

TESIS DOCTORAL

USO DE NEUROPEPTIDOS ANTI-INFLAMATORIOS EN ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES: ATEROSCLEROSIS Y MIOCARDITIS AUTOINMUNE

VIRGINIA DELGADO MAROTO

Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología

Universidad de Granada

Granada, 2014



Universidad de Granada

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Virginia Delgado Maroto
D.L.: GR 1356-2014
ISBN: 978-84-9028-996-9

El doctorando Virginia Delgado Maroto y el director de la tesis Mario Delgado Mora. Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección del director de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 15 de enero de 2014.

Director/es de la Tesis



Fdo.: Mario Delgado Mora

Doctorando



Fdo.: Virginia Delgado Maroto

INDICE

1	RESUMEN / SUMMARY	1
1.2	Resumen.....	3
1.3	Summary	7
2	ABREVIATURAS	8
3	INTRODUCCIÓN	13
3.2	Sistema Inmunitario: Inflamación y Autoinmunidad	17
3.2.1	Sistema inmunitario. Definición y generalidades.....	17
3.2.2	Sistema inmunitario. Tolerancia inmunológica y autoinmunidad.	20
3.3	Sistema Cardiovascular: Inflamación y Autoinmunidad en el sistema cardiovascular.	23
3.3.1	Sistema cardiovascular. Definición. Enfermedades cardiovasculares.	23
3.3.2	Miocarditis.....	25
3.3.2.1	Definición. Etiología.	25
3.3.2.2	Tipos de Miocarditis.	26
3.3.2.2.1	Miocarditis vírica y autoinmune.	27
3.3.2.3	Modelos animales de miocarditis.	28
3.3.2.3.1	Miocarditis inducida por Coxsackievirus 3 (CVB3).	28
3.3.2.3.2	Miocarditis autoinmune experimental (MAE, inducida por miosina cardiaca. ...	28
3.3.2.4	Fases de la miocarditis.	29
3.3.2.4.1	Fase I: Infección viral	29
3.3.2.4.2	Fase II: Autoinmunidad	31
3.3.2.4.3	Fase III: Cardiomiopatía dilatada (DCM).	32
3.3.3	Aterosclerosis.	33
3.3.3.1	Definición. Etiología.	33
3.3.3.2	Fases de la enfermedad.	35
3.3.3.2.1	Lesión inicial.	36
3.3.3.2.2	Progresión de la enfermedad.....	43
3.3.3.2.3	Formación de trombos.....	45
3.3.3.3	Modelos animales en aterosclerosis.	45
3.3.3.4	Estudio de la respuesta inmunitaria en modelos animales de aterosclerosis.	46
3.3.4	Tratamientos de las enfermedades cardiovasculares. Tratamientos actuales.	51

3.3.5	Neuropéptidos como alternativa a los tratamientos actuales.....	54
3.3.5.1	Definición de neuropéptido.	54
3.3.5.2	Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP).	55
3.3.5.3	Cortistatina.....	59
3.3.5.4	Función inmunorreguladora de CST y VIP.....	63
4	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	25
4.1	Hipótesis.....	71
4.2	Objetivos	71
5	MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
5.1	Péptidos.....	75
5.2	Animales y modelos de experimentación	75
5.2.1	Modelo de miocarditis autoinmune experimental (MAE) y tratamiento.	75
5.2.2	Modelo de aterosclerosis aguda en arteria carótida y tratamiento	77
5.2.3	Modelo de aterosclerosis crónico y tratamiento	78
5.2.4	Modelo de ligación completa de la carótida y tratamiento.....	79
5.3	Tinción con Sudan IV	80
5.4	Tinción de Oil red O.....	80
5.5	Tinción de Hematoxilina y Eosina (H-E).....	81
5.6	Inmunofluorescencias	81
5.7	Obtención de órganos y aislamiento de células.....	82
5.7.1	Procesamiento de ganglios linfáticos.....	82
5.7.2	Explantos de carótida.	82
5.7.3	Obtención de suero.....	83
5.8	Estudio de la respuesta inmunitaria en los modelos animales	83
5.8.1	Ensayo de proliferación linfocitaria.....	83
5.8.2	Caracterización de marcadores intracelulares y de superficie mediante citometría de flujo	84
5.8.3	Determinación de proteínas mediante ELISA (del inglés, Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	85

5.8.4	Determinación en suero de la producción de inmunoglobulinas	87
5.9	Preparación de células Th1.	87
5.10	Aislamiento de aorta y ensayo de unión ex vivo.....	88
5.11	Unión de células Th1 a quimeras de P y E selectina bajo condiciones de flujo	89
5.12	Ensayo de trans migración celular	89
5.13	Aislamiento y cultivo de Células Endoteliales de Corazón Murinas (MHEC).	90
5.14	Ensayo de unión THP-1/HUVEC.....	91
5.15	Ensayo de expresión de moléculas de adhesión en HUVEC mediante RNA.	91
5.15.1	Aislamiento del ARN.....	92
5.15.2	Transcripción inversa (RT).....	92
5.15.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real.	92
5.16	Aislamiento de células mesenquimales de ratón (MSC).....	94
5.17	Macrófagos derivados de médula ósea (BM-MØ)	94
5.18	Acumulación de gotas lipídicas y formación de células espumosas.	95
5.19	Ensayo de salida de colesterol.	96
5.20	Análisis de la expresión proteica.....	97
5.20.1	Obtención de extractos proteicos.....	97
5.20.2	Cuantificación de extractos proteicos.....	97
5.20.3	Análisis de la expresión proteica por Western Blot.	97
5.21	Ensayo de proliferación de hAoSMC.	99
5.22	Ensayo de migración de hAoSMC.....	99
5.23	Análisis estadístico	99
6	RESULTADOS.....	76
6.1	Estudio del efecto de cortistatina y VIP en un modelo de miocarditis autoinmune experimental (MAE).	103
6.1.1	Efecto de VIP y cortistatina en la incidencia y severidad en un modelo de MAE.	103
6.1.2	Efecto del tratamiento con cortistatina o VIP en la respuesta inflamatoria y autorreactiva en ganglios linfáticos en MAE.....	107

6.1.3	El tratamiento con CST o VIP reduce la presencia de autoanticuerpos en MAE.	115
6.2	Estudio del efecto de CST y VIP en aterosclerosis.....	116
6.2.1	Análisis del papel de CST y VIP en un modelo de aterosclerosis aguda.....	116
6.2.1.1	El tratamiento con CST o VIP inhibe la formación de placas ateroscleróticas en un modelo aterosclerosis agudo.....	116
6.2.1.2	Caracterización de las placas ateroscleróticas.	118
6.2.1.3	Estudio del efecto de CST y VIP en la respuesta inmunológica en un modelo de ligación parcial de carótida.	119
6.2.2	Análisis del papel de CST y VIP en un modelo de aterosclerosis crónico.....	125
6.2.2.1	El tratamiento con cortistatina o VIP inhibe la formación de placas ateroscleróticas en un modelo de aterosclerosis crónica.	125
6.2.2.2	Estudio del efecto de cortistatina y VIP en la respuesta inmunológica en un modelo de aterosclerosis crónica.	129
6.2.2.3	Estudio del efecto de cortistatina y VIP a tiempos cortos y cuando la enfermedad está establecida en un modelo de aterosclerosis crónica.	132
6.2.2.4	Estudio del tratamiento con células MSC, o de MSC transducidas con vectores lentivirales que expresan VIP (lentiVIP), en un modelo de aterosclerosis crónica.	134
6.2.3	Mecanismos implicados en la reducción de la formación de placas ateroscleróticas.	137
6.2.3.1	El tratamiento con VIP disminuye los niveles de colesterol en sangre de ratones ApoE ^{-/-} en un modelo de aterosclerosis crónica.....	137
6.2.3.2	Efecto de cortistatina sobre la adhesión de monocitos a células endoteliales.	138
6.2.3.3	Estudio del efecto de cortistatina y VIP sobre la adhesión y trans migración de células Th1 al endotelio aórtico.....	139
6.2.3.4	Cortistatina y VIP reducen la formación de células espumosas.....	141
6.2.3.5	Cortistatina y VIP reducen la proliferación y migración de células musculares de aorta humana.	144
	Resumen	147
7	DISCUSIÓN	103
7.1	Efecto terapéutico de cortistatina y VIP en MAE a través de la regulación de la respuesta inflamatoria y autoinmune.....	151
7.2	Efecto terapéutico de VIP y cortistatina en aterosclerosis a través de regulación de la fase efectora de la respuesta inmunitaria	156
7.3	¿Cómo regulan VIP y cortistatina la respuesta inmunitaria en MAE y aterosclerosis?	158

7.4	VIP y cortistatina regulan otros procesos claves en el desarrollo de la aterosclerosis.....	160
7.5	Receptores implicados en el efecto de cortistatina y VIP en MAE y Aterosclerosis	164
7.6	Papel endógeno de CST y VIP en Miocarditis Autoinmune y Aterosclerosis.	165
7.7	Estrategias para el uso de CST y VIP en clínica.....	167
8	CONCLUSIONS.....	151
8.1	Conclusions.....	171
9	BIBLIOGRAFÍA.....	171
10	ANEXOS.....	195

1 RESUMEN / SUMMARY

1.2 Resumen

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen la primera causa de muerte a nivel mundial. La aterosclerosis es la principal causante de las ECVs, debido, por un lado, a la estenosis de la luz de los vasos que provoca la formación de placas ateroscleróticas en la pared de las arterias, y por otro, a la formación de trombos sanguíneos como consecuencia de la ruptura de las mismas. La miocarditis autoinmune consiste en una inflamación del corazón, generalmente de origen vírico. Ambas enfermedades tienen en común que son dos enfermedades cardiovasculares, autoinmunes, y con un fuerte componente inflamatorio.

Los tratamientos actuales para estas enfermedades son de tipo preventivo, actuando sobre las causas que dan origen a los síntomas o generan la enfermedad. Sin embargo, resulta necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos que sean capaces de controlar la respuesta inflamatoria de las mismas. En este contexto presentamos a VIP y cortistatina, dos neuropéptidos endógenos cuyo papel inmunorregulador y anti-inflamatorio ha quedado patente en otras enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias. En base a estos resultados previos el objetivo que nos planteamos en esta tesis fue estudiar el posible papel o aplicación terapéutica de VIP y cortistatina en ECV, empleando como modelo dos enfermedades representativas como la aterosclerosis y la miocarditis.

Para ello hemos llevado a cabo estudios tanto *in vivo* como *in vitro*. En los estudios *in vivo*, hemos analizado el efecto de CST y VIP en un modelo de miocarditis experimental autoinmune (MAE), así como en dos modelos de aterosclerosis, uno agudo, de ligación parcial de la carótida, y otro de aterosclerosis crónica. Por otro lado, con estudios *in vitro* hemos analizado el efecto de CST y VIP en la adhesión y transmigración de células Th1 al endotelio vascular, así como la adhesión de monocitos a células endoteliales, el efecto de CST y VIP sobre la formación de células espumosas, y el efecto de CST y VIP sobre la migración y proliferación de las células musculares lisas.

