating IFN- $\gamma$ , perhaps as observed following an acute viral infection, could also play a role in destabilization of atherosclerotic plaque.

A seminal case series study including ~40,000 patients found that risk of adverse cardiovascular events is substantially higher after an episode of acute respiratory tract infection, with incidence ratios of 4.9 for MI and 3.19 for stroke [6]. Subsequently, the effect of influenza and influenza-like illnesses on triggering MI was assessed on a national cardiac disease registry database [7]. This study demonstrates that risk of MI is increased during days 1-3 after acute respiratory infection (incidence ratio 4.19), with the effect tapering over time. Moreover, influenza vaccine may reduce the risk to develop cardiovascular events in patients hospitalized due to ACS [17]. The PROBE study included 439 patients with an ACS who were randomly allocated to receive, or not, influenza vaccine; after 12 months of follow-up, a significant reduction (hazard ratio of 0.70) in the occurrence of major adverse cardiovascular events including death and hospitalization for ACS, stroke or heart failure was observed in those patients who received the influenza vaccine [17]. In a similar way, two randomized-controlled studies have addressed the effects of the influenza vaccine in patients with stable CAD [18,19]. The FLUVACS study found a significant reduction in cardiovascular

mortality and other major adverse cardiovascular events following the use of influenza vaccine [18], whilst the FLUCAD study found no difference in cardiovascular deaths although the occurrence of coronary ischemic events was slightly lower in those receiving the influenza vaccine [19].

The relationship between influenza virus and the development of ACS is still unclear despite the aforementioned epidemiological observations [20]. The progression from stable CAD into an ACS is mainly determined by the integrity of the atherosclerotic plaque. In this regard, degradation of extracellular matrix within the atherosclerotic plaque is largely determined by the balance between the MMPs and their endogenous TIMPs. Increased levels and activity of MMPs are found in inflamed atherosclerotic plaques [21,22], although increased serum concentrations of MMPs and low levels of TIMPs are also found in patients with ACS [23]. Even when macrophage-derived foam cells within the plaque are a prominent source of MMP, Brunner et al. recently demonstrated an imbalance of MMP-9/TIMP-1 in the circulating monocytes isolated from patients with ACS [12]. They suggest that increased levels of serum MMPs in patients with ACS might result not only from the local liberation of ruptured plaques but also from circulating monocytes, thus reflecting a systemic inflammatory condition. These results are in line with other observations on the role of the increased MMPs activity and the MMPs/TIMP proteolytic imbalance in ventricular remodeling after an ACS [24–26].

The mechanisms underlying the observed differences in TIMP-1 production after stimulation in monocytes from healthy donors compared to patients with CAD either stable or unstable are not clear. However, this could be the result of an altered milieu of pro- and anti-inflammatory cytokines in individuals with clinically evident CAD [12,27].

Our results indicate that circulating monocytes from patients with chronic stable CAD are primed, and display a functional

phenotype that could trigger plaque instability when they are stimulated with IFN- $\gamma$ , a prototypal inflammatory cytokine massively released following an infection with influenza virus. We suggest that our results bring biological plausibility to the well-known association between acute infections with influenza virus and the development of ACS.

There are potential limitations to the present study. First, our results deserve to be studied in depth to appraise the clinical relevance of these findings. Second, longitudinal studies including a large number of patients may be necessary to better understand causality.

In conclusion, unstimulated monocytes from patients with ACS display an imbalance in the MMP-9/TIMP-1 ratio, whilst cells from patients with stable CAD show a similar behavior than those from healthy individuals. However, stimulation with IFN- $\gamma$  induces a striking imbalance on the MMP-9/TIMP-1 ratio in the monocytes from patients with stable CAD as high as those from patients with ACS. These data may account for an explanation of the association between acute respiratory infections and the development of ACS in individuals with no evidence of a vulnerable plaque.

#### Acknowledgements

RS is in the Biological Sciences PhD program at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

#### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RS RB. Performed the experiments: RS JF-C LG-G RM-V. Analyzed the data: RS LMA-G RB. Contributed reagents/materials/analysis tools: HG-P AMM-D JC-A CM-S. Wrote the manuscript: RS LMA-G RB.

#### References

- Hanson MA, Fareed MT, Argenio SL, Agunwamba AO, Hanson TR (2013) Coronary artery disease. *Prim Care* 40: 1-16. doi:10.1016/j.pocp.2012.12.001. PubMed: 23402459.
- Sánchez-Díaz CJ, García-Badillo E, Sánchez-Ramírez CJ, Juárez U, Martínez-Sánchez C (2012) Clinical characteristics, process of care and outcomes among Mexican, Hispanic and non-Hispanic white patients presenting with non-ST elevation acute coronary syndromes: Data from RENASICA and CRUSADE registries. *Arch Cardiol Mex* 82: 14-21. PubMed: 22452861.
- Zhou J, Chew M, Ravn HB, Falk E (1999) Plaque pathology and coronary thrombosis in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 230: 3-11. PubMed: 10389196.
- Sirwardena AN (2012) Increasing evidence that influenza is a trigger for cardiovascular disease. *J Infect Dis* 206: 1636-1638. doi:10.1093/infdis/jis598. PubMed: 23048169.
- Warren-Gash C, Bhaskaran K, Hayward A, Leung GM, Lo SV et al. (2011) Circulating influenza virus, climatic factors, and acute myocardial infarction: a time series study in England and Wales and Hong Kong. *J Infect Dis* 203: 1710-1718. doi:10.1093/infdis/jir171. PubMed: 21606529.
- Smeeth L, Thomas SL, Hall AJ, Hubbard R, Farrington P et al. (2004) Risk of myocardial infarction and stroke after acute infection or vaccination. *N Engl J Med* 351: 2611-2618. doi:10.1056/NEJMoa041747. PubMed: 15602021.
- Warren-Gash C, Hayward AC, Hemingway H, Denaxas S, Thomas SL et al. (2012) Influenza infection and risk of acute myocardial infarction in England and Wales: a CALIBER self-controlled case series study. *J Infect Dis* 206: 1652-1659. doi:10.1093/infdis/jis597. PubMed: 23048170.
- Werba JP, Veglia F, Amato M, Baldassarre D, Massironi P et al. (2008) Patients with a history of stable or unstable coronary heart disease have different acute phase responses to an inflammatory stimulus. *Atherosclerosis* 196: 835-840. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.01.033. PubMed: 17335831.
- Zhang L, Liao MF, Tian L, Zou SL, Lu QS et al. (2011) Overexpression of interleukin-1 $\beta$  and interferon- $\gamma$  in type I thoracic aortic dissections and ascending thoracic aortic aneurysms: possible correlation with matrix metalloproteinase-9 expression and apoptosis of aortic media cells. *Eur J Cardiothorac Surg* 40: 17-22. doi:10.1016/j.ejcts.2010.09.019. PubMed: 21349736.
- Bench TJ, Jeremias A, Brown DL (2011) Matrix metalloproteinase inhibition with tetracyclines for the treatment of coronary artery disease. *Pharmacol Res* 64: 561-566. doi:10.1016/j.phrs.2011.05.002. PubMed: 21624471.
- Halvorsen B, Otterdal K, Dahl TB, Skjelland M, Gullestad L et al. (2008) Atherosclerotic plaque stability—what determines the fate of a plaque? *Prog Cardiovasc Dis* 51: 183-194.
- Brunner S, Kim JO, Methe H (2010) Relation of matrix metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio in peripheral circulating CD14<sup>+</sup> monocytes to progression of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 105: 429-434. doi:10.1016/j.amjcard.2009.10.013. PubMed: 20152234.
- Canon CP, Battler A, Brndis RG, Cox JL, Ellis SG et al. (2001) American College of Cardiology key data elements and definitions for measuring the clinical management and outcomes of patients with



- acute coronary syndromes. A report of the American College of Cardiology Task Force on Clinical Data Standards (Acute Coronary Syndromes Writing Committee). *J Am Coll Cardiol* 38: 2114-2130. doi: 10.1016/S0735-1097(01)01702-8. PubMed: 11738323.
14. Shapiro SD, Campbell EJ, Kobayashi DK, Welgus HG (1990) Immune modulation of metalloproteinase production in human macrophages. Selective pretranslational suppression of interstitial collagenase and stromelysin biosynthesis by interferon-gamma. *J Clin Invest* 86: 1204-1210. doi:10.1172/JCI114826. PubMed: 2170447.
  15. Pedersen ER, Midttun Ø, Ueland PM, Scharlum-Hansen H, Seifert R et al. (2011) Systemic markers of interferon- $\gamma$ -mediated immune activation and long-term prognosis in patients with stable coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 698-704. doi:10.1161/ATVBAHA.110.219329. PubMed: 21183733.
  16. McLaren JE, Ramji DP (2009) Interferon gamma: a master regulator of atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 20: 125-135. doi:10.1016/j.cytogfr.2008.11.003. PubMed: 19041276.
  17. Phrommintikul A, Kuanprasert S, Wongcharoen W, Kanjanavanit R, Chaiwarith R et al. (2011) Influenza vaccination reduces cardiovascular events in patients with acute coronary syndrome. *Eur Heart J* 32: 1730-1735. doi:10.1093/eurheartj/ehr004. PubMed: 21289042.
  18. Gurfinkel EP, Leon de la Fuente R, Mendiz O, Mautner B (2004) Flu vaccination in acute coronary syndromes and planned percutaneous coronary interventions (FLUVACS) Study. *Eur Heart J* 25: 25-31. doi: 10.1016/j.ehj.2003.10.018. PubMed: 14683739.
  19. Ciszewski A, Bilinska ZT, Brydak LB, Kepka C, Kruk M et al. (2008) Influenza vaccination in secondary prevention from coronary ischaemic events in coronary artery disease: FLUCAD study. *Eur Heart J* 29: 1350-1358. doi:10.1093/eurheartj/ehm581. PubMed: 18187561.
  20. Natarajan P, Cannon CP (2011) Myocardial infarction vaccine? Evidence supporting the influenza vaccine for secondary prevention. *Eur Heart J* 32: 1701-1703. doi:10.1093/eurheartj/ehr053. PubMed: 21406438.
  21. Choudhary S, Higgins CL, Chen IY, Reardon M, Lawrie G et al. (2006) Quantitation and localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human carotid endarterectomy tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2351-2358. doi:10.1161/01.ATV.0000239461.87113.0b. PubMed: 16888239.
  22. Sluijter JP, Pulskens WP, Schoneveld AH, Velema E, Strijder CF et al. (2006) Matrix metalloproteinase 2 is associated with stable and matrix metalloproteinases 8 and 9 with vulnerable carotid atherosclerotic lesions: a study in human endarterectomy specimen pointing to a role for different extracellular matrix metalloproteinase inducer glycosylation forms. *Stroke* 37: 235-239. PubMed: 16339461.
  23. Cheng M, Hashmi S, Mao X, Zeng QT (2008) Relationships of adiponectin and matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio with coronary plaque morphology in patients with acute coronary syndrome. *Can J Cardiol* 24: 385-390. doi:10.1016/S0828-282X(08)70602-0. PubMed: 18464944.
  24. Kelly D, Khan SQ, Thompson M, Cockerill G, Ng LL et al. (2008) Plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9: novel indicators of left ventricular remodelling and prognosis after acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 29: 2116-2124. doi:10.1093/eurheartj/ehn315. PubMed: 18614523.
  25. Kelly D, Cockerill G, Ng LL, Thompson M, Khan S et al. (2007) Plasma matrix metalloproteinase-9 and left ventricular remodelling after acute myocardial infarction in man: a prospective cohort study. *Eur Heart J* 28: 711-718. doi:10.1093/eurheartj/ehm003. PubMed: 17339265.
  26. Ahmed SH, Clark LL, Pennington WR, Webb CS, Bonnema DD et al. (2006) Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. *Circulation* 113: 2089-2095. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.573865. PubMed: 16636176.
  27. de Oliveira RT, Mamoni RL, Souza JR, Fernandes JL, Rios FJ et al. (2009) Differential expression of cytokines, chemokines and chemokines receptors in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol* 136: 17-26. doi:10.1016/j.ijcard.2008.04.009. PubMed: 18617279.

## **APENDICE II**

### **ARTICULO ADICIONAL**

REVISIÓN DE TEMAS CARDIOLÓGICOS

*Proteína C reactiva: aspectos cardiovasculares de una proteína de fase aguda*

Luis M Amezcua-Guerra,\* Rashidi Springall del Villar,\* Rafael Bojalil Parra\*

**Resumen**

La proteína C reactiva (PCR) es una proteína inespecífica de fase aguda, utilizada como una medida de inflamación durante décadas. Recientemente se ha propuesto como un marcador de aterogénesis y como un predictor para el desarrollo de eventos cardiovasculares adversos a futuro. La PCR se une a lipoproteínas alteradas y facilita su remoción por los fagocitos, además de activar parcialmente el sistema del complemento. Los niveles elevados de PCR pueden producir efectos directos sobre las células vasculares, incluyendo inducción de citocinas y factores protrombóticos. Aunque inicialmente se había señalado una fuerte asociación entre los niveles de PCR y eventos cardiovasculares futuros, un meta-análisis reciente y varios estudios prospectivos han mostrado que esta asociación, si bien existe, pudiera ser más débil que lo descrito inicialmente. La terapia con estatinas en pacientes con enfermedad arterial coronaria ha mostrado reducir los desenlaces cardiovasculares adversos en asociación con una reducción de los niveles séricos de PCR, independientemente de su efecto sobre el perfil de lípidos.

**Summary**

C-REACTIVE PROTEIN: CARDIOVASCULAR ISSUES  
OF AN ACUTE-PHASE PROTEIN

C-reactive protein (CRP) is a nonspecific acute phase protein that has been used as an inflammatory marker for decades. More recently, it has been proposed as a predictor of cardiovascular disease (myocardial infarction, stroke, peripheral artery disease and sudden heart death). Physiologic functions of CRP as an anti-inflammatory scavenger molecule have begun to emerge. CRP binds to damaged lipoproteins and facilitates their removal by phagocytes, partially activating the complement cascade. Increased levels of CRP may result in direct effects on vascular cells, including the induction of cytokines and prothrombotic factors. Although previous studies suggested a potent independent association of CRP levels with cardiac events, the strength of this association has been shown to be weaker than previously reported in a recent large meta-analysis and in prospective studies. Therapy with statins in patients with coronary artery disease has been found to reduce adverse outcomes in association with reductions of CRP levels, independently of their effects on the lipid profile.

(Arch Cardiol Mex 2007; 77: 58-66)

**Palabras clave:** Proteína C reactiva. Enfermedad cardiovascular. Inflamación. Aterosclerosis.  
**Key words:** C-reactive protein. Cardiovascular disease. Inflammation. Atherosclerosis.

\* Departamento de Inmunología, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Juan Badiano 1, Sección XVI, Tlalpan, México D. F., México.

Correspondencia: Rafael Bojalil Parra. Jefe, Departamento de Inmunología, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Juan Badiano 1, Sección XVI, Tlalpan, México D. F., México.  
Tel. 0155 5573 2911, ext. 1255  
Fax. 0155 5573 0994

Recibido: 7 de marzo de 2006  
Aceptado: 24 de octubre de 2006

**Introducción**

Dentro del espectro de las enfermedades con participación del sistema inmune, la cuantificación de la respuesta inflamatoria permite estratificar el estado basal de la enfermedad y evaluar su respuesta al tratamiento a través del tiempo. El tipo de parámetros bioquímicos empleados para este fin ha evolucionado a la par del conocimiento sobre los mecanismos fisiológicos y patogénicos que subyacen a la inflamación.

Considerando que la respuesta inflamatoria es un fenómeno dinámico integrado por múltiples procesos distintos e interdependientes, no es razonable esperar que una prueba de laboratorio refleje a todos. Además, independientemente del tipo de estímulo, la respuesta inflamatoria utiliza de manera consistente mecanismos similares de acción, por lo que las pruebas de laboratorio que la cuantifican carecen de especificidad etiológica.

**Fenómenos de fase aguda**

Los fenómenos de fase aguda comprenden cambios bioquímicos inespecíficos en respuesta a diversas formas de daño tisular por infección, inflamación o neoplasia. Muchos elementos de esta respuesta parecen representar mecanismos de defensa tempranos de la inmunidad innata que preceden a la activación de la inmunidad

adaptativa. De manera característica hay alteración en la síntesis de varias proteínas plasmáticas (Tabla 1), con cambios en su concentración y en el tiempo de respuesta.

Tradicionalmente se ha empleado la velocidad de sedimentación globular (VSG) como la referencia para determinar inflamación; ésta es una medida indirecta de la concentración de diferentes proteínas plasmáticas (especialmente fibrinógeno) sintetizadas en abundancia durante una respuesta inflamatoria. Estas proteínas interactúan con la membrana de los eritrocitos, induciendo la formación de columnas eritrocitarias (*rouleaux*) más pesadas que los eritrocitos individuales, por lo que tienden a sedimentarse con mayor velocidad en el fondo de una columna de sangre.

La cuantificación directa de proteínas producidas durante los fenómenos de fase aguda es un método más fidedigno y confiable. De éstas, la proteína C reactiva (PCR) es la más difundida y la más accesible para el clínico. El advenimiento de inmunoensayos de alta sensibilidad para PCR en la década pasada, aumentó el interés en el estudio de esta proteína, no sólo como marcador de inflamación, sino como una molécula funcionalmente clave en las respuestas de la inmunidad innata. El concepto de que la PCR es también un mediador directo de diversos procesos patológicos llegó al demostrarse que los niveles séricos elevados de PCR (aún dentro de los parámetros considerados como normales) predicen el desarrollo de futuros eventos coronarios.

Así, en la práctica médica actual es indispensable un mejor conocimiento sobre los mecanismos fisiológicos y patogénicos relacionados con la PCR.

**Descripción de la PCR**

La PCR fue la primera proteína de fase aguda descrita y el nombre deriva de su capacidad para precipitar al polisacárido somático C del *Streptococcus pneumoniae*. La PCR forma parte de la inmunidad innata y su síntesis es inducida como respuesta al daño tisular por infecciones, inflamación o neoplasias. Es sintetizada por hepatocitos y células del endotelio vascular y su expresión está regulada por citocinas, particularmente por la interleucina 6 (IL-6) y, en menor grado, la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).<sup>1</sup>

La PCR pertenece a una familia de proteínas pentaméricas dependientes de calcio llamadas

Tabla 1. Cambios en la concentración de diferentes proteínas plasmáticas durante la respuesta de fase aguda.

	Incrementada	Disminuida
Inhibidores de proteasas	$\alpha_1$ -antitripsina $\alpha_1$ -antiquimotripsina	Inter $\alpha_1$ -antitripsina
Proteínas de la coagulación	Fibrinógeno Protrombina Factor VIII Plasminógeno	
Proteínas del complemento	C1s C2 C3 C4 C5 Factor B	Properdina
Proteínas transportadoras	Inhibidor de C1 Haptoglobina Hemopexina Ceruloplasmina	
Misceláneos	Proteína C reactiva Amiloide sérico A Fibronectina $\alpha_2$ -glucoproteína ácida	Albumina Transtirretina HDL LDL

pentraxinas. Aunque la PCR se produce como monómero, la molécula funcional está compuesta por cinco subunidades polipeptídicas de 23 kDa idénticas asociadas de manera no covalente en una configuración anular con simetría cíclica. Las pentraxinas son proteínas que han subsistido a través de la evolución, con proteínas homólogas entre especies filogenéticamente distantes. Sin embargo, hay grandes variaciones en la organización de las subunidades, en el ensamblaje proteico y en la cinética de la PCR entre especies, por lo que se deben extremar precauciones al extrapolar al humano los datos obtenidos en modelos animales.<sup>2</sup>

#### Mecanismos de acción propuestos de la PCR

La PCR se une con gran afinidad a una amplia variedad de ligandos tanto autólogos (lipoproteínas plasmáticas nativas y modificadas, membranas celulares dañadas, residuos de fosfatidilcolina, histonas, cromatina, ribonucleoproteínas pequeñas y células apoptóticas), como extrínsecos (glucanos, fosfolípidos y otros componentes somáticos y capsulares de bacterias, hongos y parásitos). Cuando la PCR está unida a ligandos macromoleculares es reconocida por C1q y activa la vía clásica del complemento: adicionalmente, provee sitios de unión para el factor H, regulando la amplificación de la vía alterna y a las convertasas de C5. Por otro lado, inhibe el ensamblaje de los componentes terminales del complemento (C5 - C9), atenuando la formación del complejo de ataque a la membrana y limitando la lisis celular por esta vía.<sup>3</sup> Otros efectos de la PCR semejan algunas propiedades de la fracción cristalizante (Fc) de las inmunoglobulinas. Esta proteína es capaz de unir complejos inmunes y facilitar la depuración de detritus solubles y partículas apoptóticas, al ser reconocida por los receptores para la Fc de la IgG (FcγR) sobre los macrófagos activados.<sup>4</sup>

La capacidad de la PCR para activar el complemento y opsonizar partículas parece ser importante en la respuesta de la inmunidad innata frente a los patógenos. La ausencia de cualquier deficiencia congénita conocida de la PCR y su conservación filogenética sugieren que esta proteína debe tener gran importancia en la supervivencia de los individuos.

Cuando una célula en apoptosis es opsonizada y posteriormente fagocitada por macrófagos, induce la producción y liberación de diversas ci-

tocinas (como el factor de crecimiento transformante  $\beta$ ), que inhiben el desarrollo de respuestas inmunológicas adaptativas. La PCR tiene la capacidad tanto de opsonizar células apoptóticas, como de desacoplar las proteínas del complejo de ataque a la membrana dependiente del complemento. Esto permite una mayor permanencia de las células apoptóticas antes de ser eliminadas, aunque facilitando su captación por fagocitos. Así, la PCR juega un papel preponderante en limitar la activación de respuestas de inmunidad adaptativa. Esto ha sido demostrado en modelos murinos carentes (*knock-out*) para el gen de la proteína amiloide sérica A (principal pentraxina en esa especie), los cuales desarrollan respuestas de autoinmunidad espontánea.<sup>5</sup> Es interesante que los pacientes con lupus eritematoso generalizado, el prototipo de enfermedad mediado por complejos inmunes y anticuerpos autorreactivos, presenten una tasa muy baja de producción de PCR.<sup>6</sup>

#### Cinética de la PCR

La síntesis *de novo* de la PCR principia a las 6 horas después de iniciado el estímulo inflamatorio y alcanza su máximo a las 24-72 horas. Su vida media es relativamente corta (19 horas), pero su concentración plasmática es constante bajo cualquier condición y no se modifica con la ingestión de alimentos ni presenta variación circadiana, en contraste con las proteínas de la coagulación y otras de fase aguda. Una vez finalizado el estímulo de IL-6, la PCR regresa a valores normales al cabo de 7 días. Con esto, el índice de producción de la PCR es el único determinante de los niveles circulantes de la proteína, reflejando en forma directa la intensidad de los procesos patológicos que estimularon su síntesis.<sup>7</sup>

La concentración media de la PCR en donadores sanos es de 0.8 mg/L, pero después de un estímulo inductor, esta proteína puede incrementar su producción más de 10,000 veces. Los niveles séricos de PCR tienden a aumentar con la edad, probablemente como reflejo del incremento en la frecuencia de procesos inflamatorios subclínicos y de la cantidad de fenómenos apoptóticos. Se han detectado niveles séricos discretamente más elevados en mujeres que en varones.<sup>8</sup>

Al igual que la proteína amiloide sérica A (SAP), las características cinéticas de la PCR le proporcionan cualidades para considerarla como una proteína que refleja de manera fidedigna un fenómeno de fase aguda (Figura 1). Existe menos

evidencia clínica sobre la utilidad de la SAP en comparación con la PCR y los ensayos para cuantificarla son poco accesibles y no están estandarizados.

**Interpretación de los niveles séricos de PCR**

La síntesis de PCR depende de la concentración de mediadores inflamatorios producidos en el sitio de daño que llegan al hígado; por lo tanto, un valor normal de PCR no necesariamente indica ausencia de inflamación.

Empleando métodos de detección de alta sensibilidad, la distribución de PCR es muy similar entre géneros y grupos étnicos. Los valores de 0.3, 0.6, 1.5, 3.5 y 6.6 mg/L corresponden a los puntos de corte estimados para los percentiles 10, 25, 50, 75 y 90. Una forma alternativa más fácilmente asequible es el considerar valores de < 1, 1 a 3 y > 3 mg/L como grupos de bajo, moderado y alto riesgo para desarrollar eventos coronarios agudos a futuro.<sup>9</sup>

En general, cuando la PCR es < 10 mg/L traduce procesos inflamatorios leves como gingivitis, angina o ejercicio vigoroso. Elevaciones moderadas (10-100 mg/L) se encuentran en el infarto

agudo del miocardio, la pancreatitis, las infecciones de mucosas (bronquitis, cistitis) y en la mayoría de las enfermedades reumáticas. Una concentración mayor de 100 mg/L se encuentra en las infecciones bacterianas agudas graves (como en la sepsis), traumatismos mayores (incluyendo quemaduras extensas) o vasculitis sistémica.<sup>10</sup>

Es importante aclarar que frecuentemente los valores de PCR se informan en mg/dL, por lo que habrá que tener especial cuidado sobre las unidades de medición al interpretar los resultados. Las ventajas de la PCR en comparación con otros indicadores de fase aguda, explican su uso cada vez más extendido (Tabla II).

La utilidad de determinar los niveles séricos de PCR en la práctica clínica se presenta en el Tabla III. Para evitar posibles errores durante la determinación, se recomienda obtener dos mediciones de PCR con un intervalo de tiempo entre ellas y considerar el promedio de ambas.