Los resultados *in vivo* muestran que tanto VIP como cortistatina son capaces de controlar la respuesta inmunitaria en los 3 modelos empleados. La administración de ambos péptidos se traduce en una disminución de la incidencia de las dos enfermedades, miocarditis y aterosclerosis. En el modelo de MAE cortistatina y VIP provocan una reducción del número y área de infiltrados inflamatorios. Además, a nivel de los ganglios linfáticos locales, que drenan la zona de lesión, observamos una disminución de las células Th17 y de la proliferación de linfocitos T y mediadores inflamatorios. Por su parte, en el modelo de aterosclerosis, tanto aguda como crónica, el tratamiento con cortistatina o con VIP disminuye la formación de placas ateroscleróticas y la respuesta inflamatoria, tanto a nivel local (inhibe la producción de mediadores inflamatorios en las

carótidas ligadas), como a nivel de ganglios linfáticos (disminuye la producción de células Th1 y Th17, manteniendo el número de células Treg).

El comienzo de la formación de las lesiones viene marcado por un aumento en la permeabilidad de la monocapa de células endoteliales que delimita la luz del vaso, favoreciendo la infiltración de LDL desde la sangre a la capa íntima arterial. El LDL va a ser oxidado y va a iniciar una respuesta inflamatoria que conlleva, entre otras cosas, un aumento en la expresión de moléculas de adhesión por parte de las células endoteliales, permitiendo la unión y transmigración de células inmunitarias. El tratamiento con cortistatina de las células endoteliales va a provocar un descenso tanto en la unión de la línea monocítica THP-1 a la línea de células endoteliales HUVEC, como la unión y transmigración de células Th1 a través del endotelio vascular, y este efecto viene mediado por una disminución en la expresión de P-selectina en las células endoteliales. Por su parte, cuando las células Th1 son diferenciadas en presencia de VIP también ven disminuida su capacidad de unión y transmigración a través del endotelio vascular.

Los monocitos infiltrados se diferencian a macrófagos, los cuales van a convertirse en células espumosas tras fagocitar el LDL oxidado presente en la lámina íntima. Estas células van a ser fundamentales en el inicio y progresión de la enfermedad. El tratamiento con cortistatina o con VIP va a provocar un descenso en esta población celular al favorecer la salida de colesterol de las mismas mediante un aumento en la expresión de ABCA-1.

La última gran población celular involucrada en el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas son las células de músculo liso, las cuales van a proliferar y migrar desde la lámina media a la íntima, favoreciendo la formación de una capa fibrosa que envuelve la placa. En nuestro trabajo mostramos como el tratamiento con cortistatina o con VIP va a inhibir la proliferación y migración de una línea de células de músculo liso aórticas humanas (hAoSMC) en respuesta a PDGF, un factor de crecimiento presente en las placas ateroscleróticas. Además, usando un modelo de ligación total de carótida, para estudiar *in vivo* la formación de neointima, también observamos este efecto inhibitorio sobre la proliferación de las células musculares por parte de cortistatina y de VIP.

Con el objetivo de buscar maneras de optimizar la administración de VIP decidimos utilizar como vehículo células mesenquimales de grasa (MSC) transducidas con vectores lentivirales que expresen VIP. EL resultado obtenido fue que la utilización de estas células nos permite un descenso en el número de administraciones del tratamiento así como un retraso en el momento en el que se comienzan las administraciones.

En resumen y en base a los resultados obtenidos, podemos concluir que tanto VIP como CST presentan un alto potencial como agentes terapéuticos frente a

aterosclerosis y miocarditis, siendo capaces de controlar la respuesta inflamatoria exacerbada y actuando a nivel local sobre los distintos tipos celulares implicados en el desarrollo y establecimiento de estas enfermedades.

1.3 Summary

Cardiovascular diseases (CVDs) are one the first cause of death, being responsible of one-third of deaths worldwide. Most of the CVDs are caused by atherosclerosis, due to the stenosis produced by the narrowing in the blood vessels or the presence of thrombus due to the plaque rupture. The autoimmune myocarditis is another important CVD characterized by heart inflammation, usually caused by viruses. Both diseases have a strong inflammatory and autoimmune component.

Current treatments of both diseases are focused on the causes that generate them. However, it is necessary to find new treatments that control the inflammatory response of these diseases. In this context we present VIP and cortistatin, two endogenous neuropeptides whose immunoregulatory and anti-inflammatory function has been demonstrated in several inflammatory and autoimmune diseases. The objective of this thesis is to study the effect of cortistatin and VIP in both diseases, atherosclerosis and autoimmune myocarditis.

To study the effect of cortistatin and VIP in these diseases we have carried out *in vivo* and *in vitro* experiments. In the *in vivo* studies we have analyzed the effect of cortistatin and VIP in an experimental autoimmune myocarditis (EAM) mouse model and in two atherosclerosis models, an acute one, partial ligation of carotid, and a chronic atherosclerotic model. In both of them we are combining the high fat diet and the absence of one transporter protein, ApoE. On the other hand, we also analyzed *in vitro* the effect of cortistatin and VIP on the main process that have place during these diseases: the adhesion and transmigration of Th1 cells to the aortic endothelium, as well as in the adhesion of monocytes to endothelial cells. In last place we also studied the effect of cortistatin and VIP in the foam cells formation and in the migration and proliferation of smooth muscle cells.

The results show that treatment with cortistatin and VIP reduces the incidence of both diseases, EAM and atherosclerosis. The main level of action for both peptides is by regulating of the immune response. In EAM, cortistatin and VIP reduce the presence of immune infiltrates in the heart as well as the proportion of Th17 cells in the lymph nodes that are close to the area of injury. Administration of these peptides also reduces the T cells proliferation and inflammatory mediators production (IL-17, IFN γ , IL-2 and IP10) in response to the myosin antigen. In the atherosclerosis models, the treatment with cortistatin or VIP decreases the atherosclerotic plaques formation as well as the inflammatory response. At the local level, inhibiting the production of inflammatory mediators in the ligated carotid, and in draining lymph nodes, decreasing the production of Th1 and Th17 cells, with no changes in the number of Treg cells.

The monolayer of endothelial cells that are surrounding the lumen of the blood vessels increase the permeability to some molecules, as LDL, allowing the initial steps of the disease. Once in the intima layer, the LDL is oxidated, starting an inflammatory response that increases the expression of adhesion molecules by the endothelial cells, allowing the binding and transmigration of immune cells. In the *in vitro* co-cultures of monocytes (THP-1) and endothelial cells (HUVEC), addition of cortistatin decreases the binding of the monocyte to endothelial cells, and the binding and transmigration of Th1 cells through the vascular endothelium. This effect is due to a down-regulation of the P-selectin expression by the endothelial cells. On the other hand, when Th1 cells are differentiated in the presence of VIP we also observe a decrease in their binding capability and in transmigration through the aortic endothelium.

The infiltrated monocytes differentiate to macrophages, which become foam cells after phagocyte oxidized LDL present in the intima layer, playing a crucial role in the initiation and progression of the disease. Treatment with cortistatin or VIP decreases the population of foam cells by promoting cholesterol efflux probably due to an increase in the expression of the transporter ABCA -1.

Another cell population involved in the development of atherosclerotic lesions is the smooth muscle cells. This population proliferates and migrates from the middle layer to the intima layer, where they create a fibrous layer surrounding the atherosclerotic plaque. In our experiment we show how cortistatin or VIP treatment inhibit the proliferation and migration of a human aortic smooth muscle cell line (hAoSMC) in response to PDGF, a growth factor present in atherosclerotic plaques. Moreover, using an additional model, total ligation carotid, we were able to corroborate the inhibitory effect on the proliferation of smooth muscle cells after the treatment with VIP or cortistatin *in vivo*.

Finally, *in vivo* assays with mesenchymal stem cells (MSC) show that MSCs transduced with a lentiviral vector expressing VIP reduce atherosclerotic lesions. This treatment allows us to decrease the number of doses of peptide administration in atherosclerotic mice, as well as to delay the moment of the first administration.

In conclusion, according to our results, cortistatin and VIP appear as two therapeutic agents with a great potential for the treatment of autoimmune myocarditis and atherosclerosis.

2 ABREVIATURAS

ABCA-1	<i>ATP-binding cassette transporter A-1</i>
ABCG-1	<i>ATP-binding cassette transporter G-1</i>
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
apoA-1	Apolipoproteína A-1
apoB	Apolipoproteína B
apoE	Apolipoproteína E
ARN	Ácido Desoxirribonucleico
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFA	Adyuvante Completo de Freud
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
CVB	Coxsackievirus B
CVD	<i>Cardiovascular disease</i>
DAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Daño
DC	Células Dendríticas
DCM	Cardiomiopatía Dilatada
EAE	Encefalomiелitis Autoinmune Experimental
ECV	Enfermedad Cardiovascular
GHSR1a	<i>Growth Hormone Secretagogue Receptor</i>
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos-Macrófagos
HDL	Lipoproteína de Alta Densidad
HSP	Proteína de Choque Térmico
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IFN- γ	Interferón <i>Gamma</i>
IgM/G	Inmunoglobulinas M y G
IKK	Proteín Quinasa de I κ B
IL	Interleuquina
LDL	Lipoproteína de Baja Densidad
LDLR	Receptor de LDL

*Uso de neuropéptidos anti-inflamatorios en enfermedades cardiovasculares:
Aterosclerosis y miocarditis autoinmune.*

M1	Población de Macrófagos Proinflamatorios
M2	Población de Macrófagos Alternativos
MAE	Miocarditis Experimental Autoinmune
M-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MMP1/8/9/13	Metaloproteinasas 1, 8, 9 y 13
MrgX2	<i>Mas-related GPCR, Member X2</i>
mARN	Ácido Ribonucleico Mensajero
NF- κ B	Factor Nuclear Potenciador de Cadenas Ligeras κ de Células B
NK	Células <i>Natural Killers</i>
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
oxLDL	LDL oxidado
PACAP	Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa de la Pituitaria
PD-1	Factor de Muerte Celular Programada 1
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PKA	Proteína Quinasa A dependiente de AMP cíclico
PMAPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PPAR- γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ</i>
PSCK-9	Proteína Convertasa <i>Subtilisin/Kexin</i> tipo 9
PSGL-1	Ligando de P-Selectina
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno
RXR	Receptor Retinoide X
SCID	Inmunodeficiencia Combinada Severa
SMC	<i>Smooth Muscle Cell</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
SR	<i>Scavengers Receptors</i>
T-bet	<i>T-box Transcription Factor TBX21 of Th1 Cells</i>
TBP	<i>TATA-Binding Protein</i>

TCR	Receptor de las Células T
TGF- β	Factor de Crecimiento Tumoral β
Th	Linfocitos T <i>Helper</i> ó Células Colaboradoras
TLR	<i>Toll-Like Receptors</i>
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral α
tolDC	Células Dendríticas Tolerogénicas
Tr1	Células Treg Reguladas por IL-10
Treg	Linfocitos o Células T Reguladoras
VCAM-1	Molécula de Adhesión a Células Vasculares 1
VEGF	Factor de Crecimiento Vascular Endotelial
VIP	Péptido Intestinal Vasoactivo
VLA-4	<i>Very Late Antigen-4</i>
VLDL	Lipoproteína de Muy Baja Densidad
VPAC/VPAC2	Receptores de VIP

3 INTRODUCCIÓN

3.2 Sistema Inmunitario: Inflamación y Autoinmunidad

3.2.1 Sistema inmunitario. Definición y generalidades.

El término inmunidad deriva del latín *immunitas*, y hace referencia a la protección frente a persecución legal que se les ofrecía a los senadores romanos durante su permanencia en el cargo. Históricamente, inmunidad significa protección frente a enfermedades, más concretamente, enfermedades infecciosas. Las células y moléculas responsables de esta inmunidad constituyen el sistema inmunitario, y la respuesta coordinada y colectiva frente a sustancias extrañas es la respuesta inmunitaria. Por tanto, la función fisiológica del sistema inmunitario es la defensa frente a microbios infecciosos. Sin embargo, sustancias extrañas no infecciosas son capaces de desarrollar una respuesta inmunitaria, así como mecanismos que normalmente protegen al individuo de infecciones, o que eliminan sustancias extrañas, son capaces de causar daño a tejidos y enfermedad en algunas situaciones. Es por ésto que una definición más amplia de lo que es la respuesta inmunitaria sería: reacción a componentes de microorganismos así como a macromoléculas, tales como proteínas o polisacáridos, y pequeños químicos que son reconocidos como extraños, independientemente de la respuesta fisiológica o patológica que pueda desencadenar la reacción a éstos (1).

La defensa frente a microorganismos está mediada por una respuesta temprana por parte de una inmunidad innata y una respuesta más tardía por parte de una inmunidad adaptativa, clasificándose así la respuesta inmunitaria en dos grandes bloques (**Figura 1**).

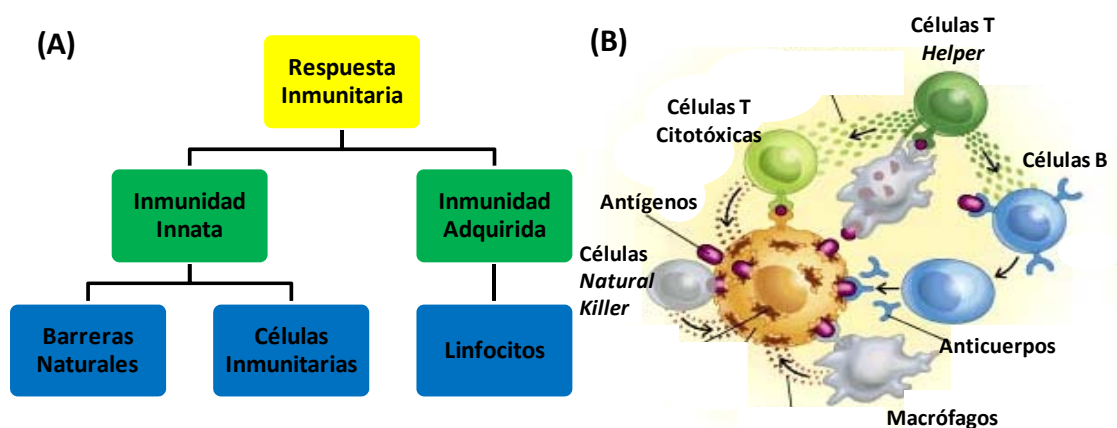


Figura 1. Sistema Inmunitario. A. Tipos de Respuesta Inmunitaria. Respuesta Innata o Natural compuesta por las barreras físicas o químicas del organismo y por las distintas líneas celulares inmunológicas y la Respuesta Adquirida, Adaptativa o Específica llevada a cabo por linfocitos. **B. Visión general de la respuesta inmunológica celular.** Tipos celulares y moléculas implicadas.

El primero de estos bloques constituye la inmunidad innata o inespecífica, que es una respuesta rápida que carece de memoria inmunológica, cuyos principales componentes son: las barreras físicas y químicas, tales como el epitelio y químicos producidos por la superficie epitelial; células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas (DC) y células NK (del inglés *natural killer*); proteínas de la sangre, incluyendo miembros del sistema del complemento y otros mediadores de inflamación; proteínas llamadas citoquinas que regulan y coordinan muchas de las actividades de las células de la inmunidad innata. Las principales funciones de la respuesta inmunitaria innata consisten en inducir inflamación y en bloquear la infección viral de las células (1).

La respuesta inflamatoria aguda es la extravasación y acumulación de leucocitos, proteínas del plasma y fluidos provenientes de la sangre, a los sitios de infección y daño. Los principales leucocitos reclutados son los neutrófilos y los monocitos, que una vez fuera del torrente sanguíneo se diferencian a macrófagos. De igual modo, las principales proteínas del plasma que pasan a los sitios de inflamación son proteínas del complemento, anticuerpos y reactivos de la fase aguda. La liberación de estos componentes sanguíneos a los sitios de inflamación es dependiente de cambios reversibles que se producen en los vasos sanguíneos en lugares de infección o daño tisular. Estos cambios incluyen un incremento en el flujo sanguíneo consecuencia de una dilatación arterial, un aumento en la adhesión de los leucocitos circulantes a las células endoteliales que delimitan las vénulas, así como un aumento en la permeabilidad de los capilares y vénulas a proteínas del plasma. Todos estos cambios están mediados por citoquinas y pequeñas moléculas procedentes de células residentes en el tejido afectado, tales como mastocitos, macrófagos y células endoteliales, en respuesta a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o a patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Esta respuesta inflamatoria aguda puede desembocar en una inflamación crónica si la infección o el daño tisular se prolongan. En este punto el sistema inmunitario adaptativo también pasa a formar parte de la respuesta debido a la producción de citoquinas por parte de las células T, que actúan como poderosas inductoras de la inflamación (1).

Dentro de estos componentes de la respuesta inmunitaria innata, y debido a su implicación en las patologías que describiremos en apartados posteriores, describiremos más detalladamente a los monocitos/macrófagos.

Los monocitos son células fagocíticas, que no están completamente diferenciadas, y que circulan por el torrente sanguíneo. Constituyen una población heterogénea en la que se diferencian dos subpoblaciones, distinguibles por sus moléculas de superficie y por su cinética de migración a los tejidos. Una de estas poblaciones posee un perfil más inflamatorio, ya que es reclutada rápidamente desde la sangre a los sitios de inflamación, y expresa niveles elevados del marcador

Ly6C (Ly6C^{high}) en su superficie. Esta población se diferenciará a macrófagos pro-inflamatorios o M1. La otra subpoblación, con un perfil menos inflamatorio, es la fuente principal de los macrófagos residentes en los tejidos y de algunas células dendríticas, y expresa bajos niveles de Ly6C (Ly6C^{low}) en superficie. Esta subpoblación se diferenciara a macrófagos alternativos o M2 (2).

El segundo bloque, la inmunidad adquirida, adaptativa o específica, proporciona una respuesta más lenta y que confiere memoria inmunológica al organismo, así como la capacidad de responder energicamente a exposiciones repetidas de un mismo agente extraño. El sistema inmunitario adaptativo es capaz de reconocer y reaccionar frente a un gran número de microbios y sustancias no microbianas, incluso cuando entre estas hay una gran similitud. El principal componente de la respuesta inmunitaria adaptativa son los linfocitos y los productos secretados por los mismos. Las sustancias extrañas capaces de inducir una respuesta inmunitaria específica o que son reconocidos por los linfocitos o anticuerpos son los antígenos (1, 3).

Los linfocitos se clasifican en dos grandes grupos: Linfocitos B, que son células que reconocen antígenos extracelulares y se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos; y linfocitos T, que reconocen antígenos de microbios intracelulares, o procesados intracelularmente, y que ayudan a su destrucción o bien eliminan directamente las células infectadas.

Dentro de los linfocitos B se distinguen tres subtipos: las células foliculares B, que producen anticuerpos en respuesta a antígenos proteicos, en colaboración con las células T colaboradoras (Th, del inglés *T helper*), en órganos linfoides periféricos; las células B de la zona marginal de bazo y otros órganos linfoides, que reconocen antígenos multivalentes y producen anticuerpos sin colaboración de las células Th; y las células B-1, que median una respuesta independiente de células T en mucosas y el peritoneo (1). Las células B-1 constituyen un porcentaje pequeño de los linfocitos B, que derivan de precursores fetales o neonatales y cuya localización fundamental es la cavidad peritoneal y pleural. Producen de forma natural anticuerpos IgM e IgA que participan en la respuesta inmunitaria innata. Las células foliculares B y las células B de la zona marginal son la principal población de células B, producidas en la médula ósea. Tras la activación antigénica van a diferenciarse a células plasmáticas y van a producir inmunoglobulinas fundamentalmente del tipo IgG.

Por su parte los linfocitos T se diferencian también en distintas poblaciones según sus marcadores de superficie y su función. Estos linfocitos reconocen a antígenos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de otras células. Los que están mejor caracterizados son los linfocitos T citotóxicos, CD8⁺ (CTL), que matan a las células diana, generalmente células infectadas o células tumorales que expresan sus antígenos unidos a moléculas MHC de clase I, y

las células Th, CD4⁺, que reconocen antígenos unidos a MHC de clase II en las células presentadoras de antígenos, y liberan citoquinas. Dentro de las CD4⁺ hay otra población muy importante en el control de la respuesta inmunitaria, las células T reguladoras, Treg, de las cuales hablaremos en el siguiente apartado.

Dentro de las células Th encontramos distintos subtipos según la expresión de moléculas de superficie y de las citoquinas que secreten, habiendo tres subtipos fundamentales, Th1 (que producen principalmente IL-2, IFN- γ y TNF- α), Th2 (que producen IL-4, IL5, e IL-13, entre otras) y Th17 (que producen principalmente IL-17 e IL-22). Estos subtipos derivan de linfocitos T *naïve* CD4⁺, en respuesta a citoquinas, y la diferenciación de los mismos conlleva la activación de distintos factores de transcripción. En general, la respuesta Th1/Th17 es protectora frente a infecciones causadas por la mayoría de patógenos, intracelulares (Th1) y extracelulares (Th17). Las citoquinas Th1 y Th17 activan la inmunidad innata y promueven la producción de anticuerpos capaces de opsonizar y fijar el complemento. La respuesta mediada por células Th2 tiene un carácter antiinflamatorio, y es efectiva en la erradicación de parásitos helmínticos (1).