**Asociación entre enfermedad cardiovascular y PCR**

Después de un infarto agudo del miocardio, los niveles séricos de la PCR se elevan rápidamente, reflejando la extensión de la necrosis. Los niveles máximos alcanzados a las 48 horas del evento agudo son útiles como factor pronóstico de la evolución de estos pacientes.<sup>11</sup> Aunque esta elevada producción de PCR pudiera corresponder sólo a una respuesta de fase aguda típica a la muerte celular y a la infiltración inflamatoria subsiguientes, se ha demostrado que la PCR se deposita conjuntamente con fracciones activadas del complemento dentro de las zonas de infarto agudo,<sup>12</sup> contribuyendo ambas a la gravedad de la lesión isquémica.<sup>13</sup>

Diversos estudios epidemiológicos han mostrado que los niveles séricos de PCR tienen valor predictivo para el desarrollo de síndromes coronarios agudos, eventos vasculares cerebrales, enfermedad arterial periférica y muerte súbita cardíaca.<sup>9</sup>

La relación existente entre los niveles basales de PCR y el riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares ha sido consistente entre estudios. En muchos de ellos, mostrando independencia de la edad y de los factores de riesgo tradicionales como tabaquismo, niveles de colesterol, presión arterial y diabetes. Más aún, su valor predictivo se mantiene hasta por 20 años después de la primera determinación de PCR.<sup>14</sup>

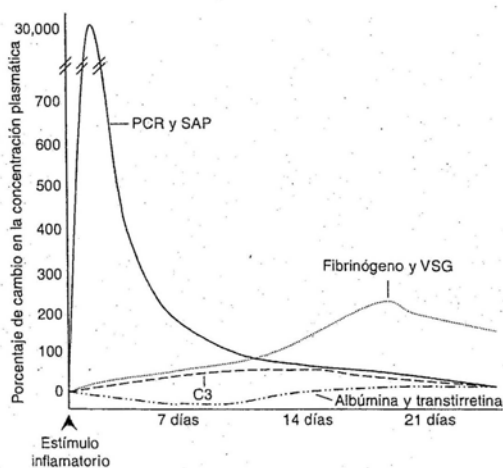


Fig. 1. Porcentaje de cambio de diferentes fenómenos de fase aguda a través del tiempo en respuesta a un estímulo inflamatorio. PCR, proteína C reactiva; SAP, proteína amiloide sérica A; VSG, velocidad de sedimentación globular.

Tabla II. Ventajas y desventajas como reactante de fase aguda entre la velocidad de sedimentación globular (VSG) y la proteína C reactiva (PCR).

	VSG	PCR
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Barata</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rápida respuesta ante estímulos inflamatorios</li> <li>• Refleja directamente el valor de una proteína de fase aguda</li> <li>• La cuantificación es precisa y reproducible</li> <li>• Se puede determinar en suero almacenado</li> </ul>
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se altera por la edad y el género</li> <li>• Se altera por anemia o poliglobulia</li> <li>• Refleja el nivel de muchas proteínas plasmáticas</li> <li>• Responde lentamente ante estímulos inflamatorios</li> <li>• Requiere muestras frescas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Costosa</li> <li>• En algunas enfermedades autoinmunes inflamatorias (lupus y esclerodermia) no muestra incremento</li> </ul>

Tabla III. Utilidad clínica de la medición de la PCR.

Prueba de escrutinio para diferenciar enfermedades orgánicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fibromialgia vs condiciones inflamatorias autoinmunes</li> </ul>
Evaluación de la actividad de la enfermedad en condiciones inflamatorias	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Artritis idiopática juvenil</li> <li>• Artritis reumatoide</li> <li>• Espondilitis anquilosante</li> <li>• Enfermedad de Reiter</li> <li>• Artritis psoriásica</li> <li>• Vasculitis sistémicas</li> <li>• Enfermedad de Crohn</li> <li>• Fiebre reumática</li> <li>• Fiebres periódicas</li> <li>• Pancreatitis aguda</li> </ul>
Diagnóstico y seguimiento de enfermedades infecciosas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endocarditis infecciosa</li> <li>• Sepsis neonatal y meningitis</li> <li>• Infección intercurrente en lupus eritematoso sistémico</li> <li>• Infección intercurrente en leucemias en tratamiento</li> <li>• Complicaciones post-operatorias incluyendo infección y tromboembolismo</li> </ul>
Graduación pronóstica en enfermedades cardiovasculares	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infarto agudo de miocardio</li> <li>• Angina inestable</li> <li>• Evento vascular cerebral</li> </ul>
Diagnóstico diferencial de enfermedades inflamatorias	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lupus eritematoso sistémico vs artritis reumatoide</li> <li>• Enfermedad de Crohn vs colitis ulcerativa</li> </ul>

Existe por lo menos una docena de estudios prospectivos donde se ha demostrado que al detectarse una concentración basal de PCR dentro de los cuartiles superiores, hay un riesgo relativo para desarrollar eventos cardiovasculares adversos de 2.0 a 4.0, en comparación con las concen-

traciones de PCR contenidas en los cuartiles inferiores (Figura 2).<sup>15-19</sup>

En un estudio prospectivo, Ridker y colaboradores<sup>15</sup> demostraron que la PCR es un predictor de riesgo más potente que las lipoproteínas de baja densidad (LDL), con áreas bajo la curva (ROC) de 0.64 vs 0.60 y con un riesgo porcentual poblacional atribuible de 40 vs 19. La PCR no muestra prácticamente ninguna correlación con los niveles de lípidos, por lo que no es posible predecir su valor a partir de la cuantificación del colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (HDL) o LDL. La variación de la PCR adscrita a los niveles de LDL es menor de 5%.<sup>20</sup> La PCR no suplanta el valor de las LDL en la predicción de riesgo cardiovascular, pero debe ser considerada como una prueba adjunta a la determinación de lípidos. El valor aditivo de la PCR al perfil de lípidos para la predicción de riesgo coronario ha mostrado que el presentar niveles de LDL < 130 mg/dL y de PCR > 3 mg/L, confiere un riesgo mayor que los niveles de LDL > 160 mg/dL y PCR < 1.0 mg/L. De la misma manera, los niveles de PCR impactan de manera significativa en todos los niveles de la evaluación de riesgo de Framingham (Figura 3).<sup>21</sup> Recientemente se publicó un meta-análisis que incluyó 22 estudios prospectivos examinando a la PCR como predictor de eventos cardiovasculares futuros. Los 7,068 participantes incluidos para el estudio presentaron una edad media al ingreso de 57 años y un seguimiento de 12 años. Todos los estudios utilizaron determinaciones de alta sensibilidad y los resultados se ajustaron para al menos un factor de riesgo tradicional. Cuando se comparó el tercil superior contra el tercil inferior, la razón de momios ajustada fue de 1.58 (con IC 95% de 1.48 a 1.68).<sup>22</sup> Otros estudios publicados desde este meta-análisis han mostrado riesgos relativos similares.<sup>23,24</sup> Por ejemplo, en el *Women's Health Study* se encontró un riesgo relativo ajustado de 2.1, cuando se compararon las mujeres incluidas en el 10% más elevado de PCR en comparación con las incluidas en el 10% más bajo.<sup>25</sup> El incremento en el riesgo cardiovascular adscrito a la PCR es consistente entre estudios. Sin embargo, después de ajustar los resultados con los factores de riesgo tradicionales, este pareciera tener un valor más bajo al informado inicialmente.

#### Aterosclerosis y PCR

Hay estudios recientes que sugieren que la PCR, además de reflejar la extensión del daño tisular

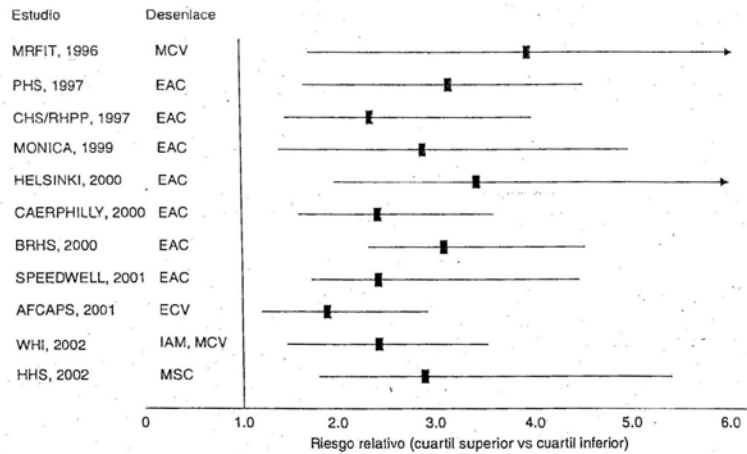


Fig. 2. Estudios prospectivos que han mostrado asociación entre los niveles basales de proteína C reactiva y el riesgo de desarrollar un primer evento cardiovascular adverso. Los cuadros indican el riesgo relativo (RR) puntual, mientras que las líneas horizontales muestran la amplitud de los intervalos de confianza al 95% (IC 95%). MCV, muerte cardiovascular; EAC, enfermedad arterial coronaria; ECV, enfermedad cardiovascular; IAM, infarto agudo de miocardio; MSC, muerte súbita cardíaca.

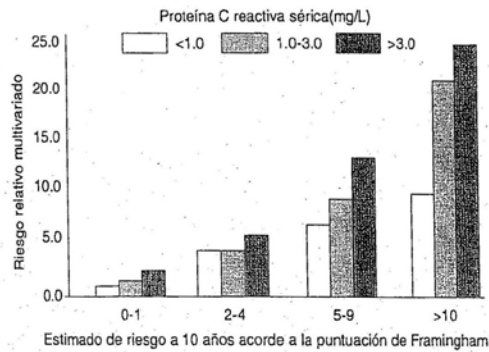


Fig. 3. Riesgo relativo para enfermedad cardiovascular ajustado para niveles séricos de proteína C reactiva y puntuación de riesgo de Framingham. Modificado de Ridker PM, et al. N Engl J Med 2002;347:1557-65.

post-infarto y de servir como un marcador serológico para la predicción de eventos coronarios agudos, contribuye directamente en la patogénesis, progresión y complicación de la enfermedad aterosclerótica de manera directa. Por su

capacidad de depositarse en la íntima de las arterias, la PCR provoca disfunción del endotelio, lo que facilita la activación, migración y alojamiento de los leucocitos en el interior de la íntima arterial. Esto contribuye a la formación de las lesiones vasculares que son la base del desarrollo de la aterosclerosis.<sup>26</sup> Los efectos pro-inflamatorios y pro-aterogénicos de la PCR sobre las células endoteliales disminuyen la producción de óxido nítrico y prostaglandina I<sub>2</sub> (previamente denominada prostaciclina), incrementan la secreción de IL-6, aumentan la expresión de moléculas de adhesión en la superficie endotelial (proteínas clave en el reclutamiento de monocitos y linfocitos T hacia los tejidos) y aumentan la secreción de quimiocinas (citocinas de bajo peso molecular con capacidad quimiotáctica). Todos éstos son factores fundamentales en la migración de los leucocitos hacia la íntima de las arterias.<sup>27</sup>

Cuando las LDL alcanzan cierto umbral de concentración en la sangre, penetran al interior de la pared arterial donde son modificadas por procesos de oxidación. La PCR se une a estas lipoproteínas (tanto a las nativas como a las oxidadas) y facilita su fagocitosis e internalización por los



macrófagos de la íntima arterial, promoviendo la formación de células espumosas (macrófagos con grandes cantidades de lípidos oxidados en su interior). La acumulación de células espumosas es determinante para la evolución patogénica de una placa arterial, haciéndola más propensa a erosionarse o romperse y liberando su contenido trombogénico. Esta propiedad pro-trombótica también se suma a la capacidad de la PCR para inducir la producción de factor tisular (iniciador de la cascada de coagulación) por los macrófagos activados. Ante el estímulo de la PCR, estas células incrementan la producción de especies reactivas del oxígeno y la síntesis de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ .<sup>28</sup> La PCR también induce un incremento en la síntesis de metaloproteasas, enzimas críticas que aceleran la degradación de diversos componentes de la matriz extracelular, causando debilitamiento de la capa fibrosa de las placas.<sup>29</sup>

Todos estos factores desestabilizan la placa de ateroma, haciéndola más vulnerable a la ruptura. Hay evidencia que sugiere acciones directas de la PCR en la inducción de apoptosis en las células del músculo liso de las arterias coronarias humanas (responsables de la síntesis de los componentes de la matriz extracelular), lo que favorece aun más la vulnerabilidad de la placa.<sup>30</sup> Por lo tanto, es posible que las alteraciones en la concentración de la PCR sérica, además de reflejar la vulnerabilidad de las lesiones ateroscleróticas, participen directamente en su formación y ruptura.

#### Vigilancia de los niveles de PCR y opciones terapéuticas

La meta primaria de los programas de escrutinio cardiovascular es identificar individuos de alto riesgo en quienes se puedan modificar factores de riesgo tradicionales como tabaquismo, sedentarismo y dieta, así como lograr un control adecuado de la presión arterial, diabetes y dislipidemia. Una vez alcanzado este objetivo, la cuantificación en suero de la PCR se presenta como una herramienta adicional de predicción de riesgo útil para el clínico.

Actualmente no hay evidencia definitiva de que al disminuir los niveles de PCR se reduzca el riesgo cardiovascular. Sin embargo, muchas intervenciones reconocidas para disminuir el riesgo cardiovascular (pérdida de peso, dieta, ejercicio y suspensión de tabaquismo) se asocian con reducciones en las concentraciones séricas de PCR.

Varios agentes farmacológicos que reducen el riesgo cardiovascular modifican los niveles de PCR. El uso de diferentes estatinas (inhibidores de HMGCoA-reductasa) como pravastatina, lovastatina, cerivastatina, simvastatina y atorvastatina ha mostrado que, en promedio, disminuyen los niveles de PCR en un 15 a 25% a las 6 semanas de tratamiento. Los estudios CARE<sup>31</sup> y PRINCE<sup>30</sup> han mostrado que la magnitud en la disminución de LDL no guarda ninguna relación con la magnitud en la disminución de la PCR. Más aún, prácticamente la totalidad de los pacientes que reciben estatinas muestra disminución en los niveles de LDL, mientras que para la PCR se observa un claro patrón de pacientes con y sin respuesta. En el estudio CARE se mostró que el beneficio de la terapia con estatinas varió según las concentraciones de PCR, siendo la magnitud del beneficio de 55% para los que tienen la PCR elevada y de 30% en los que tienen PCR baja.<sup>32</sup>

Ridker y colaboradores han demostrado que los pacientes que alcanzan una cuantificación de PCR < 2 mg/L después del tratamiento con estatinas tienen mejores desenlaces cardiovasculares que aquellos con concentraciones > 2 mg/L, independientemente de la concentración sérica de LDL.<sup>33,34</sup> Otros agentes hipolipemiantes como fibratos, niacina y gemfibrozil también han mostrado reducir los niveles de PCR, aunque su efecto para disminuir el riesgo cardiovascular no se conoce.<sup>9</sup> La magnitud del efecto de la aspirina también parece guardar alguna relación con la determinación basal de PCR, pudiendo ser mayor en los pacientes con PCR elevada.<sup>35</sup> De igual manera, se ha observado que las tiazolidendionas también modifican los niveles de PCR en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, aunque su potencial beneficio cardiovascular se desconoce.<sup>36</sup>

Recientemente, Pepys y colaboradores<sup>37</sup> han demostrado en un modelo de rata que al bloquear directamente la PCR con moléculas construidas por diseño (1,6-bis[fosfocolina]-hexano), se disminuye la extensión de la necrosis posterior al infarto de miocardio inducido. Este efecto protector es dependiente del sistema del complemento. Las implicaciones patogénicas y terapéuticas derivadas de este estudio son muy promisorias a mediano plazo.<sup>38</sup>

#### Conclusión

La PCR tiene múltiples efectos pro-inflamatorios y exacerba el daño tisular en diferentes pa-

tologías, llevando a una enfermedad más grave. Por otra parte, su deficiencia facilita el desarrollo de fenómenos de autoinmunidad, como el lupus eritematoso generalizado. La buena correlación de la concentración circulante de PCR con la gravedad, extensión y progresión de muchas patologías, es congruente con la idea de que esta proteína no es sólo un marcador sistémico de inflamación, sino que es un contribu-

yente directo en la patogénesis de diferentes enfermedades en las que participa la respuesta inmune innata.

Tanto para entender los mecanismos patogénicos reflejados en un valor elevado de PCR como para modificar el curso natural de sus potenciales complicaciones, es imperativo un nivel de conocimientos adecuado sobre esta proteína de fase aguda.

### Referencias

- PEPYS MB, BALTZ ML: *Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentraxins) and serum amyloid A protein*. *Adv Immunol* 1983; 34: 141-212.
- BALTZ ML: *Phylogenetic aspects of C-reactive protein and related proteins*. *Ann NY Acad Sci* 1982; 389: 49-75.
- GEKSHOV D, KIM S, BROTN N, ELKON KB: *C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implication for systemic autoimmunity*. *J Exp Med* 2000; 192: 1353-63.
- PEPYS MB, ROWE IF, BALTZ ML: *C-reactive protein: binding to lipids and lipoproteins*. *Int Rev Exp Pathol* 1985; 27: 83-111.
- BICKERSTAFF MCM: *Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity*. *Nat Med* 1999; 5: 694-7.
- VIGUSHIN DM, PEPYS MB, HAWKINS PN: *Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease*. *J Clin Invest* 1993; 91: 1351-7.
- KUSHNER I: *Acute phase response*. *Clin Aspects Autoimmunity* 1989; 3: 20-30.
- HUTCHINSON WL, KOENIG W, FRHLICH M, SUND M, LOWE GDO, PEPYS MB: *Immunoradiometric assay of circulating C-reactive protein: age-related values in the adult general population*. *Clin Chem* 2000; 46: 934-8.
- RIDKER PM: *Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention*. *Circulation* 2003; 107: 363-9.
- BALLOU SP, KUSHNER I: *Laboratory evaluation of inflammation*. En Ruddy S, Harris ED, Sledge CB (Eds): *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Philadelphia, JB Saunders Company, 2001: 697-703.
- DE BEER FC, HIND CR, FOX KM, ALLAN RM, MASERI A, PEPYS MB: *Measurement of serum C-reactive protein concentration in myocardial ischaemia and infarction*. *Br Heart J* 1982; 47: 239-43.
- LAGRAND WK, NIESSEN HW, WOLBINK GJ, JASPARS LH, VISSER CA, VERHEUTH FW, ET AL: *C-reactive protein colocalizes with complement in human hearts during acute myocardial infarction*. *Circulation* 1997; 95: 97-103.
- GRISELLI M, HERBERT J, HUTCHINSON WL, TAYLOR KM, SOHAIL M, KRAUSZ T, ET AL: *C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction*. *J Exp Med* 1999; 190: 1733-40.
- SAKKINEN P, ABBOTT RD, CURB JD, RODRIGUEZ BL, YANO K, TRACY RP: *C-reactive protein and myocardial infarction*. *J Clin Epidemiol* 2002; 55: 445-51.
- RIDKER PM, RIFAI N, ROSE L, BURING JE, COOK NR: *Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular event*. *N Engl J Med* 2002; 347: 1557-65.
- TRACY RP, LEMAITRE RN, PSATY BM, IVES DG, EVANS RW, CUSHMAN M, ET AL: *Relationship of C-reactive protein to risk of cardiovascular disease in the elderly. Results from the Cardiovascular Health Study and the Rural Health Promotion Project*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1121-7.
- KOENIG W, SUND M, FRHLICH M, FISCHER HG, LOWEL H, DORING A, ET AL: *C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy-middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992*. *Circulation* 1999; 99: 237-42.
- PRADHAN AD, MANSON JE, ROSSOUW JE, SISCOVIC DS, MOUTON CP, RIFAI N, ET AL: *Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease: prospective analysis from the Women's Health Initiative observational study*. *JAMA* 2002; 288: 980-7.
- MENDALL MA, STRACHAN DP, BUTLAND BK, BALLAM L, MORRIS J, SWEETNAM PM, ET AL: *C-reactive protein: relation to total mortality, cardiovascular mortality and cardiovascular risk factors in men*. *Eur Heart J* 2000; 21: 1584-90.
- ALBERT MA, DANIELSON E, RIFAI N, RIDKER PM: *Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the Pravastatin Inflammation/CRP Evalua-*

- tion (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA* 2001; 286: 64-70.
21. RIDKER PM, GLYNN RJ, HENNEKENS CH: *C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction*. *Circulation* 1998; 97: 2007-11.
  22. DANESH J, WHEELER JG, HIRSCHFELD GM, EDA S, EIRIKSDOTTIR G, RUMLEY A, ET AL: *C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease*. *N Engl J Med* 2004; 350: 1387-97.
  23. WILSON PW, NAM BH, PENCINA M, D'AGOSTINO RB SR, BENJAMIN EJ, O'DONNELL CJ: *C-reactive protein and risk of cardiovascular disease in men and women from the Framingham Heart Study*. *Arch Intern Med* 2005; 165: 2473-8.
  24. RIDKER PM, COOK N: *Clinical usefulness of very high and very low levels of C-reactive protein across the full range of Framingham Risk Scores*. *Circulation* 2004; 109: 1955-9.
  25. RIDKER PM, RIFAI N, COOK NR, BRADWIN G, BURING JE: *Non-HDL cholesterol, apolipoproteins A-I and B100, standard lipid measures, lipid ratios, and CRP as risk factors for cardiovascular disease in women*. *JAMA* 2005; 294: 326-33.
  26. ZWAKA TP, HOMBACH V, TORZEWSKI J: *C-reactive protein-mediated low-density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis*. *Circulation* 2001; 103: 1194-7.
  27. JIALAL I, DEVARAJ S, VENUGOPAL SK: *C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis?* *Hypertension* 2004; 44: 6.
  28. BALLOU SP, LOZANSKI G: *Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein*. *Cytokine* 1992; 4: 361-8.
  29. WILLIAMS TN, ZHANG CX, GAME BA, HE L, HUANG Y: *C-reactive protein stimulates MMP-1 expression in U937 histiocytes through FcγRII and extracellular signal-regulated kinase pathway: An implication of CRP involvement in plaque destabilization*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 61-6.
  30. BLASCHKE F, BRUEMMER D, YIN F, TAKATA Y, WANG W, FISHBEIN MC, ET AL: *C-reactive protein induces apoptosis in human coronary vascular smooth muscle cells*. *Circulation* 2004; 110: 579-87.
  31. RIDKER PM, RIFAI N, PFEFFER MA, SACKS F, BRAUNWALD E: *Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators*. *Circulation* 1999; 100: 230-5.
  32. RIDKER PM, RIFAI N, PFEFFER MA, SACKS FM, MOYE LA, GOLDMAN S, ET AL: *Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators*. *Circulation* 1998; 98: 8439-44.
  33. RIDKER PM, RIFAI N, CLEARFIELD M, DOWNS JR, WEIS SE, MILES JS, ET AL: *Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events*. *N Engl J Med* 2001; 344: 1959-65.
  34. RIDKER PM, CANNON CP, MORROW D, RIFAI N, ROSE LM, MCCABE CH, ET AL: *C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy*. *N Engl J Med* 2005; 352: 20-8.
  35. RIDKER PM, CUSHMAN M, STAMPFER MJ, TRACY RP, HENNEKENS CH: *Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men*. *N Engl J Med* 1997; 336: 973-9.
  36. HAFFNER SM, GREENBERG AS, WESTON WM, CHEN H, WILLIAMS K, FREED MI: *Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus*. *Circulation* 2002; 106: 679-84.
  37. PEPYS MB, HIRSCHFELD GM, TENNENT GA, GALLIMORE JR, KAHAN MC, BELLOTTI V, ET AL: *Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease*. *Nature* 2006; 440: 1217-21.
  38. KITSIS RN, JIALAL I: *Limiting myocardial damage during acute myocardial infarction by inhibiting C-reactive protein*. *N Engl J Med* 2006; 355: 513-5.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbate A, Biondi-Zoccai GG, Brugaletta S, Liuzzo G, Biasucci LM. C-reactive protein and other inflammatory biomarkers as predictors of outcome following acute coronary syndromes. *Semin Vasc Med.* 2003;3:375-384.
- Alam SE, Nasser SS, Fernainy KE, Habib AA, Badr KF. Cytokine imbalance in acute coronary syndrome. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4:166-170.
- Alber DG, Powell KL, Vallance P, Goodwin DA, Grahame-Clarke C. Herpesvirus infection accelerates atherosclerosis in the apolipoprotein E deficient mouse. *Circulation* 2000;102:779-785.
- Albert MA, Glynn RJ, Ridker PM. Alcohol consumption and plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation* 2003;107:443-7.
- Albert CM, Ma J, Rifai N, Stampfer MJ, Ridker PM. Prospective study of C-reactive protein, homocysteine, and plasma lipid levels as predictor of sudden cardiac death. *Circulation* 2002;105:2595-2599.
- Alsheik-Ali AA, Kitsios GD, Balk EM, Lau J, Ip S. The vulnerable atherosclerotic plaque scope of the literature. *Ann Intern Med.* 2010;153:387-395.
- Amezcu-Guerra LM, Springall R, Bojalil R. Proteín C Reactiva: Aspectos cardiovasculares de una proteína de fase aguda. *Arch Card Mex.* 2007;77:58-66.
- Ardans JA, Economou AP, Matinson JM Jr, Zhou M, Wahl LM. Oxidized low-density and high-density lipoproteins regulate the production of matrix metalloproteinases-1 and -9 by activated monocytes. *J Leukoc Biol.* 2002;71:1012-1018.
- Arenas IA, Xu Y, Lopez-Jaramillo P, Dvidge ST. Angiotensin II-induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;286:C779-84.
- Azar RR, Waters DD. The inflammatory etiology of unstable angina. *Am Heart J.* 1996 Nov;132(5):1101-6.
- Barillari G, Albonici L, Incerpi S, Bogetto L, Pistrutto G, Volpi A, et al. Inflammatory cytokines stimulate vascular smooth muscle cell locomotion and growth by enhancing alpha5-beta 1 integrin expression and function. *Atherosclerosis* 2001;154:377-85.
- Bar-Or A, Nuttall RK, Duddy M, Alter A, Kim HJ, Ifergan I, Pennington CJ, Bourgoin P, Edwards DR, Yong VW. Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain* 2003;126:2738-2749.
- Baumann H, Gauldie J. Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. *Mol Biol Med.* 1990; 7: 147-159.
- Bennett MR. Breaking the plaque. Evidence for plaque rupture in animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 713-714.
- Berk BC, Weinrub WS, Alexander RW. Elevation of C-reactive protein in "active" coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1990;65:168-172.

Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demes LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ: Atherosclerosis: Basic mechanisms oxidation, inflammation and genetics. *Circulation* 1995;91:2488-2496.

Biasucci LM, Colizzi C, Rizzello V, et al. Role of inflammation in the pathogenesis of unstable coronary artery diseases. *Scan J Clin Lab Invest Suppl.* 1999;230:12-22.