3.2.2 Sistema inmunitario. Tolerancia inmunológica y autoinmunidad.

El sistema inmunitario está encargado de diferenciar lo propio de lo ajeno. En esta propiedad se fundamenta el término de tolerancia, que es la capacidad de no responder ante un antígeno por parte del sistema inmunitario adaptativo, como resultado de la inactivación o muerte de linfocitos antígeno-específicos, inducida por la exposición al antígeno. El sistema inmunitario adaptativo suele poseer tolerancia frente a antígenos propios (auto-tolerancia). El número de clones diferentes de células T que se estima que podemos poseer asciende a 10^{14} , de los cuales el 50% podrían reconocer total o parcialmente componentes del propio organismo (1).

La tolerancia puede establecerse tanto a nivel central como periférico. Así, la tolerancia central ocurre durante la maduración de los linfocitos T y B en los órganos linfoides centrales donde se generan (timo o médula ósea). En este proceso, los clones de linfocitos inmaduros que reconocen antígenos propios con alta afinidad son eliminados, o bien, en el caso de las células B, se va a desarrollar un proceso de edición del receptor, lo cual le permitirá reconocer a otro antígeno. Estos linfocitos van a reconocer los antígenos unidos a MHC en células presentadoras de antígenos y en células epiteliales de la médula del timo. Las células que lo hagan de un modo débil o intermedio van a ser seleccionadas y a migrar hacia órganos linfoides periféricos. Puesto que hay antígenos propios con una similitud elevada con antígenos extraños, y con la finalidad de no comprometer en exceso al sistema inmunitario va a haber un porcentaje de linfocitos T autorreactivos en todos los individuos. Además, en este proceso de selección se genera otra población de células T CD4⁺, conocidas como células T

reguladoras naturales, cuyo fenotipo es CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, y que constituirán el 5-10% de las células T circulantes (1).

El mecanismo de tolerancia en periferia se desencadena cuando linfocitos T maduros reconocen auto-antígenos en tejidos periféricos, e incapacita a estos linfocitos de responder frente a estos antígenos. Los procesos que se desencadenan son tres: Anergia, que consiste en un bloqueo en la señal de transducción inducida por el TCR, de modo que las células T no responden al estímulo; Supresión, que consiste en un bloqueo de la activación mediado por las células Treg; Depleción, que consiste en la inducción de muerte por apoptosis (1). También en periferia se generan células Treg, llamadas células Treg inducibles, las cuales se diferencian a partir de células CD4⁺ convencionales en tejidos periféricos en respuesta a elementos como citoquinas o antígenos (4). De esta manera las Treg generadas tras la influencia de IL-10, la cual puede ser producida por células dendríticas tolerogénicas, se llaman Tr1, mientras que las inducidas por TGF- β se conocen como Th3 (5). En general, las células Treg llevan a cabo la función supresora de la respuesta inmunitaria por distintos mecanismos, que incluyen entre otros, la competición de CD25 por la IL-2, la unión competitiva mediada por CTLA-4 (molécula coestimuladora inmunosupresora) a CD80 y CD86, así como a la secreción de citoquinas con acción supresora como son IL-10, IL-35, IL-9 y TGF- β . Las dianas de la supresión de las Treg incluyen a células efectoras CD4⁺, CD8⁺, células dendríticas e incluso células endoteliales (4).

En conjunto, las distintas poblaciones de células T CD4⁺ interactúan entre sí, de modo que buscan mantener la tolerancia inmunológica (**Figura 2**).

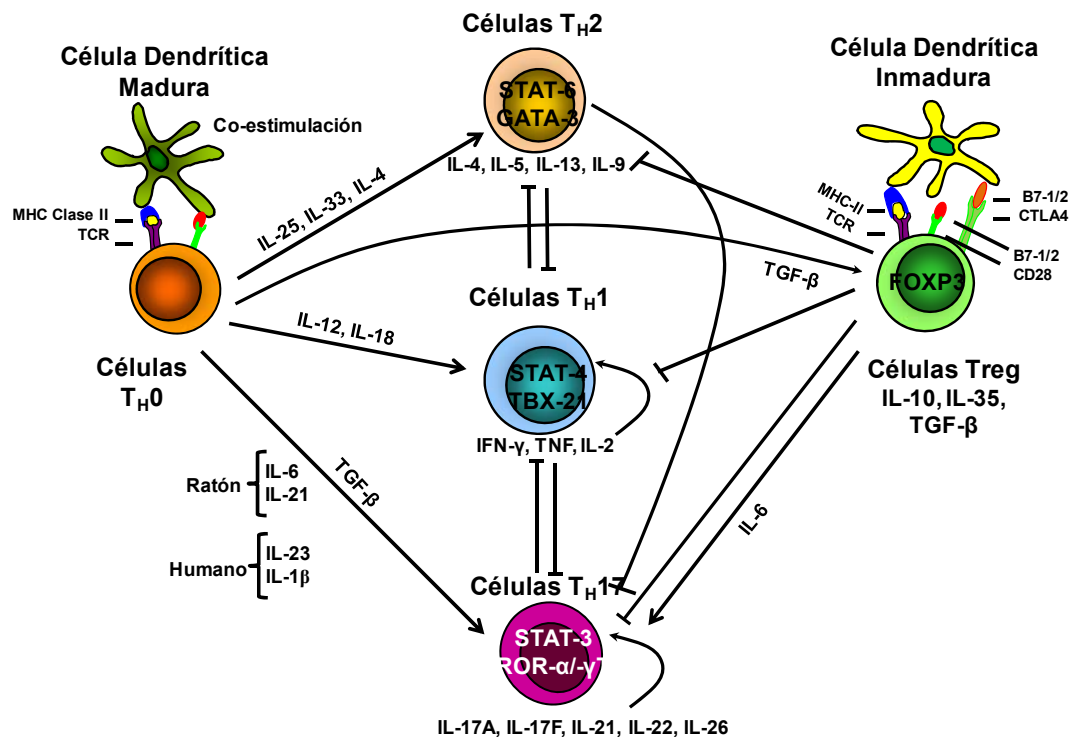


Figura 2. Diferenciación, activación e interacción entre distintos subtipos de células T. Las células dendríticas maduras polarizan a las células naive Th0 hacia los distintos subtipos de células T a través de distintas señales que incluyen la presentación antigénica a través del TCR, la secreción de citoquinas, y la señalización a través de moléculas coestimuladoras. Las células Th1, Th2 y Th17 se diferencian según los factores de transcripción que expresan y las citoquinas que liberan. Las células dendríticas inmaduras favorecen la diferenciación de las células Treg. Los distintos subtipos de células T interactúan entre ellos de un modo que queda representado esquemáticamente. \longrightarrow Representa señales activadoras mientras que \longleftarrow representa señales inhibitoras. Adaptado de (5).

Si la tolerancia inmunológica se pierde se desencadena una reacción frente a auto-antígenos. Al conjunto de estas reacciones se le llama autoinmunidad, y las enfermedades que desencadena son enfermedades autoinmunes. Según varios autores, las enfermedades autoinmunes se caracterizan por cumplir una serie de requisitos, llamados postulados de Koch, que son: 1. Presencia de auto-anticuerpos o evidencia de auto-reactividad celular; 2. Presencia de infiltrados linfocitarios en las lesiones; 3. Demostración de que los auto-anticuerpos, o las células T activadas, pueden causar patología en el tejido (6).

Los principales factores que contribuyen al desarrollo de autoinmunidad son la susceptibilidad genética y los factores ambientales, como son las infecciones y el daño tisular local. Así, por ejemplo, una situación de inflamación crónica puede desencadenar en la creación de una enfermedad autoinmune. Las enfermedades autoinmunes pueden ser sistémicas o locales, dependiendo de cómo sea la distribución de los autoantígenos que son reconocidos. En los países desarrollados la incidencia de las mismas varía según la enfermedad, yendo desde menos de un

0,05% en enfermedades como la uveítis, a más de un 0,5% en enfermedades como la artritis reumatoide (7). Unos ejemplos de enfermedad autoinmune son el lupus eritematoso sistémico, en la cual el sistema inmunitario ataca a elementos del tejido conjuntivo del organismo, o la artritis reumatoide, donde los auto-antígenos se localizan fundamentalmente en las articulaciones.

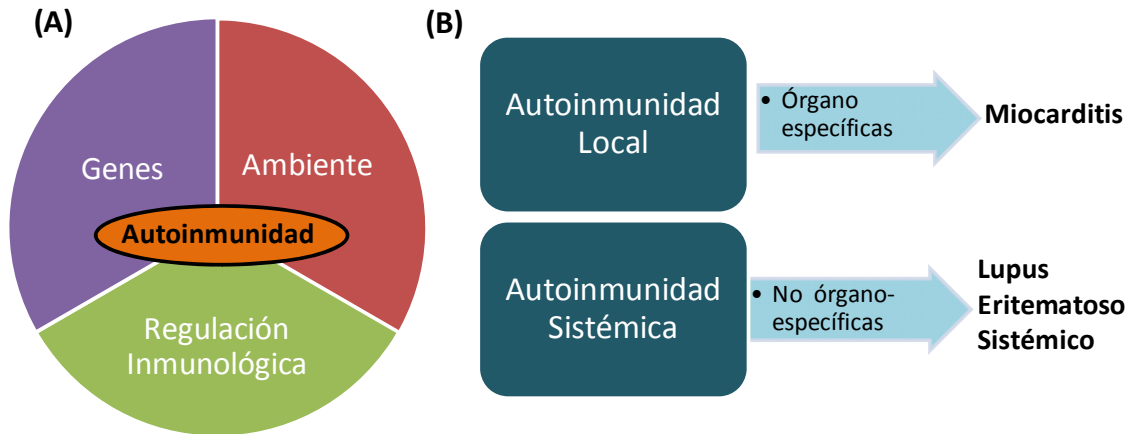


Figura 3. Autoinmunidad. A Principales factores que contribuyen al desarrollo de una enfermedad autoinmune. B. Tipos de autoinmunidad.

Las enfermedades inflamatorias y autoinmunes pueden desarrollarse en cualquier localización corporal. Nosotros vamos a estudiar dos enfermedades inflamatorias y autoinmunes que se engloban dentro de las enfermedades cardiovasculares.

3.3 Sistema Cardiovascular: Inflamación y Autoinmunidad en el sistema cardiovascular.

3.3.1 Sistema cardiovascular. Definición. Enfermedades cardiovasculares.

El sistema cardiovascular es el sistema encargado de distribuir la sangre por el organismo. Los componentes principales de este sistema son el corazón, la sangre y los vasos sanguíneos. En los seres humanos el sistema cardiovascular es un sistema cerrado, donde la circulación de la sangre es doble y completa, sin mezcla de sangre oxigenada y desoxigenada (8).