Biasucci LM, Gitelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C, Rebuzzi AG, Ciliberto G, Maseri A. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation.* 1996;94:874-877.

Biasucci LM, Liuzzo G, Fabuzzi G, Caligiuri G, Rebuzzi AG, Ginnetti F, Dinarello CA, Maseri A. Increasing levels of IL-1ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events. *Circulation.* 1999;99:2079-2084.

Biasucci LM, Santamaria M, Liuzzo G. Inflammation, atherosclerosis and acute coronary syndromes. *Minerva Cardioangiol.* 2002 Oct;50(5):475-86.

Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, et al. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation.* 1996;94:874-877.

Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, Witztum JL. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nature Medicine* 2002;8(11):1218-26.

Blake GJ, Ridker PM. Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. *J Intern Med.* 2002 Oct;252(4):283-94.

Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, et al. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 2003; 349:1605-1613.

Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation.* 2003;107:1579-1585.

Blaschke F, Bruemmer D, Yin F, Takata Y, Wang W, Fishbein MC, Okura T, Higaki J, Graf K, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. C-Reactive protein induces apoptosis in human coronary vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 2004;110-579-587.

Boekholdt SM, Peters RJ, Day NE, Luben R, Bingham SA, Wareham NJ, Hack CE, et al. Macrophage migration inhibitory factor and the risk of myocardial infarction or death due to coronary artery disease in adults without prior myocardial infarction or stroke: the EPIC-Norfolk Prospective Population study. *Am J Med.* 2004 Sep 15;117(6):390-7.

Boekholdt SM, Peters RJ, de Maat MP, Zwinderman AH, van Der Wall EE, Reitsma PH, Jukema JW, Kastelein JJ. Interaction between a genetic variant of the platelet fibrinogen receptor and fibrinogen levels in determining the risk of cardiovascular events. *Am Heart J.* 2004 Jan;147(1):181-6.

Boekholdt SM, Kuivenhoven JA, Wareham NJ, Peters RJ, Jukema JW, Luben R, Bingham SA, Day NE, Kastelein JJ, Khaw KT. Plasma levels of cholesteryl ester transfer protein and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the prospective EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and nutrition)-Norfolk population study. *Circulation.* 2004 Sep 14;110(11):1418-23.

Boekholdt SM, Peters RJ, Hack CE, Day NE, Luben R, Bingham SA, Wareham NJ, Reitsma PH, Khaw KT. IL-8 plasma concentrations and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Aug;24(8):1503-8.

De Boer OJ, van der Wal AC, Teeling P, Becker AE. Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization? *Cardiovasc Res.* 1999;41:443-449.

Bouhlel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dievart R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Steals B, Chinetti-Gbaguidi G. PPAR $\gamma$  activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab.* 2007;6:137-143.

Boyle JR, Raptis S. Validity of the Glasgow Aneurysm Score and the Hardman Index in predicting outcome after ruptured abdominal aortic aneurysm repair (*Br J Surg* 2005; 92: 570-573). *Br J Surg.* 2005 Sep;92(9):1179. No abstract available.

Boyle AJ, Schuster M, Witkowski P, Xiang G, Seki T, Way K, Itescu S. Additive effects of endothelial progenitor cells combined with ACE inhibition and beta-blockade on left ventricular function following acute myocardial infarction. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2005 Mar;6(1):33-7.

Boyle K, Azari MF, Cheema SS, Petratos S. TNF $\alpha$  mediates Schwann cell death by upregulating p75<sup>NTR</sup> expression without sustained activation of NF $\kappa$ B. *Neurobiol Dis.* 2005 Nov;20(2):412-27.

Boyle AJ, Kelly DJ, Zhang Y, Cox AJ, Gow RM, Way K, Itescu S, Krum H, Gilbert RE. Inhibition of protein kinase C reduces left ventricular fibrosis and dysfunction following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2005 Aug;39(2):213-21.

Boyle JJ. Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol.* 2005 Jan;3(1):63-8. Review.

Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochem Biophys Acta.* 2000;1477:267-283.

Brown D, Hibbs MS, Kearney M, Loushin C, Isner JM. Identification of 92-kDa gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation.* 1995;91:2125-2131.

Buja LM, Willerson JT. Role of inflammation in coronary plaque disruption. *Circulation.* 1994 Jan;89(1):503-5.

Buono C, Binder CJ, Stavakis G, Witztum JL, Climcher LH, Lichtman AH. T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:1596-601.

Caligiuri G, Paulsson G, Nicoletti A, Maseri A, Hansson GK. Evidence for antigen-driven T-cell response in unstable angina. *Circulation* 2000;102:1114-9.

Castrillo A, Joseph SB, Marathe C, Magelsdorf DJ, Tontonoz P. Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *J Biol Chem* 2003;278:10443-10449.

Cavusoglu E, Ruwende C, Chopra V, Yanamadala S, Eng C, Clark LT et al, Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) is an independent predictor of all-cause mortality, cardiac mortality, and myocardial infarction. *Am Heart J.* 2006;151(5):1101 el-8.

Chapoval AI, Kamdar SJ, Kremelov SG et al. CSF-1 (M-CSF) differentially sensitizes mononuclear phagocyte subpopulations to endotoxin in vivo: a potential pathway that regulates the severity of gram-negative infections. *J Leukoc Biol.* 1998;63:245-252.

Cheng M, Hashmi S, Mao X, Zeng QT. Relationships of adiponectin and matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio with coronary plaque morphology in patients with acute coronary syndromes. *Can J Cardiol.* 2008;24:385-390.

Chierchia SL. Inflammation and acute coronary syndromes]. *Rev Esp Cardiol.* 2001 Oct;54(10):1135-40.

Chierchia S, Fragasso G. The primary and secondary prevention of ischemic cardiopathy. *Ital Heart J.* 2000 Jun;1 Suppl 2:50-8

Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Wahl LM. Interleukin 4 inhibition of prostaglandin E2 synthesis blocks interstitial collagenase and 92-kDa type IV collagenase/gelatinase production by human monocytes. *J Biol Chem.* 1992;267:515-519.

Cornicelli JA, Butteiger D, Rateri DL, Welch K, Daugherty A. Interleukin-4 augments acetylated LDL-induced cholesterol esterification in macrophages. *J Lipid Res.* 2000 Mar;41(3):376-83.

Cornicelli JA, Witte LD, Goodman DS. Inhibition of LDL degradation in cultured human fibroblasts induced by endothelial cell-conditioned medium. *Arteriosclerosis.* 1983 Nov-Dec;3(6):560-7.

Cornicelli JA, Butteiger D, Rateri DL, Welch K, Daugherty A. Interleukin-4 augments acetylated LDL-induced cholesterol esterification in macrophages. *J Lipid Res.* 2000 Mar;41(3):376-83.

Corrales-Medina VF, Madjid M, Musher DM. Role of acute infection in triggering acute coronary syndromes. *Lancet Infect Dis.* 2010 Feb;10(2):83-92. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70331-7.

Corrales-Medina VF, Serpa J, Rueda AM, et al. Acute bacterial pneumonia is associated with the occurrence of acute coronary syndromes. *Medicine (Baltimore)* 2009;88:154-159.

Corti R., Fuster V, Badimonn JJ. Pathogenetic concepts of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:7S-14S

Crossman DC, Morton AC, Gunn JP, Greenwood JP, Hall AS, Fox KA, Lucking AJ, Flather MD, Lees B, Foley CE. Investigation of the effect of Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on markers of inflammation in non-ST elevation acute coronary syndromes (The MRC-ILA-HEART Study). *Trials* 2008;9:8.

Danesh J, Wheeler JG, Hirschfeld GM et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2004;350:1387-97.

Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: Role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br. Heart J.* 1993;69:377-381.

Davies MJ. Reactive oxygen species, metalloproteinases and plaque stability. *Circulation* 1998;97:2382-2383.

Davies MJ, Thomas A. Thrombosis and acute coronary artery lesions in sudden cardiac ischemia death. *N Engl J Med.* 1984; *Myao* 3:310(18):1137-1140.

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;107:690-695.

Death AK, Fisher EJ, McGrath KCY, Yue DK. High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: potential impact on atherosclerosis in diabetes. *Atherosclerosis* 2003;168:263-269.

Derosa G, D'Angelo A, Scalise F, Avanzini MA, Tinelli C, Peros E, Fogari E, Cicero AF. Comparison between metalloproteinases-2 and -9 in healthy subjects, diabetics, and subjects with acute coronary syndrome. *Heart Vessels.* 2007 Nov;22(6):361-70. Epub 2007 Nov 26

Derosa G, Cicero AF, Scalise F, Avanzini MA, Tinelli C, Peros E, Fogari E, D'Angelo A. Metalloproteinases in diabetics and nondiabetics during acute coronary syndromes and after 3 months. *Endothelium.* 2007 Jul-Oct;14(4-5):175-83.

Derosa G, D'Angelo A, Tinelli C, Devangelio E, Consoli A, Miccoli R, Penno G, Del Prato S, Paniga S, Cicero AF. Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in diabetic and healthy subjects. *Diabetes Metab.* 2007 Apr;33(2):129-34. Epub 2007 Feb 22.

Dinarello CA, Pomerantz BJ. Proinflammatory cytokines in heart disease. *Blood Purif* 2001;19(3):314-21.

Ding G, Cheng L, Qin Q, Frontin S, Yang Q. PPARdelta modulates lipopolysaccharide-induced TNFalpha inflammation signaling in cultured cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2006 Jun;40(6):821-8. Epub 2006 May 15.

Ding SF, Zhang Y, Zhang M, Chen WQ, Chen YG, Li JF, Ji QS, Li GS. The role of atherosclerotic plaque stability and inflammation in the pathogenesis of acute coronary syndrome. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* 2006 Jun;34(6):512-4.

Dollery CM, Libby P. Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc Res.* 2006; 69: 625–635.

Eckart RE, Uyehara CF, Shry EA, Furgerson JL, Krasuski RA. Matrix metalloproteinases in patients with myocardial infarction and percutaneous revascularization. *J Interv Cardiol.* 2004;17:27-31.

Elmas E, Lang S, Dempfle CE, Kälsch T, Hannak D, Sueselbeck T, Wolpert C, Borggrefe M, Brueckmann M. High plasma levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and interleukin-8 (IL-8) characterize patients prone to ventricular fibrillation complicating myocardial infarction. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45(10):1360-5.

Espínola-Klein C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, Bickel C, Kopp H, Rippin G et al. Impact of infectious burden on extent and long-term prognosis of atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:15-21.

Fabunmi RP, Sukhova GK, Sugiyama S, Libby P. Expression of TIMP-3 in human atheroma and regulation in lesion-associated cells: a potential protective mechanism in plaque stability. *Circ Res.* 1998; 83: 270–278.



Falk E, Shah PK, Fuster V. Pathogenesis of plaque disruption. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, etd. Atherosclerosis and coronary artery disease. Vol. 2 Philadelphia: Lippincott-Raven. 1996:492-510.

Fan H, Teti G, Ashton S, Guyton K, Tempel GE, Halushka PV, Cook JA. Involvement of G(i) proteins and Src tyrosine kinase in TNF $\alpha$  production induced by lipopolysaccharide, group B Streptococci and Staphylococcus aureus. Cytokine. 2003 Jun 7;22(5):126-33.

Fan J, Frey RS, Malik AB. TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase. J Clin Invest. 2003 Oct;112(8):1234-43

Faxon DP, Creager MA, Smith SC, Pasternak RC, Olin JW, Bettmann MA, Criqui MH, Milani RV, Loscalzo J, Kaufman JA, Jones DW, Pearce WH. Atherosclerotic vascular Disease conference. Atherosclerotic vascular disease conference proceeding from healthcare professionals from a special writing group of the American Heart Association. Circulation. 2004;109:2595-2604.

Fernandes JL, Orford JL, Garcia C, Coelho OR, Gidlund M, Blotta MH. Differences in human autoantibodies in patients with stable and unstable angina. J Autoimmun. 2004 Dec;23(4):345-52. Erratum in: J Autoimmun. 2005 Mar;24(2):181.

Fernandes JL, Mamon RL, Orford JL, Garcia C, Selwyn AP, Coelho OR, Blotta MH. Increased Th1 activity in patients with coronary artery disease. Cytokine. 2004 May 7;26(3):131-7.

Ferroni P, Basili S, Martini F, Carderello CM, Ceci F, Di Franco M et al. Serum metalloproteinase-9 levels in patients with coronary artery disease: a novel marker of inflammation. J Investig Med. 2003;51:295-300.

Fiotti N, Altamura N, Orlando C, Simi L, Reimers B, Pascotto P, Zingone B, Pascotto A, Serio M, Guarnieri G, Giansante C. Metalloproteinases-2, -9 and TIMP-1 expression in stable and unstable coronary plaques undergoing PCI. Int J Cardiol. 2008 Jul 21;127(3):350-7.

Fitzgerlald JR, Foster TJ, Cox D. The interaction of bacterial pathogens with platelets. Nt Rev Microbiol 2006;4:445-457.

Fukuda D, Shimada K, Tanaka A, Kusuyama T, Yamashita H, Ehara S, Nakamura Y, Kawarabayashi T, Iida H, Yosiyama M, Yosikawa J. Comparison of levels of serum matrix metalloproteinase-9 in patients with acute myocardial infarction versus unstable angina pectoris versus stable angina pectoris.