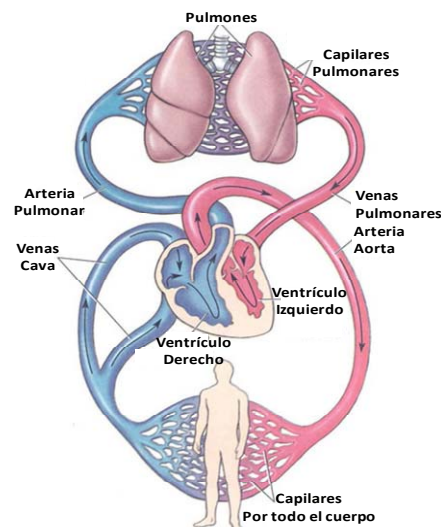


Figura 4. Sistema Cardiovascular.

Cuando se da una alteración más o menos grave para la salud que afecta a alguno de los componentes del sistema cardiovascular decimos que tenemos una enfermedad cardiovascular (ECV). La mayoría de las ECV están relacionadas con el bloqueo del flujo sanguíneo como consecuencia de una reducción de la luz del vaso, debido al depósito de lípidos en la pared interna de los vasos sanguíneos, o a la formación de trombos que pueden migrar y crear el daño en la zona en la que migran. Estos procesos son consecuencia de una enfermedad llamada aterosclerosis (9, 10).

En la **figura 5A** se muestra un esquema de las principales causas de muerte de la población mundial. Más concretamente, en la **Figura 5B** se refleja cuales son las principales ECV causantes de muertes en la población mundial.

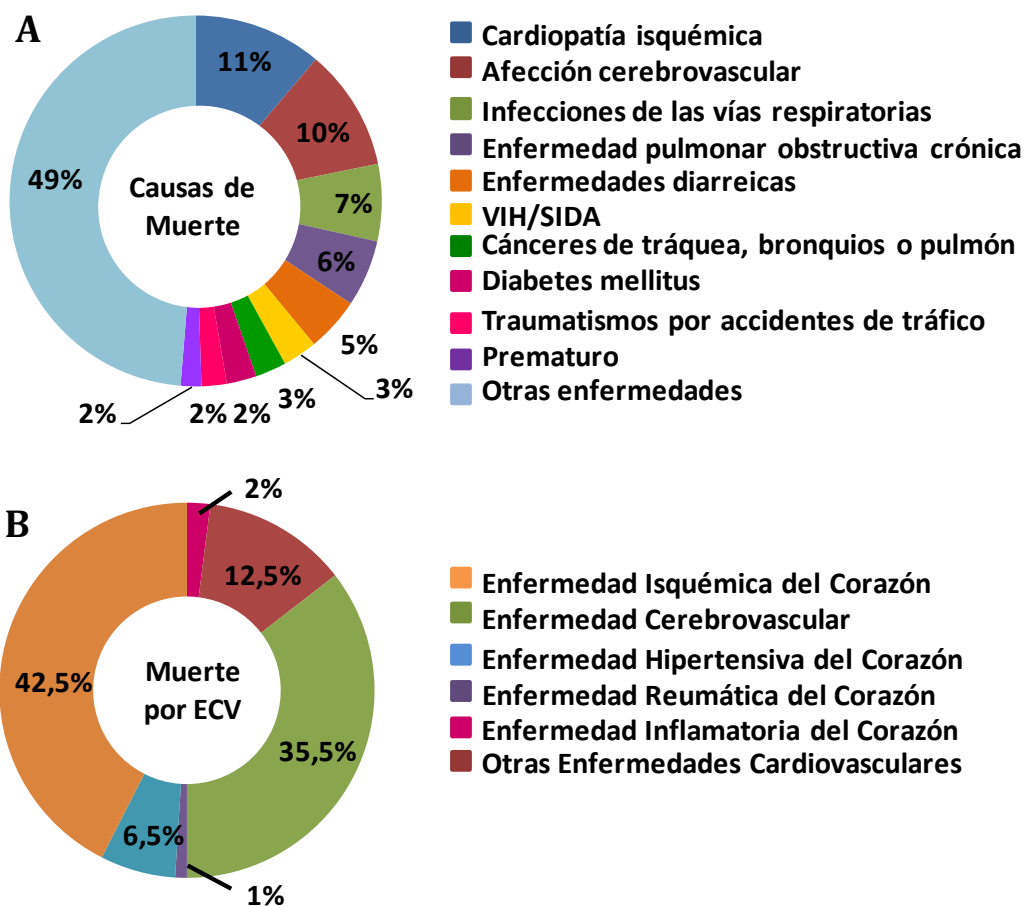


Figura 5. Incidencia de las Enfermedades Cardiovasculares como causa de muerte en la población humana. A: Porcentaje global de muerte. B: Principales causas de muerte por ECV. Adaptado (9, 11).

Según un estudio realizado en la universidad de Chapel Hill, en Carolina del Norte, hay un auge en la aparición de ECV que, en el año 2030, se espera sean las causantes del 31% de las muertes en el mundo (23,6 millones de personas).

La distribución epidemiológica de las enfermedades cardiovasculares es muy diversa, tal y como queda reflejado en la **Figura 6**.

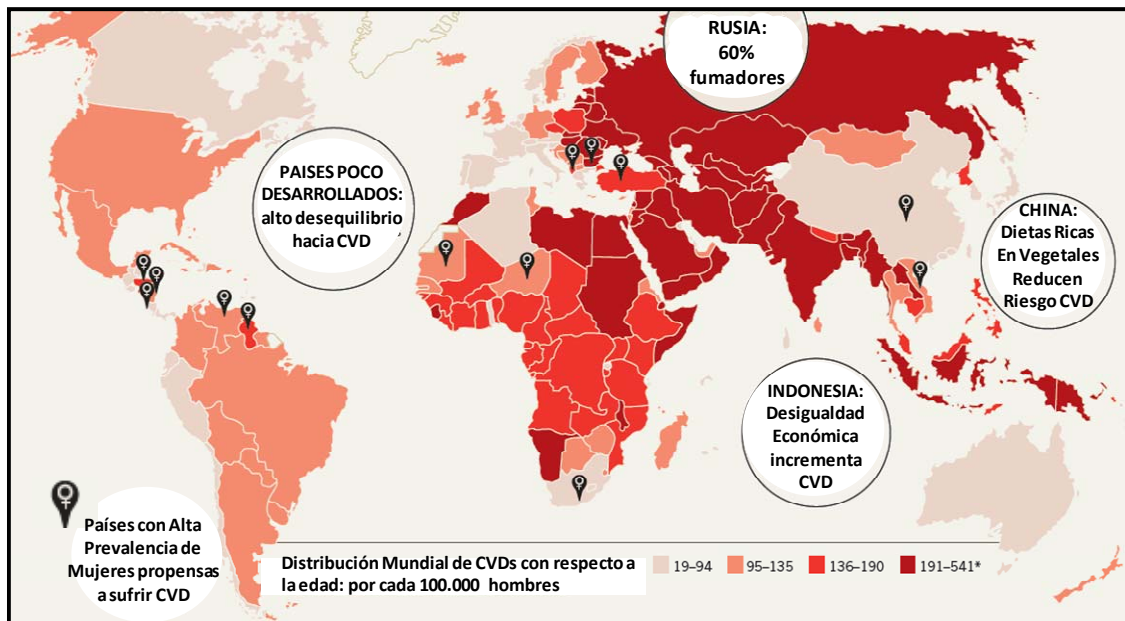


Figura 6. Distribución mundial de la ECVs. Patrón obtenido de los datos de población en edad con riesgo de sufrir ECVs referidos por cada 100.000 hombres de cada zona estudiada. Adaptado de (11).

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral nos vamos a centrar en dos ECV, inflamatorias y autoinmunes, como con la miocarditis autoinmune y la aterosclerosis, principal responsable de las ECV.

3.3.2 Miocarditis.

3.3.2.1 *Definición. Etiología.*

Según la OMS la miocarditis se define como una enfermedad inflamatoria del miocardio y se diagnostica mediante biopsia del corazón usando criterios histológicos, inmunológicos e inmunohistoquímicos establecidos (12).

Fue en 1669 cuando el doctor Richard Lower publicó en su tratado del corazón que la inflamación del mismo era algo patológico. Sin embargo, no es hasta mediados del siglo veinte cuando va a volver el interés en esta enfermedad por parte de los patofisiólogos, al ver, en estudios post mortem, que la incidencia de de la misma era bastante elevada (13).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son muy diversas, pudiendo ser asintomáticas o con síntomas que van desde los no específicos (fiebre, mialgias, palpitaciones), hasta colapsos hemodinámicos fulminantes y muerte súbita. Es por ésto que la incidencia real de la miocarditis en la población es difícil de determinar, por lo que no existen cifras concretas. No obstante se puede decir que entre el 10 y

el 20% de los pacientes con evidencias histológicas de inflamación cardiaca, aún cuando ésta sea asintomática, desarrollarán una enfermedad crónica que eventualmente desencadenará en una cardiomiopatía dilatada (14). De igual modo hay estudios que muestran que cerca del 20% de las muertes súbitas en adultos jóvenes y atletas son consecuencia de una miocarditis (15).

En cuanto a la etiología de la enfermedad cabe destacar a los agentes víricos como los principales causantes de la misma (16, 17). Se han realizado diversos estudios serológicos y moleculares que han asociado la miocarditis principalmente con coxsackievirus B (CVB), así como con adenovirus, parvovirus, el virus de la hepatitis C, el virus de Epstein-Barr, el citomegalovirus o el herpesvirus 6 (17). Además de los virus hay otros agentes infecciosos que pueden desencadenar miocarditis. Éstos agentes llegan a ser la principal causa de esta enfermedad en las zonas endémicas donde se encuentran, entre ellos están *Borrelia burgdorferi*, causante de la enfermedad de Lyme, *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas, y otros agentes como hongos del género *Aspergillus* o parásitos como *Toxoplasma gondii* (16). También se ha visto que se puede desarrollar miocarditis a partir de otros factores, como las reacciones de hipersensibilidad inducida por drogas, metales pesados, o radiaciones (16).

Finalmente, otro aspecto a tener en cuenta es el componente genético que posee esta enfermedad. Se calcula que el 30-50% de los casos de cardiomiopatía dilatada tienen un origen genético. Se ha observado que mutaciones en distintos genes, con herencia autosómica dominante, recesiva, ligados al cromosoma X o mitocondrial, están implicados en el desarrollo de esta patología (18).

3.3.2.2 Tipos de Miocarditis.

La clasificación de la miocarditis depende del autor que la describa. Basándonos en el trabajo de Marchant y colaboradores, la clasificaremos en cuatro grupos según cuál sea la causa de la inflamación en el músculo cardiaco, todos ellos con participación de células CD4⁺, CTL, Th17, Treg, células B, Células NK, sistema del complemento, y con desarrollo de respuestas inmunitarias innata y adaptativa (19):

- Isquemia y reperfusión del miocardio (IR): Cuando el músculo cardiaco ve limitado el riego sanguíneo se produce una isquemia en la zona, la cual dará lugar a una necrosis celular si no se da una reperfusión del flujo. Sin embargo, la restauración del flujo sanguíneo trae consigo una serie de eventos que desembocan en la producción de especies reactivas de oxígeno, variaciones iónicas, formación de microembolismos, activación plaquetaria y edema intersticial que hace que el flujo sanguíneo en capilares y microcapilares esté

interrumpido. Como consecuencia de todo esto se induce un estado inflamatorio.