Furenes EB, Arnesen H, Solheim S, Groggaard HK, Hoffman P, Seljeflot I. The profile of circulating metalloproteinases before PCI in patients with acute myocardial infarction or stable angina. Thromb Res. 2009 Nov;124(5):560-4.

Fuster V, Fallon JT, Nemerson Y. Coronary thrombosis. Lancet. 1996;348 (Suppl):S7-S10.

Fuster V, Fayad ZA, Badimon JJ. Acute coronary syndromes: biology. Lancet 1999;Jun;353 Suppl 2:III5-9.

Fyfe AI, Rothenberg LS, DeBeer FC, Cantor RM, Rotter JI, Lusis AJ. Association between serum amyloid A proteins and coronary artery disease: evidence from two distinct arteriosclerotic processes. Circulation. 1997;96:2914-2919.

Galis ZS, Ghitescu LD, Li Z, Alavi MZ, Moore S. Distribution of endogenous apoprotein B-containing lipoproteins in normal and injured aortas of normocholesterolemic rabbits. Lab Invest. 1992 May;66(5):624-38.

Galis ZS, Alavi MZ, Moore S. In situ ultrastructural characterization of chondroitin sulfate proteoglycans in normal rabbit aorta. *J Histochem Cytochem.* 1992 Feb;40(2):251-63.

Galis ZS, Sukhova G, Lark M, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J. Clin Invest.* |1994;94:2493-2503.

Galkina E, Ley K. Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* 2009;27:165-197.

García-Moll X. Marcadores de inflamación y de antiinflamación en el síndrome coronario agudo: ¿listos para usarlos en la práctica clínica?. *Rev Esp Cardiol.* 2005;58:615-7.

Geissmann F, Auffray C, Palframan R, Wirrig C, Ciocca A, Campisi L, Narni-Macncinelli E, Lauvau G. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol.* 2008;86:398-408.

Geng YJ. Biologic effect and molecular regulation of vascular apoptosis in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2001 May;3(3):234-42.

Geng YJ, Hansson GK. Interferon-g inhibits scavenger receptor expression and foam cell formation in human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest.* 1992;89:1322-1330.

Geng YJ, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma: colocalization with interleukin-1 beta converting enzyme. *Am J Pathol* 1995;147:251-66.

Giasante C, Fiotti N, Di Chaiara A, Altamura N, Wasserman S, Fioretti P, Guarnieri G. In hospital outcome of patients with acute coronary syndrome: relationship with inflammation and remodeling markers. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2007 Aug; 8(8):602-607.

Glass C, Witztum J. Atherosclerosis, the road ahead. *Cell* 2001;104:503-516.

Gordon SB, Jarman ER, Kanyanda S, French N, Pridmore AC, Zijlstra EE, Molyneux ME, Read RC. Reduced interleukin-8 response to *Streptococcus pneumoniae* by alveolar macrophages from adults with HIV/AIDS. *AIDS.* 2005 Jul 22;19(11):1197-200.

Gordon LB, Harten IA, Patti ME, Lichtenstein AH. Reduced adiponectin and HDL cholesterol without elevated C-reactive protein: clues to the biology of premature atherosclerosis in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *J Pediatr.* 2005 Mar;146(3):336-41.

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005 Dec;5(12):953-64.

Goswami B, Rajappa M, Mallika V, Shukla DK, Kumar S. TNF-alpha/IL-10 ratio and C-reactive protein as markers of the inflammatory response in CAD-prone North Indian patients with acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta.* 2009 Oct;408(1-2):14-8.

Grainger DJ, Kemp PR, Metcalfe JC, Liu AC, Lawn RM, Williams NR, Grace AA, Schofield PM, Chauhan A. The serum concentration of active transforming growth factor-B is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat Med.* 1995; 1: 74-79.

Grainger DJ. Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good from the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:399-404.

Gando S, Kamueye T, Morimoto Y, Matsuda N, Hayakawa M, Kemmotsu O. Tissue factor production not balanced by tissue factor pathway inhibitor in sepsis promotes poor prognosis. *Crit Care Med* 2002;30:1729-1734.

Grau AJ, Boddy AW, Dikovic DA, et al. Leukocyte count as independent predictor of recurrent ischemic events. *Stroke* 2004;35:1147-1152.

Gupta S, Pablo AM, Jiang XC, et al. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in apoE knock-out mice. *J Clin Invest*. 1997;99:2752-2761.

Hamm CW, Braunwald E. A classification of unstable angina revisited. *Circulation*. 2000;102:118-122.

Hanemaaijer R, Koolwijk P, le Clercq L, de Vree WJ, van Hinsbergh VW. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. *Biochem J*. 1993;296:803-809.

Hansson GK, Hellstrand M, Rymo L, Rubbia L, Gabbiani G. Interferon-gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells. *J Exp med*. 1989;170:1595-1608.

Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, and Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res*. 2002;91:281-291.

Hansson GK. Immune Mechanisms in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21:1876-1890.

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;1685-1695.

Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger WH Jr, Heimovitz H, Cohen HJ, Wallace R. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med*. 1999;106:506-512.

Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. *Lancet*. 1997;349:462-466.

Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW et al. Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2003;107:2109-2114.

Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response *Biochem J*. 1990;265: 621-636.

Hermann J, Lerman LO, Jukhopadhyay D, Napoli C, Lerman A. Angiogenesis in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1948-57.

Higashikata T, Yamagishi M, Higashi T, Nagata I, Iihara K, Miyamoto S, Ishibashi-Ueda H, Nagaya N, Iwase T, Tomoike H, Sakamoto A. Altered expression balance of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human carotid plaque disruption: results of quantitative tissue analysis using real-time RT-PCR method. *Atherosclerosis*. 2006 Mar;185(1):165-72. Epub 2005 Jul 21.

- Hirohata S, Kusachi S, Murakami M, et al. Time dependent alterations of serum matrix metalloproteinase-1 and metalloproteinase-1 tissue inhibitor after successful reperfusion of acute myocardial infarction. *Heart* 1997;78:278-284.
- Hochart H, Jenkins PV, Preston RJ, Smith OP, White N, O'Donnell J. Concentration-dependent roles for heparin in modifying lipopolysaccharide-induced activation of mononuclear cells in whole blood *Thromb Haemost.* 2008;99:570-575.
- Huang Y, Song L, Wu S, Fan F, Lipes-Virella MF. Oxidized LDL differentially regulates MMP-1 and TIMP-1 expression in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2001;156:119-25.
- Hwang JJ, Yang WS, Chiang Ft, et al. Association of circulating matrix metalloproteinase-1, but not adiponectin, with advanced coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2009;204:293-297.
- Huang YH, Schafer-Elinder L., Wu R, Cleasson HE, Frostegard J. Lysophosphatidylcholine (LPC) induces proinflammatory cytokines by a platelet-activating factor (PAF) receptor-dependent mechanisms. *Clin Exp Immunol.* 1999;116:326-331.
- Inokubo Y, Hanada H, Ishizaka H, Fukushi T, Kamada T, Okumura K. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are increased in the coronary circulation in patients with acute coronary syndrome. *Am Heart J.* 2001;141:211-7.
- Inoue T, Kato T, Takayanagi K, et al. Circulating matrix metalloproteinase-1 and -3 in patients with an acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 2003;92:1461-1464.
- Inoue S, Egashir K, Ni W, Kitamoto S, Usui M, Otani K, Ishibashi M, Hiasa K, Nishida K, Takeshita A. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression, and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation.* 2002;106:2700-2706.
- Jessup W, Dean RT. Autoinhibition of murine macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein by nitric oxide synthesis. *Atherosclerosis* 1993;101:145-55.
- Jessup W, Dritharides L, Stlecker R. Lipid oxidation in atherogenesis: an overview. *Biochem Soc. Trans.* 2004;32:134-138.
- Johnson JL, Fritsche-Danielson R, Behrendt M, Westin-Eriksson A, Wennbo H, Herslof M, Elebring M, George SJ, McPheat WL,
- Jackson CL. Effect of broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibition on atherosclerotic plaque stability. *Cardiovasc Res.* 2006; 71: 586-595.
- Johnson JL. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2007;5:265-82.
- Jude B, Agraou B, McFadden EP, Susen S, Bauters C, Lipelly P, Vanhaesbroucke C, Devos P, Cosson A, Asseman P. Evidence for time-dependent activation of monocytes in the systemic circulation in unstable angina but not in acute myocardial infarction or in stable angina. *Circulation.* 1994;90:1662-1668.
- Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, et al. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes., *J Am Coll Cardiol.* 1998;36:8-72.

Kalela A, Koivu TA, Sisto T, Kanervisto J, Hoyhtya M, Sillanaukee P, et al. Serum matrix metalloproteinase-9 concentration in angiographically assessed coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest.* 2002;62:337-42.

Kamdar SJ, Fuller JA, Nishikawa SI, et al. Priming of mouse macrophages with the macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) induces a variety of pathways that regulate expression of the interleukin 6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genes. *Exp Cell Res.* 1997;235:108-116.

Kaski JC, Fernandez-Berges KJ, Consuegra-Sanchez L, et al. A comparative study of biomarkers for risk prediction in acute coronary syndrome- Results of the SIESTA (Systemic Inflammation Evaluation in non-ST.elevation Acute coronary syndrome) study. *Atherosclerosis* 2010;212(2):636-643.

Keaney JF Jr, Vita JA. The value of inflammation for predicting unstable angina. *N Engl J Med.* 2002;347:55-57.

Khan KM, Howe LR, Falcone DJ. Extracellular matrix-induced cyclooxygenase-2 regulates macrophage proteinase expression. *J Biol Chem.* 2004;279:22039-22046.

Kim SH, Lee WH, Kwon BS, et al. Tumor necrosis factor receptor superfamily may destabilize atherosclerotic plaques by inducing matrix metalloproteinases. *Jpn Circ J.* 2001;65:136-138.

Koenig W, Lowel H, Baumert J, Leisinger C. C-reactive protein modulates risk prediction based on the Framingham Score: Implications for future risk assessment: results from a large cohort study in Southern Germany. *Circulation.* 2004 Mar 23 ; 109 (11 ): 1349-53. Epub 2004 Mar 15.

Kolodgie FD, Virmani GM, Burke AP, et al. Pathologic assessment of the vulnerable human coronary plaque. *Heart* 2004;90(12):1385-1391..

Kovanen PT, Kaartinen M, Paavonen T. Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation.* 1995;92:1084-1088.

Kułaach A, Dąbek J, Głogowska-Ligus J, Garczorz W, Gaşior Z. Effects of standard treatment on the dynamics of matrix metalloproteinases gene expression in patients with acute coronary syndromes. *Pharmacol Rep.* 2010 Nov-Dec;62(6):1108-16.

Kulach A, Dabek J, Wilczok T, Gasior Z.Changes in transforming growth factor  $\beta$  and its receptors' mRNA expression in monocytes from patients with acute coronary syndromes. *Arch Med Sci.* 2010 Aug 30;6(4):526-32. doi: 10.5114/aoms.2010.14463. Epub 2010 Sep 7.

Kuller LH, Tracy RP, Shaten J, et al. Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study. *Multiple Risk Factor Intervention Trial.* *Am J Epidemiol,* 1996;144:537-47.

Kushner I. C-reactive protein and the acute-phase response. *Hos Pract.* 1990;30(25):21-8.

Lacraz S, Nicod L, Galve de Rochemonteix B, Baumberger C, Dayer JM, Welgus HG. Suppression of metalloproteinase biosynthesis in human alveolar macrophages by interleukin-4. *J Clin Invest.* 1992;90:382-388.

Lacraz S, Dayer JM, Nicod L, Wlegus HG. 1,25-dihydroxyvitamin D3 dissociates production of intersetiatal collagenase and 92-KDa gelatinase in human mononuclear phagocytes. *J Biol Chem.* 1994;269:6485-6490.

- Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayers JM. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J clin Invest* . 1995; 96: 2304-2310.
- Lafrenie RM, Wahl LM, Epstein JS, Yamada KM, Dhawan S. Activation of monocytes by HIV-Tat treatment is mediated by cytokine expression. *J Immunol*. 1997 Oct 15;159(8):4077-83.
- Leber AW, Parhofer KG. MMP-1 serum levels predict coronary atherosclerosis in humans. *Cardiovasc Diabetol*. 2009 Sep 14;8:50. doi: 10.1186/1475-2840-8-50.
- Lavie CJ, Milani RV, Verma A, O'Keefe JH. C-reactive protein and cardiovascular diseases—is it ready for primetime? *Am J Med Sci* 2009 Dec;338(6):486-92.
- Lee WH, Lee Y, Kim JR, et al. Activation of monocytes, T-lymphocytes and plasma inflammatory markers in angina patients. *Exp Mol Med*. 1999;31:159-64.
- Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1859-67.
- Lehrke M, Greif M, Broedl UC, Lebherz C, Laubender RP, Becker A, von Ziegler F, Tittus J, Reiser M, Becker C, Göke B, Steinbeck G,
- Li Q, Park PW, Wilson CL, Parks WC. Matriksin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transendothelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell* 2002;111:635-646.
- Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med* 2002;8:1235-42.
- Li J, Zhao SP, Peng DQ, Zhou HN [Changes and relations of soluble plasma CD40L and matrix metalloproteinase-9 levels in patients with coronary heart disease. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2004 Oct;29(5):517-20. Chinese.
- Li YJ, Wang L, Chen KY, Chen YL, Cai JR, Zhou LJ. Comparison study on diagnostic and prognostic value of N-terminal pro-brain natriuretic peptide and atrium natriuretic peptide in chronic congestive heart failure]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2005 Sep;17(9):544-7. Chinese.
- Li AC, Palinski W. Peroxisome proliferator-activated receptors: how their effects on macrophages can lead to the development of a new drug therapy against atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006;46:1-39. Review.
- Li JJ. Inflammation: an important mechanism for different clinical entities of coronary artery diseases. *Chin Med J (Engl)*. 2005 Nov 5;118(21):1817-26. Review. No abstract available.
- Liang J, Liu E, Yu Y, Kitajima S, Koike T, Jin Y, et al. Macrophage metalloelastase accelerates the progression of atherosclerosis in transgenic rabbits. *Circulation*. 2006;113:1993-2001.
- Libby P, Lee RT. Matrix matters. *Circulation*. 2000;102:1874-6.
- Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev*. 2007 Dec;65(12 Pt 2):S140-6.
- Libby P, Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Diversity of denizens of the atherosclerotic plaque: not all monocytes are created equal. *Circulation*. 2008;117:3168-3170.

- Libby P, Lee RT. Matrix matters. *Circulation*. 2000;102:1874-6.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-1143.
- Libby P, Therous P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* . 2005;111:3481-3488.
- Libby P. Atherosclerosis: disease biology affecting the coronary vasculature. *Am J Cardiol*. 2006 Dec18;98(12A):3Q-9Q. Epub 2006 Oct 23.
- Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 2000, 247:349-358.
- Libby P, Ridker PM. Inflammation and atherothrombosis from population biology and bench research to clinical practice. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:A33-A46.
- Liu P, Sun M, Sader S. Matrix metalloproteinases in cardiovascular disease. *Can J Cardiol* 2006;22(Suppl B):25B-30B.
- Liuzzo G, Kopecky SL, Frye RL, et al. Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina. *Circulation*. 1999; 100: 2135-2139.
- Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med*, 1994;331:417-24.
- Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuffi AG, Pepys MB, Maseri A. Athero prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med*. 1994;331:417-424.
- Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang H, et al. Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2000; 102:2883-2888.
- Liuzzo G. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *Rays*. 2001 Oct-Dec;26(4):221-30.
- Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, Crowther M, Jones L, Bell PR, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption. *Stroke*. 2003;31:40-7.
- Lubos E, Schnabel R, Ruppercht HJ, Bickel C, Messow CM, Prigge S, Cambien F, Tiret L, Munzel T, Blankenberg S. Prognostic value of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 for cardiovascular death among patients with cardiovascular disease: results from the AtheroGene study. *Eur Heart J*. 2006;27:150-156.
- Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, Luster AD. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest*. 1999;104:1041-1050.
- Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:1931-1936.
- Mahmoudi M, Curzen N, Gallagher PJ. Atherogenesis: the role of inflammation and infection. *Histopathology*. 2007. Apr,50(5):535-46.
- Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamate C, Merval R, Fradelizi D, Tedgui A. Inhibition of transforming growth factor B signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res*. 2001; 89: 930-934.

- Manhapra A, Gupta R, Kasliwal RR. Systemic inflammation: The central factor in pathogenesis of unstable angina. *Circulation* 2001;103:e91.
- Manten A, de Winter RJ, Minnema MC, et al. Procoagulant and proinflammatory activity in acute coronary syndromes. *Cardiovasc Res*. 1998;40:389–395.
- Mathers, C. D., A. Lopez, C. Stein, D. Ma Fat, C. Rao, M. Inoue, and others. 2001. "Deaths and Disease Burden by Cause: Global Burden of Disease Estimates for 2001 by World Bank Country Groups." In *Disease Control Priorities Project Working Paper 18*. Bethesda, MD.
- Mattila KJ, Viral and bacterial infections in patients with acute myocardial infarction. *J Intern Med*. 1989;225:293-296.
- Mazzone A, de Servi S, Ricevuti G, et al. Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease. *Circulation*. 1993;88:358–363.
- Mendall MA, Strachan DP, Butland BK, et al. C-reactive protein relation to total mortality, cardiovascular mortality and cardiovascular risk factors in men. *Eur Heart J*, 2000;21:1584-90.
- Methe H, Kim JO, Kofler S, Weis M, Nabauer M, Koglin J. Expansion of circulating Toll-like receptors 4 positive monocytes in patients with acute coronary syndrome. *Circulation* 2005;111:2654-2661.
- Mire-Sluis A, Thorpe R. Cytokines. London: Academic Press; 1998.
- Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Ann Rev Physiol*. 1999;61:391-415.
- Morimoto H, Hirose M, Takahashi M, Kawaguchi M, Ise H, Kolattukudy PE, Yamada M, Ikeda U. MCP-1 induces cardioprotection against ischaemia/reperfusion injury: role of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res*. 2008 Jun 1;78(3):554-62.
- Morrow DA, Rifai N, Antman EM, et al. C-reactive protein is a potent predictor of mortality independently of an in combination with troponin T in acute coronary syndromes: a TIMI 11A substudy. *Thrombolysis in myocardial infarction*. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:1460-.
- Mulcahy R, Daly L, Graham I, Hickey N, O'Donoghue S, Owens A, Ruane P, Tobin G Unstable angina: natural history and determinants of prognosis. *Am J Cardiol*. 1981 Sep;48(3):525-8.
- Mulvihill NT, Foley JB. Inflammation in acute coronary syndromes. *Heart*. 2002;87:201-204.
- Munro JM, Cotran RS. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest*. 1988;58:249-261.
- Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic function of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology* 2011;11:723-37).
- Naghavi M, Falk E, Hecht HS, Jamieson MJ, Kaul S, Berman D, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient- Part III: Executive summary of the Screening for Heart Attack Prevention and Education (SHAPE). Task Force Report. *Am J Cardiol*. 2006;98:2H-15H.
- Naghavi M, Libby P, Falk E, Ward Casscells S, Litovsky S, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patients. A call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation*, 2003;108:1664-1672.



- Nakamura T, Ebihara I, Shimada N, Koide H. Effect of cigarette smoking on plasma metalloproteinase-9 concentration. *Clin Chim Acta* 1998;276:173-177.
- Nanni S, Melandri G, Hanemaaijer R, Cervi V, Tomasi L, Altimari A, Van Lent N, Tricoci P, Bacchi L, Branzi A. Matrix metalloproteinases in premature coronary atherosclerosis: influence of inhibitors, inflammation, and genetic polymorphisms. *Transl Res*. 2007 Mar;149(3):137-44.
- Newby AC. Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques. *Trends Cardiovasc Med* 2007;17:253-258.
- Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Dec;28(12):2108-14.
- Newby AC. Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques. *Trends Cardiovasc Med*. 2007 Nov;17(8):253-8..
- Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev*. 2005; 85: 1–31.
- Newby AC. Do metalloproteinases destabilize vulnerable atherosclerotic plaques? *Curr Opin Lipidol*. 2006; 17: 556–561.
- Nijm J, Wikby A, Tompa A, Olsson AG, Jonasson L. Circulating levels of proinflammatory cytokines and neutrophil-platelet aggregates in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2005 Feb 15;95(4):452-6.
- Noguchi T, Yamada N, Kawasaki T, Tanaka A, Yasuda S. Detection of high-risk atherosclerotic plaques by magnetic resonance imaging. *Circ J*. 2013;77(8):1975-83.
- Noji Y, Kajinami K, Kawashiri MA, Todo Y, Horita T, Nohara A et al. Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in premature coronary atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med*. 2001;39:380-384.
- Nold M, Goede A, Eberhard W, Pfeilschifter J, Muehl H. IL-18 initiates release of matrix metalloproteinase-9 from peripheral blood mononuclear cells without affecting tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1: suppression by TNF- $\alpha$  blockage and modulation by IL-10. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 2003; 367:68-75.
- Nordt TK, Peter K, Ruef J, Kubler W, Bode C. Plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-I) and its role in cardiovascular disease. *Thromb Haemost*. 1999;82(suppl 1):14-18.
- Oliviera RT, Mamoni RI, Souza JR, Fernandes JL, Rios FJ, Gidlund M, Coelho OR, Blotta MH. Differential expression of cytokines, chemokines and chemokine receptors in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2009;136:17-26.
- Opdenakker G, Van den Steen PE, Van Damme J. Gelatinase B. A tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol* 2001;22:571-579.
- Orbe J, Fernandez L, [Rodriguez JA, Rabago G, Belzunce M, Monasterio A, et al. Different expression of MMPs/TIMP-1 in human atherosclerotic lesions. Relation to plaque features and vascular bed. *Atherosclerosis*. 2003,170:269-76.

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 Aug;26(8):1837-44.

Paramo JA, Montero I, Rodriguez JA, Orbe J. Metaloproteasas en aterosclerosis: implicaciones fisiológicas y terapéuticas. *Clin Invest Artioscl.* 2005;17:133-141.

Paramo JA, Orbe J, Fernández J. Fibrinolysis/proteolysis balance in stable angina pectoris in relation to angiographic findings. *Thromb Haemost.* 2001;86:636-9.

Pasceri V, Cheng JS, Willerson JT, et al. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation.* 2001;103:2531-4.

Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation.* 2000;102:2165-8.

Pasqui AL, Di Renzo M, Bova G, et al. Proinflammatory/anti-inflammatory cytokine imbalance in acute coronary syndromes. *Clin Exp Med.* 2006;6:38-44.

Passlilck B, Fleiger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood.* 1989;74:2527-2534.

Patti G, D'Ambrosio A, Dobrina A, Dicuaonzo G, Giansante C, Fiotti N, Abbate A, Guarnieri G, DiSciascio G. Interleukin-1 receptor antagonist: a sensitive marker of instability in patients with coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis.* 2002 Oct;14(2):139-43.

Pepper MS. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost.* 2001;86:346-355.

Pesonen E, Andsberg E, Grubb A, et al. Elevated infection parameters and infection symptoms predict an acute coronary event.

Phipps R.P. Atherosclerosis: The emerging role of inflammation and the CD40-CD40 ligand system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000 June 20;97 (13): 6930-6932.

Pinderski Oslund LJ, Hedrick CC, Olvera T, Hagenbaugh A, Territo M, Berliner JA, Fyfe AI. Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2847-2853.

Pradhan AD, Manson JE, Rossouw JE, Siscovick DS, Mouton CP, Rifai N, Wallace RB, Jackson RD, Pettinger MB, Ridker PM. Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease: prospective analysis from the Women's Health initiative observational Study. *J Am Med Assoc.* 2002;288:980-987.

Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* 2008;451:904-913.

Rajappa M, Sharma A. An update on biomarkers of cardiac injury- a review. *Angiology* 2005;56:677-691.

Raposeiras-Roubín S, Abu-Assi E, Cabanas-Grandío P, Agra-Bermejo RM, Gestal-Romari S, Pereira-López E, Fandiño-Vaquero R, Álvarez-Álvarez B, Cambeiro C, Rodríguez-Cordero M, Lear P, Martínez-Monzonis A, Peña-Gil C, García-Acuña JM, González-Juanatey JR. Walking beyond the GRACE (Global Registry of Acute Coronary Events) model in the death risk stratification during hospitalization in patients with acute coronary syndrome: what do the AR-G (ACTION [Acute Coronary Treatment and Intervention Outcomes Network] Registry and GWTG [Get With the Guidelines] Database), NCDR (National Cardiovascular Data Registry), and EuroHeart Risk Scores Provide? *JACC Cardiovasc Interv.* 2012 Nov;5(11):1117-25.

Ridker PM, Koenig W, Fuster V. C-reactive protein and coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2004 Jul 15;351 (3): 295-8 author reply 295-8.

Ridker PM, Rifai N, Rose L., et al. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002, 347:1557-1565.

Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation.* 2000;101:1767-1772.

Rifai N and Ridker PM. High sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease. *Clin Chem* 2001; 47:403-411.

Roivainen M, Viik-Kajander M, Palosuo T, et al. Infections, inflammation, and the risk of coronary heart disease. *Circulation.* 2000;101:252-7.

Ross R. Atherosclerosis- an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-126.

Ross R. Mechanisms of disease : atherosclerosis : an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340: 115-126.

Ross R, Fuster V. The pathogenesis of atherosclerosis. In:Fuster V, Ross R, Topol Ej, eds *Atherosclerosis and coronary artery disease.* Vol 1. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:441-460.

Rothe G, Gabriel H, Kovacs E, Klucken J, Stohr J, Kindermann W, Schmitz G. Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:1437-1447.

Rus HG, Vlaicu R, Niculescu F. Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall. *Atherosclerosis.* 1996;127:263-271.

Salomon RN, Underwood R, Doyle MV, Wang A, Libby P. Increased apolipoprotein E and c-fms gene expression without elevated interleukin 1 or 6 mRNA levels indicates selective activation of macrophage functions in advanced human atheroma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Apr 1;89(7):2814-8.

Sambola A, Osende J, Hathcock J, Degen M, Nemerson Y, Fuster V, Crandall J, Badimonn JJ. Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity. *Circulation.* 2003;107:973-977.