- Sepsis e inflamación del miocardio: Ante una situación de infección severa o sepsis severa se puede provocar un fallo circulatorio. En respuesta a señales de daño, los cardiomiocitos van a desencadenar una respuesta inflamatoria, expresando citoquinas pro- y anti-inflamatorias, quimioquinas, moléculas de adhesión, como ICAM-1, y moléculas reguladoras del calcio que intervienen en la contractibilidad de los cardiomiocitos.
- Rechazo de alotrasplante cardiaco. Se produce tras el rechazo de un alotrasplante cardiaco en pacientes que poseen una enfermedad cardiaca terminal. El rechazo está mediado por procesos celulares y humorales, de modo que después del trasplante las células presentadoras de antígeno, tanto del donante como del hospedador, van a presentar antígenos desencadenando un alo-reconocimiento directo e indirecto que va a activar a células T y células B, potenciando la respuesta inflamatoria.
- Miocarditis vírica y autoinmune. Representan las formas mayoritarias de miocarditis. En este apartado se incluye la forma de miocarditis que estudiaremos en más profundidad en el desarrollo de esta tesis doctoral.

3.3.2.2.1 Miocarditis vírica y autoinmune.

El hecho de englobar ambas modalidades en un mismo apartado se debe a que la miocarditis se entiende como un proceso continuo, que comienza con un proceso inflamatorio desencadenado por una infección, generalmente causada por un agente vírico, y que si no es eliminado evoluciona a un estado crónico que desencadena una respuesta autoinmune. Como ya hemos indicado, los agentes víricos son los principales agentes causantes de la miocarditis. Así, por ejemplo, se sabe que el 50% de los casos de miocarditis en EE.UU. son el resultado de una infección con CVB (17).

El considerar la miocarditis como una enfermedad autoinmune se apoya en una serie de evidencias como son, el que exista una asociación entre la miocarditis y otras enfermedades autoinmunes, como el lupus, y el que el 59% de los pacientes con miocarditis tienen anticuerpos frente a antígenos específicos cardiacos (20). Uno de estos antígenos es la miosina cardiaca, presente en el 86% de los pacientes con cardiomiopatías dilatada. Sin embargo, la presencia de anticuerpos frente a la miosina no es exclusivo de los pacientes con miocarditis, sino que también los poseen pacientes con otras enfermedades cardiacas (21). Por último, otro aspecto que revela el componente autoinmune de algunos tipos de miocarditis es que el

uso de terapias inmunosupresoras en algunos pacientes con otras enfermedades autoinmunes resulta beneficioso en el tratamiento de la miocarditis (22).

Debido a la dificultad para estudiar esta enfermedad en humanos la mayoría de los aspectos que se conocen de la misma se basan en estudios con modelos animales o en cultivos celulares *in vitro*.

3.3.2.3 Modelos animales de miocarditis.

Fundamentalmente se usan dos modelos animales para entender el desarrollo de la enfermedad, uno de miocarditis vírica inducida por la infección del CVB3, y otro de miocarditis experimental autoinmune (MAE), inducido por la inmunización con péptidos procedentes de la miosina cardiaca. Hay un tercer modelo, menos utilizado, que usa a la troponina I como autoantígeno (23, 24).

3.3.2.3.1 Miocarditis inducida por Coxsackievirus 3 (CVB3).

Dentro de esta modalidad hay dos variedades. La primera reproduce un modelo de miocarditis viral aguda, induciendo daño directo a los cardiomiocitos, y provocando la muerte de la mayoría de los animales infectados durante la primera semana tras la infección. La segunda modalidad consiste en una infección con CVB3 inactivados por calor de algunas cepas sensibles, la cual cursa con una primera fase caracterizada por daño a los cardiomiocitos debido a la citotoxicidad de los virus, seguida por una segunda fase, que desarrollan los animales que sobreviven a la fase aguda, asociada a la producción de autoanticuerpos específicos frente al músculo cardiaco y a una infiltración de células mononucleares en el corazón (23, 25).

3.3.2.3.2 Miocarditis autoinmune experimental (MAE, inducida por miosina cardiaca).

La miosina cardiaca es uno de los autoantígenos dominantes en la miocarditis inducida por virus. La fase tardía de la miocarditis inducida por CVB3 puede ser mimetizada con la inmunización de los ratones con la miosina cardiaca purificada en ausencia de infección (26). Así, la inmunización de cepas susceptibles (**Tabla 1**) con la miosina cardiaca, o con fragmentos peptídicos derivados de la cadena pesada α de la miosina cardiaca, emulsionados junto con Adyuvante Completo de Freud (CFA), es capaz de inducir miocarditis en ratones, con un pico de inflamación que se produce a día 21 tras la inmunización (27). Dicha inmunización está asociada a la producción de autoanticuerpos específicos frente a la miosina cardiaca así como la producción de células T autorreactivas (28, 29). Este modelo puede progresar a un estado de cardiomiopatía dilatada, el cual se consigue tras una re-estimulación con la miosina cardiaca una vez pasado el primer pico de infiltración de la enfermedad (30).

Tabla 1. Susceptibilidad a padecer MAE de las distintas cepas de ratón.

Cepa Ratón	Prevalencia Miocarditis	Severidad Miocarditis	Título Auto-anticuerpos
A/J	+++	+++	++++
A.BY/SnJ	+	++	+++
A.CA/SnJ	+++	+++	++++
A.SW/SnJ	++++	++++	++++
B10.A/SgSnJ	++	+++	+++
BALB/C	+++	+++	++++
C57BL/10J	-	-	++
C57BL/6J	-	-	++
DBA/2	+++	+++	+++

Escala de intensidad: -: Ausencia; +: Leve; ++: Intermedia; +++: Intermedia-Alta; ++++: Alta.

3.3.2.4 Fases de la miocarditis.

Basándose en los estudios en modelos animales se han descrito tres fases en el desarrollo de la miocarditis (**Figura 7**), aunque los mecanismos exactos implicados en el inicio y progresión de las mismas no se conocen completamente (31, 32).

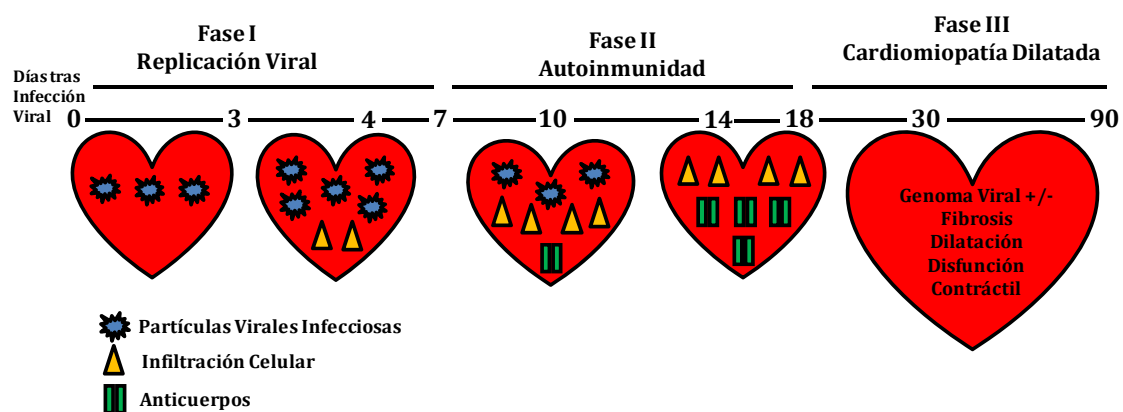


Figura 7: Fases de la miocarditis La miocarditis se divide en tres fases continuas que son: Fase I: Infección viral; Fase II: Autoinmunidad; Fase III: Cardiomiopatía dilatada. Durante la progresión de la enfermedad aparecen diversos elementos de la respuesta inmunitaria: infiltración celular y depósito de anticuerpos. Adaptada de (32).

3.3.2.4.1 Fase I: Infección viral

La primera fase de esta enfermedad se basa en el daño a cardiomiocitos, generado fundamentalmente por la infección por parte de un agente vírico. Como se ha indicado con anterioridad, son varios los virus que pueden causar la

miocarditis, tomando especial importancia los adenovirus y los CVB (CVB3 y CVB4). Los distintos agentes virales van a tener distintas células diana dentro del corazón, así por ejemplo, los virus del género enterovirus, dentro de los cuales se encuentran los coxsackievirus, infectan a los cardiomiocitos, mientras que otros virus, como los de la familia de los adenovirus, infectan tanto a cardiomiocitos como a fibroblastos o a células endoteliales (33). El reconocimiento vírico se va a llevar a cabo mediante los TLRs, fundamentalmente TLR3 y 4, cuya presencia se ha detectado en el corazón (34).

La replicación vírica va a favorecer la necrosis de los cardiomiocitos, los cuales van a exponer antígenos intracelulares (ej. miosina cardiaca) al exterior, activando la respuesta inmunitaria del organismo (32). Así, en un primer momento se va a producir una invasión de células NK, macrófagos y otros granulocitos, seguida de linfocitos T (32).

Las células NK son células que se activan inmediatamente después de una infección, y son atraídas por citoquinas y quimioquinas a los sitios de infección. Junto con los macrófagos van a producir citoquinas, y otras sustancias como perforinas, que favorecen la eliminación de las células infectadas y van a activar a la respuesta inmunitaria adquirida mediante la liberación de IFN- γ (35). La cepa de ratón BALB/c, deficiente en células NK 1.1, es más susceptible a desarrollar miocarditis, mientras que la depleción de este tipo celular en cepas más resistentes, como la C57BL/6, vuelve a estos ratones más susceptibles a sufrir la enfermedad, dando una idea de la importancia de este tipo celular en miocarditis (36).

Los granulocitos, fundamentalmente neutrófilos y eosinófilos, infiltran también el miocardio, y su proporción aumenta conforme aumenta la severidad de la inflamación (29). Tras su activación, liberan enzimas proteolíticas y radicales libres que pueden dañar tanto a los cardiomiocitos como a la matriz extracelular (37). Los mastocitos que residen en el corazón son capaces de degranular en respuesta a un estímulo infeccioso o inflamatorio, siendo una fuente de citoquinas y de proteasas, mediando en la respuesta inmunitaria innata y en la creación de daño local (38).