Sarén P, Welgus HG, Kovanen PT. Tnf- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol.* 1996;157:4159-4165.

Satoh M, Shimoda Y, Akatsu T, Ishikawa Y, Minami Y, Nakamura M. Elevated circulating levels of heat shock protein 70 are related to systemic inflammatory reaction through monocyte Toll signal in patients with heart failure after acute myocardial infarction. *Eur J Heart Fail.* 2006;8:810-815.

Torzewski M, Suriyaphol P, Paprotka K, Spath L, Ochsenhirt V, Schmitt A, Han SR, Husmann M, Gerl VB, Bhakdi S, Lackner KJ. Enzymatic modification of low-density lipoprotein in the arterial wall: a new role for plasmin and matrix metalloproteinases in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Nov;24(11):2130-6.

Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart Lung Circ.* 2013 Jun;22(6):399-411.

Smeeth L, Thomas SI, Hall AJ, Hubbard R, Farrington P, Vallance P. Risk of myocardial infarction and stroke after acute infection or vaccination. *N Engl J Med* 2004;351:2611-2618.

Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, et al. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture. *Circ Res* 1997;81:448-54.

Schroeder K, Hertzog PJ, Ravase T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004;75:163-89.

Schroeder AP, Falk E. Vulnerable and dangerous coronary plaques. *Atherosclerosis.* 1995 Dec;118 Suppl:S141-9.

Schwartz MA, Assoian RK. Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci* 2001;114:2553-2560.

Neri Serneri GG, Prisco D, Martini F, Gori AM, Brunelli T, Poggesi L, Rostagno C, Gensini GF, Abbate R. Acute T-cell activation is detectable in unstable angina. *Circulation.* 1997 Apr 1;95(7):1806-12.

Shah PK. The yin and yang of cholesteryl ester transfer protein in cardiovascular disease. *Circulation.* 2009 Dec 15;120(24):2408-10.

Shah PK. Inflammation and plaque vulnerability. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2009 Feb;23(1):31-40. doi: 10.1007/s10557-008-6147-2.

Shah PK, Falk E, Badimon JJ et al. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 1995;92:1565-9.

Shah PK, Galis ZS. Matrix metalloproteinase hypothesis of plaque rupture: players keep piling up but questions remain. *Circulation.* 2001;104:1878-80.

Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem.* 1993 Nov 15;268(32):23824-9.

Shapiro SD, Doyle GA, Ley TJ, Parks WC, Welgus HG. Molecular mechanisms regulating the production of collagenase and TIMP in U937 cells: evidence for involvement of delayed transcriptional activation and enhanced mRNA stability.

Shapiro SD, Kobayashi DK, Pentland AP, Welgus HG. Induction of macrophage metalloproteinases by extracellular matrix. Evidence for enzyme- and substrate-specific responses involving prostaglandin-dependent mechanisms. *J Biol Chem.* 1993 Apr 15;268(11):8170-5.

Shimizu K, Shichiri M, Libby P, Le RT, Mitchel RN. Th2-predominant inflammation and blockade of IFN-gamma signaling induce aneurysms in allografted aortas. *J Clin Invest.* 2004;114:300-308.

Shibley JM, Wesselschmidt RL, Kobayashi DK, Iley TJ, Shapiro SD. Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:3942-3946.

Shorr AF, Bernard GR, Dhainaut JF, et al. proinflammatory protein C concentrations in severe sepsis: an early directional change in plasma levels predicts outcome. *Crit Care* 2006;10:R92.

Shwartz SM, Galis ZS, Rosenfeld ME, Falk E. Plaque rupture in humans and mice. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:705-713.

Sluijter JPG, Pulskens WPC, Schoeveld AH, Velema E, Srijder CF, Moll F, de Vries JP, Verheijen J, Hanemaaijer R, De Dleijn DPV, Paterkamp G. Matrix metalloproteinase 2 is associated with stable and matrix metalloproteinases 8 and 9 with vulnerable carotid atherosclerotic lesions- A study in human endarterectomy specimen pointing to a role for different extracellular matrix metalloproteinase inducer glycosylation forms. *Stroke*, 2006;37:235-239.

Speidl WS, Toller WG, Kaun C, Weiss TW, Pfaffenberg S, Kastl SP, Furnkranz A, Maurer G, Huber K, Metzler H, Wojta J. Catecholamines potentiate LPS-induced expression of MMP-1 and MMP-9 in human monocytes and in the human monocytic cell line U937: possible implications for peri-operative plaque instability. *FASEB J.* 2004;18:603-605.

Springall R, Bojalil R. Proteína C Reactiva: más que un marcador sistémico de inflamación. *Rev. Contactos.* 2006;60:37-41.

Springall R, Amezcua-Guerra LM, Gonzalez-Pacheco H, Furuzawa-Carballeda J, Gomez-García L, Márquez-Velasco R, Mejía-Dominguez AM, Cossio-Aranda J, Marínez-Sánchez C, Bojalil R. Interferon-gamma increases the ratio of matrix metalloproteinase-9/Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in peripheral monocytes from patients with coronary artery disease. *Plos One* 2013.

Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Sep;15(9):1512-31.

Stary HC. Lipid and macrophage accumulations in arteries of children and the development of atherosclerosis. *Am J Clin Nutr.* 2000 Nov;72(5 Suppl):1297S-1306S

Stary HC. The development of calcium deposits in atherosclerotic lesions and their persistence after lipid regression. *Am J Cardiol.* 2001 Jul 19;88(2A):16E-19E.

Stemme S, Faber B, Jolm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocyte from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1995;92:3893-3897.

Stuve O, Chabot S, Jung SS, Willians G, Yong VW. Chemokine-enhanced migration of human peripheral blood mononuclear cells is antagonized by interferon beta-1b through an effect on matrix metalloproteinase-9. *J Neuroimmunol* 1997 Dec;80(1-2):38-46.

Stuve O, Dooley NP, Uhm Jh, Antel JP, Francis GS, William G, Yong VW. Interferon beta-1b decreases the migration of T lymphocytes in vitro: effect on matrix metalloproteinase-9. *Ann Neurol* 1996 Dec;40(6):853-63.

Sukhova GK et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation* 1999;99:2503-2509.

Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billingham RC, Libby P. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and-3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation*. 1999; 99: 2503-2509.

Tayebjee MH, Tan KT, MacFadyen RJ, Lip GY. Abnormal circulating levels of metalloprotease 9 and its tissue inhibitor 1 in angiographically proven peripheral arterial disease: relationship to disease severity. *J Intern med*. 2005;257:110-6.

Theroux P, Fuster V. Acute coronary syndromes: unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. *Circulation* 1998;97:1195-206.

Tracy RP, Lemaitre RN, Pstay BM, et al. Relationship of C-reactive protein to risk of cardiovascular disease in the elderly. Results from the Cardiovascular Health Study and the Rural Health Promotion Project. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1121-7.

Turakhia M, Tseng ZH. Sudden cardiac death: epidemiology, mechanisms, and therapy. *Curr Probl Cardiol* 2007; 32: 501-546.

Tziakas DN, Chalikias GK, Hatzinikolou HI, et al. Anti-inflammatory cytokine profile in acute coronary syndromes: behavior of interleukin-10 in association with serum metalloproteinases and proinflammatory cytokines. *Int J Cardiology* 2003;92:169-175.

Uzui H, Harpf A, Liu M, Doherty TM, Shukla A, Chai N-N, Tripathi PV, Jovinge S, Wilkin DJ, Asotra K, Shah PK, Rajavashisth TB. Increased expression of membrane type 3-matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque: Role of activated macrophages and inflammatory cytokines. *Circulation*. 2002; 106: 3024-3030.

Valente P, Fassina G, Melchiori A, Masiello L, Cilli M, Vacca A, Onisto M, Santi L, Stetler-Stevenson WG, Albin A. TIMP-2 over-expression reduce invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int j Cancer*. 1998;75:246-253.

Valente AJ, Xie JF, Abramova MA, Wenzel UO, Abboud HE, Graves DT. A complex element regulates IFN-gamma-stimulated monocyte chemoattractant protein gene transcription. *J Immunol*. 1998;161:3719-28.

Van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Cas PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 1994;89:36-44.

Van Haelst PL, YTTervaert JW, Bijzet J, Baljé-Volkers C, May JF, Langeveld B, Gans RO. Circulating monocytes in patients with acute coronary syndromes lack sufficient interleukin-10 production after lipopolysaccharide stimulation. *Clin Exp Immunol*. 2004;138:364-368.

- Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation*. 2006;113:2335-62.
- Verheggen PW, de Maat MP, Cats VM, et al. 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.
- Virmani R, Burke AP, Farb A, Koligie F. Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(suppl):c13-18.
- Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2054-61.
- Voltonen V, Kikka A, Syrjanen J. Thrombo-embolic complications in bacteraemic infections. *Eur Heart J*. 1993;14:Suppl K;20-23.
- Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura, Tall AR. ATP-binding cassette transporter G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* . 2004;101:9774-9779.
- Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor B (NF- $\kappa$ B) activation in human monocytes: IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem*. 1995;270: 9558-9563.
- Warner SJC, Friedman GB, Libby P. Immune interferon inhibits proliferation and induces 2'-5'-oligoadenylate synthetase gene expression in human vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1989;83:1171-1182.
- Warren –Gash C, Smeeth L, Hayward AC. Influenza as a trigger for acute myocardial infarction or death from cardiovascular disease: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2009;9:601-610.
- Webster NL, Crowe SM. Matrix metalloproteinases, their production by monocytes and macrophages and their potential role in HIV-related diseases. *J Leukoc Biol*. 2006;80:1052-1066.
- Williams TN, Zhang CX, Game BA, He L, Huang Y. C-reactive protein stimulates MMP-1 expression in U937 histiocytes through Fc( $\gamma$ )RII and extracellular signal-regulated kinase pathway: an implication of CRP involvement in plaque destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:61-6.
- Wilson PWF, Pencina M, Jacques P, Selhub J, D'Agostino R, O'Donnell CJ. C-reactive protein and reclassification of cardiovascular risk in the Framingham Heart Study. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2008;1:92-97.
- Wilson EM, Moainie SL, Baskin JM, Lowry AS, Deschamps AM, Mukherjee R, et al. Region and type specific induction of matrix metalloproteinases in post-myocardial infarction remodeling. *Circulation*. 2003;107:2857-63.
- Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7:77-86.
- Wu L, Fan J, Matsumoto S, Watanabe T. Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 by cytokines and CD40 signaling in monocyte/macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;269:808-815.

Wu AJ, Lafrenie RM, Park C, Apinhasmit W, Chen ZJ, Birkedal-Hansen H, Yamada KM, Stetler-Stevenson WG, Baum BJ. Modulation of MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) by interferon-gamma in a human salivary gland cell line. *J Cell Physiol.* 1997 May;171(2):117-24.

Xie B, Laouar A, Humerman E. Fibronectin-mediated cell adhesion is required for induction of 92-kDa type IV collagenase/gelatinase (MMP-9) gene expression during macrophage differentiation. The signaling role of protein kinase C-beta. *J Biol Chem.* 1998;273:11576-11582.

Xu XP, Meisel Sr, Ong JM, Kaul S, Cercek B, Rajavashishth TB, Sharifi B, Shah PK. Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. *Circulation.* 1999;99:993-998.

Yamashita H, Shimada K, Seki E, Mokino H, Daida H. Concentrations of interleukins, interferon, and C-reactive protein in stable and unstable angina pectoris. *Am J Cardiol.* 2003;91:133-136.

Yasmin J, McEneaney CM, Wallace S, Dakham Z, Pulsalkar P, Maki-Petaja K, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2 and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 2005;25:372.

Yasuda T, Hirata K, Ishida T, Kojima Y, Tanaka H, Okada T, Quertermous T, Yokiyama M. Endothelial lipase is increased by inflammation and promotes LDL uptake in macrophages. *J Atheroscler Thromb* 2007 Aug;14(4):192-201

Yocoyama M, Hirata K, Kawashima S, Kawahara Y. Regulation of nitric oxide synthase gene expression by cytokines. *J Card Fail.* 1996 Dec;2(4 Suppl):S179-85.

Young JL, Libby P, Schonbeck U. Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2002;88:554-567.

Zalai CV, Kolodziejczyk MD, Pilarski L, et al. Increased circulating monocyte activation in patients with unstable coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38:1340-1347.

Zeng B, Prasan A, Fung KC, Solanki V, Bruce D, Freedman SB, Brieger D. Elevated circulating levels of matrix metalloproteinase-9 and -2 in patients with symptomatic coronary artery disease. *Intern Med J.* 2005;35:331-335.

Zhang Y, McCluskey K, Fujii K, Wahl LM. Differential regulation of monocyte matrix metalloproteinase and TIMP-1 production by TNF-alpha, granulocyte-macrophage, CSF, and IL-1 beta through prostaglandin-dependent and independent mechanisms. *J Immunol.* 1998; 161:3071-3076.

Zhang Y, Wahl LM. Synergistic enhancement of cytokine-induced human monocyte matrix metalloproteinase-1 by C-reactive protein and oxidized LDL through differential regulation of monocyte

Zhou J, Chew M, Ravn HB, Falk E. Plaque pathology and coronary thrombosis in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1999;230:3-11.