Por su parte, los macrófagos van a representar el mayor infiltrado en el corazón, tanto en un modelo de MAE tras 21 días de inoculación de la miosina, como en un modelo de miocarditis vírica tras 10 días de infección con CVB3 (39). Además, estos macrófagos se corresponden con macrófagos tipo M1, los cuales proceden de un pico de infiltración de monocitos Ly6^{high}. En este sentido, se ha visto que el bloqueo de quimioquinas relacionadas con el reclutamiento de monocitos disminuye la severidad de la enfermedad en MAE, como es el caso del bloqueo de CCL2 o CCL3, el cual disminuye la infiltración de monocitos Ly6^{high},

con la consecuente reducción de los signos clínicos (40). El papel de cada subpoblación de macrófagos, M1 y M2, se ha comprobado en estudios con animales. Así, se ha visto que la deficiencia en IL-13, citoquina involucrada en la diferenciación a macrófagos M2, genera un fenotipo más agresivo de miocarditis, con menos macrófagos M2 y más macrófagos M1 infiltrantes (41). En otro estudio se revela que la severidad de la enfermedad depende del sexo, el cual influye en la presencia relativa de macrófagos M1 y M2. De este modo, los ratones machos son más susceptibles a sufrir inflamación cardíaca tras la infección con CVB3, lo cual se correlaciona con una mayor proporción de macrófagos M1 infiltrantes, mientras que en hembras los macrófagos muestran un perfil M2 (42).

Esta fase de infección viral dura 4-7 días (**Figura 7**), y el tratamiento ideal para la misma consiste en la terapia antiviral. No obstante, puesto que en la mayoría de los casos no se identifica el virus que la produce, el tratamiento suele ser sintomático (43).

3.3.2.4.2 Fase II: Autoinmunidad

Si la activación inmunitaria en el miocardio se mantiene, a pesar de la eliminación de los agentes víricos, puede desencadenar una respuesta autoinmune, iniciándose así la segunda fase de la enfermedad. Esta fase está marcada por la actuación de las células T, las cuales van a reconocer como extraños antígenos del propio organismo, consecuencia del mimetismo molecular que existe entre antígenos virales y los propios (32). Estos antígenos son presentados por las células dendríticas (DC), las cuales se acumulan en el corazón en situaciones de inflamación cardíaca, donde aumentan la expresión de MHC-II en respuesta a estímulos inflamatorios(44). Tienen un papel en el desarrollo de la miocarditis, de modo que se ha visto que la inyección en ratones BALB/c de DC maduras que han sido estimuladas *in vitro* con un péptido derivado de la miosina cardíaca, son capaces de inducir MAE en los ratones al desencadenar una fuerte respuesta de células T CD4⁺(45). Por otro lado, hay estudios que demuestran la importancia que poseen citoquinas producidas por las DC en esta enfermedad, como son TNF- α , IL-6, IL-1 o IL-12, las cuales se requieren para el desarrollo de la misma (46, 47).

Las células T son la principal población celular involucrada en esta fase y en el desarrollo de la miocarditis en general (45). En este sentido, la transferencia de linfocitos sanguíneos de pacientes con cardiomiopatía dilatada (DCM) a ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) favorece la aparición de fibrosis en el miocardio (48). La importancia de los distintos tipos de linfocitos se ha contrastado con diferentes estudios en animales. Así, la depleción de las células T CD4⁺ en ratones A/J con MAE previene el desarrollo de la enfermedad, y la depleción de las CD8⁺ disminuye la severidad de la misma, siendo predominante la presencia de CD4⁺ con respecto a las CD8⁺ en el infiltrado celular en un modelo de

MAE(49). Además, las células CD4⁺ son las únicas cuya presencia correlaciona con el deterioro de la función sistólica, considerándose la única población celular marcadora de la progresión de la miocarditis y de la disfunción cardiaca (29).

Dentro de las células CD4⁺ tenemos varios subtipos que desempeñan un papel diferente. En este sentido, los fenotipos pro-inflamatorios, es decir, las células Th1 y Th17, van a tener un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad. Fuses y colaboradores muestran como durante la fase efectora de la enfermedad hay un pico en la población de células Th1 (50). Por otra parte, se sabe que la citoquinas IL-23, necesaria para la supervivencia de las Th17, es esencial en el desarrollo de la miocarditis (51).

El papel de las subpoblaciones de células CD4⁺ Th2 o Treg también se ha analizado. De este modo, Afanasyeva y colaboradores observaron que la IL-4 es necesaria para el desarrollo de la MAE en ratones A/J (27). Por otro lado, se ha visto que las células Treg son protectoras en el desarrollo de la miocarditis, tanto vírica (52) como autoinmune (53), y la disminución de las mismas está asociada con un fenotipo más agresivo de la enfermedad (41).

Otras poblaciones de células T, como las células T CD8⁺, las células NKT o las T $\gamma\delta$ se han estudiado menos en el caso de la MAE, no así en modelos de miocarditis inducida por CVB3, donde van a ejercer una actividad citotóxica, acumulándose en el corazón, donde representan hasta el 50% de las células CD3⁺ en el infiltrado inflamatorio (54).

En esta fase aguda también se activan las células B, llegando a constituir en torno al 5% del infiltrado en MAE (29). Además, la severidad de la enfermedad se relaciona con los títulos de anticuerpos frente a la miosina cardiaca de tipo IgG1 en ratones A/J y BALB/c (27). El papel que tienen los anticuerpos en el inicio de la enfermedad depende de la expresión de miosina en cada cepa de ratón (55). Sin embargo, aunque se ha visto que los anticuerpos poseen la capacidad de inducir miocarditis en algunas cepas, éstos son dispensables para el desarrollo de MAE puesto que ratones deficientes en células B son capaces de desarrollar miocarditis (55, 56). En humanos también se ha detectado la presencia de anticuerpos frente a epítomos cardiacos en la circulación de pacientes con miocarditis y con DCM, y son varias las moléculas que reconocen, entre ellas las isoformas α y β de la cadena pesada de la miosina cardiaca, antígenos mitocondriales o receptores cardiacos muscarínicos de tipo M2 o β 1 adrenérgicos (57).

Durante esta fase los tratamientos que se utilizan se basan en el uso de inmunosupresores.

3.3.2.4.3 Fase III: Cardiomiopatía dilatada (DCM).

Son varios los mecanismos que van a desencadenar procesos de remodelación de la estructura y función cardíaca, causando fibrosis y DCM (43). En este sentido, se ha visto que los CVB expresan una proteasa que va a modificar el complejo de sarcoglicanos de los cardiomiocitos, lo cual contribuye a la dilatación de los ventrículos del corazón. Las citoquinas liberadas durante la fase aguda autoinmune también favorecen esta remodelación al activa(31). Por otro lado, los virus causan muerte por apoptosis en los cardiomiocitos, y las citoquinas pueden activar dominios de muerte o rutas de señalización mediadas por ceramidas que intervienen en los procesos de remodelación y de fallo cardíaco (31)

Durante esta tercera fase, el tratamiento que se usa va encaminado a mejorar la función cardíaca, para lo cual se utilizan drogas como inhibidores de la encima convertidora de angiotensina, diuréticos y β -bloquean(32).

3.3.3 Aterosclerosis.

3.3.3.1 *Definición. Etiología.*

Hace 20 o 30 años se entendía la aterosclerosis como una enfermedad de simple almacenaje lipídico: depósitos lipídicos formados en la superficie de las arterias que crecían hasta restringir o bloquear el flujo sanguíneo a los tejidos, lo cual da lugar a eventos cardiovasculares como infartos de miocardio o apoplejías. Hoy en día el concepto de aterosclerosis es más complejo. Se entiende que la aterosclerosis es una enfermedad crónica inflamatoria, con un componente autoinmune, caracterizada por una intensa actividad inmunológica (58). Conlleva la formación de lesiones en la capa íntima de algunas arterias (**Figura 8**), caracterizadas por inflamación, acumulación lipídica, muerte celular y fibrosis. Además, estas lesiones, conocidas como placas ateroscleróticas, maduran y adquieren nuevas características.

Aunque parte de las complicaciones clínicas de la aterosclerosis provienen del hecho de que la formación de las placas da lugar a una estenosis en la luz del vaso, con la consecuente disminución del flujo sanguíneo, los aspectos más severos de esta enfermedad son debidos a la ruptura de las placas, con la consecuente exposición del material protrombótico a la sangre. Ésto provoca oclusiones debido a la formación de trombos en la zona de ruptura y la migración de los mismos (59). La prevalencia de esta enfermedad está aumentando en todo el mundo por una adopción de un estilo de vida occidental, la cual alcanzará proporciones epidémicas en las próximas décadas (11).

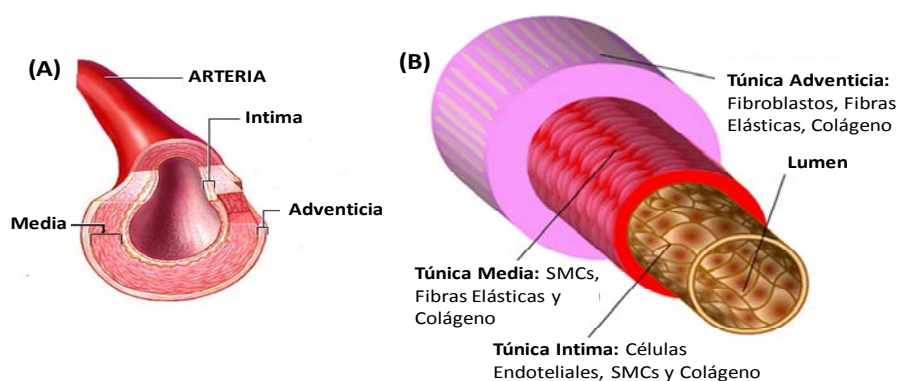


Figura 8. Estructura de una arteria. **A.** Morfológicamente una arteria está formada por la capa o túnica íntima, media y adventicia. **B** Principales componentes de las distintas túnicas. La capa íntima está formada por una monocapa de células endoteliales rodeada por una lámina basal que la envuelve y una capa de tejido conjuntivo subendotelial. La capa media está compuesta por SMC (del inglés *Smooth Muscle Cell*) y una lamina interna elástica. La capa adventicia consiste en algunos fibroblastos embebidos en una matriz extracelular compuesta por una gruesa madeja de fibras de colágeno (80%) orientadas a lo largo del eje longitudinal del vaso. Además de fibroblastos podemos encontrar otros componentes como terminaciones nerviosas, microvasos sanguíneos o mastocitos.

Los factores de riesgo que desencadenan esta enfermedad son múltiples y variados, incluyéndose tanto factores ambientales como genéticos (60). El mayor desencadenante parece ser el nivel elevado de colesterol en sangre, hecho que se asocia con un mayor riesgo de mortalidad por enfermedades coronarias (**Figura 8**). Dentro de éste, se ha visto que la abundancia relativa de las distintas lipoproteínas plasmáticas es importante, de modo que niveles elevados de lipoproteínas de baja densidad (LDL) o de muy baja densidad (VLDL), son proaterogénicos (61), mientras que un nivel elevado de HDL (lipoproteína de alta densidad) es indicador de tener bajo riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (62).

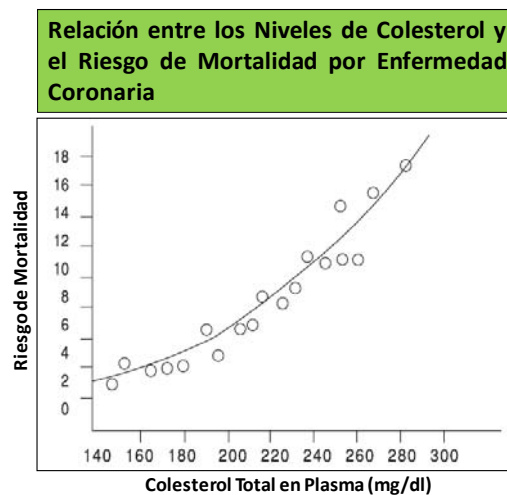


Figura 9. Niveles de Colesterol y riesgo de mortalidad por enfermedad coronaria. Adaptada de (63).

La hipertensión, el tabaquismo, tener una dieta rica en grasas o tener diabetes u obesidad son también factores de riesgo en esta enfermedad (64). Con estudios de asociación de genoma completo se ha permitido la identificación de genes significativamente asociados a aterosclerosis. Variantes génicas de genes relacionados con el metabolismo del colesterol pueden afectar a la predisposición a padecer dicha enfermedad. Este es el caso de la relación encontrada entre el gen que codifica la proproteína convertasa subtilisin/kexin tipo 9 (PSCK-9), cuya inhibición disminuye los niveles de colesterol en sangre, y protección frente a la enfermedad (65).

3.3.3.2 Fases de la enfermedad.

La aterosclerosis es una enfermedad dinámica, cuya progresión podríamos dividir en tres fases que serían: formación de la lesión inicial, progresión de la placa aterosclerótica y, finalmente, formación de trombos (**Figura 10**).

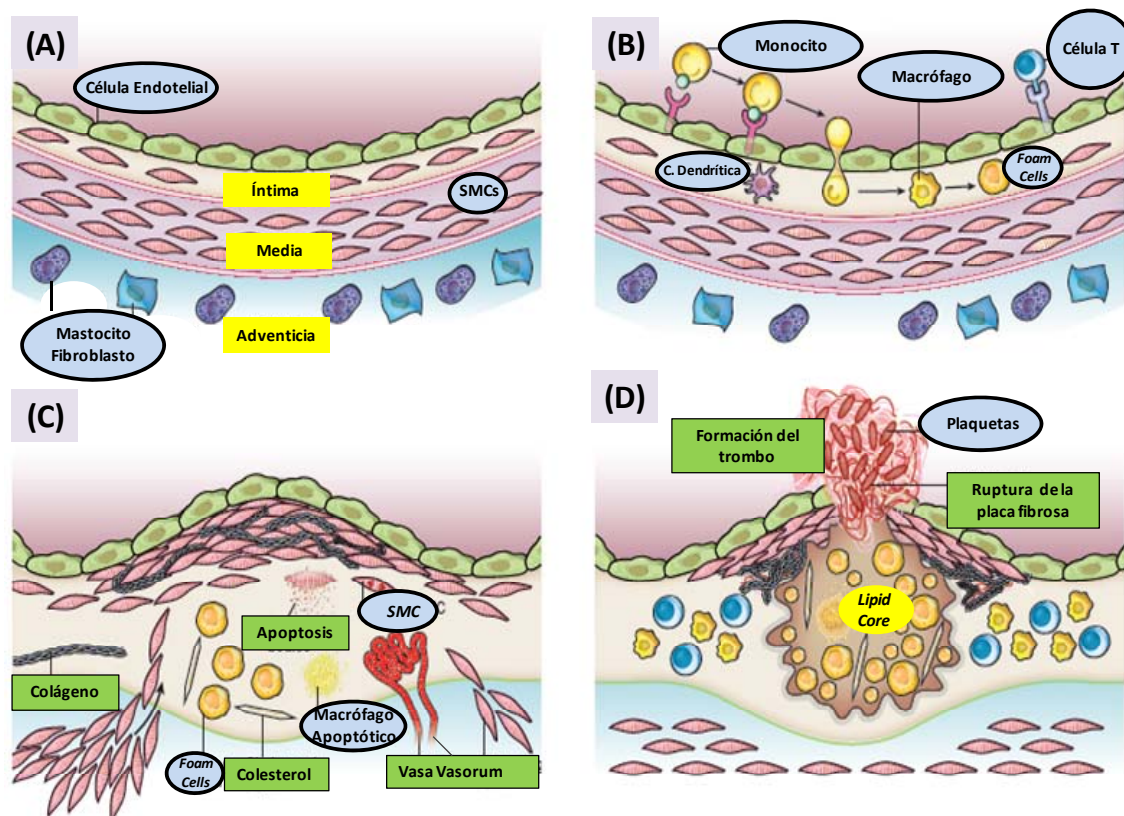


Figura 10. Fases en el desarrollo de una placa aterosclerótica. A. Estructura normal de una arteria. B. Los pasos iniciales de la formación de una placa aterosclerótica incluyen la adhesión de leucocitos sanguíneos a la monocapa endotelial activada, migración de los mismos dentro de la íntima, maduración de los monocitos a macrófagos, y su transformación en células espumosas (Foam cells). C. La progresión de la enfermedad conlleva la migración de las células musculares lisas (SMCs) desde la media a la íntima, la proliferación de las mismas y una síntesis activa de matriz extracelular (colágeno, elastina y proteoglicanos). Algunos de los macrófagos de la placa y de las SMCs van a morir, liberando parte de los lípidos. Este conjunto da lugar a la formación de un núcleo necrótico. Si la placa está muy avanzada también se pueden ver cristales de colesterol y microvasos. D. La trombosis, la última complicación de la aterosclerosis, suele llevar consigo una rotura física de la placa, lo cual favorece procesos de coagulación sanguínea, formándose trombos que se extienden en la luz del vaso impidiendo el flujo sanguíneo. Adaptado de (66).

3.3.3.2.1 Lesión inicial.

El comienzo de la enfermedad está marcado por la creación de daño en la monocapa de células endoteliales que está delimitando la superficie arterial interna. El endotelio, que actúa como una barrera de permeabilidad selectiva entre la sangre y el tejido colindante, posee funciones tanto sensoriales como efectoras. De modo normal las células endoteliales buscan mantener la salud vascular manteniendo la homeostasis de sus funciones, que son, hemocompatibilidad (para evitar la formación de trombos), regulación del tono vascular y mantener una situación anti-inflamatoria ante condiciones de estrés creadas por el flujo sanguíneo (67).

El estrés creado por el flujo sanguíneo es la fuerza física más importante que actúa sobre las células endoteliales. Dicho estrés afecta incluso a la morfología celular, de modo que en los segmentos tubulares lineales de las arterias, donde el flujo es uniforme y laminar, las células endoteliales tienen una forma elíptica y se alinean en la dirección del flujo, mientras que en segmentos de curvatura o ramificación, donde el flujo es más irregular, la forma de la célula endotelial es poligonal y no presenta una orientación particular. Es en estos segmentos donde la permeabilidad a macromoléculas, tales como el LDL, está aumentada, siendo por tanto zonas preferentes para la formación de las lesiones (64, 68). Además es en estas regiones donde se da una pérdida en la homeostasis de las actividades del endotelio. Parte de la disfunción endotelial se debe a un aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a nivel mitocondrial y a una disminución de la bioactividad del óxido nítrico (NO), que es el principal factor homeostático local, con propiedades anti-aterogénicas(6).

La acumulación de ROS causa alteraciones en la integridad endotelial, dañando directamente al ADN, a lípidos, proteínas y glúcidos. Las proteínas desnaturalizadas van a mostrar defectos en el plegamiento y en la funcionalidad, mostrando más inestabilidad y tendencia a agregarse. Se crea la llamada respuesta a estrés, desencadenando un mecanismo dirigido a prevenir el daño celular antes de que llegue a ser irreversible, el cual está liderado por la producción de proteínas de choque térmico (HSP) (6). Las HSP son proteínas de estrés presentes en todos los organismos y que poseen distintas localizaciones celulares. Se agrupan en 5 familias de acuerdo con su peso molecular, y la familia de HSP60 es la de mayor interés en la patogénesis de la aterosclerosis (60). Las HSPs funcionan intracelularmente como chaperonas, ayudando a las proteínas de nueva síntesis a adquirir una correcta configuración durante su plegamiento, así como a un correcto ensamblaje de las distintas subunidades y un transporte adecuado durante su translocación a través de las distintas membranas subcelulares hacia los distintos compartimentos celulares. Las HSPs expresadas en la superficie de las células endoteliales actúan como señales de daño para el sistema inmunitario, permitiendo, en el caso de que fuese necesario, la eliminación de las células marcadas. Se ha visto que en pacientes con aterosclerosis los niveles de anticuerpos frente a HSP, fundamentalmente HSP60/65, están elevados, y se consideran indicadores de pronóstico de esta enfermedad, así como autoantígenos de la misma (69).

Como ya hemos indicado, el LDL presente en la sangre se va a extravasar en las zonas donde la permeabilidad endotelial está aumentada, acumulándose en la matriz subendotelial, donde queda retenido tras la interacción de la apolipoproteína B (apoB, principal apolipoproteína del LDL) con los proteoglicanos de la matriz extracelular (70). Debido al ambiente oxidativo que tenemos en esta zona (alta cantidad de ROS), el LDL va a sufrir procesos de

oxidación en sus ácidos grasos poli-insaturados. Como consecuencia de las alteraciones que se crean en la estructura del LDL, se van a formar auto-antígenos. Así, el LDL oxidado (oxLDL) se convierte en uno de los principales auto-antígenos en aterosclerosis. En este sentido, hay evidencias que correlacionan los títulos de anticuerpos frente a epítomos del oxLDL en plasma y la formación de complejos inmunes con oxLDL en las placas de pacientes, con un mayor riesgo a padecer ECV (71).

Las funciones del oxLDL son muy diversas. Cuando pasa por un estado de mínima oxidación, estado en el que aún no es reconocido por los receptores SR (del inglés *scavenger receptor*) de los macrófagos y células musculares presentes en la íntima, tiene una clara actividad pro-inflamatoria (64). Dentro de su papel pro-inflamatorio, el oxLDL estimula a las células endoteliales, induciendo la expresión de moléculas proinflamatorias por parte de las mismas, incluyendo moléculas de adhesión, quimioquinas, o factores de crecimiento como el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) (72), induciendo la producción de HSP (6), e inhibiendo la producción de NO (73).

El aumento en la expresión de moléculas de adhesión va a favorecer la infiltración de células inmunitarias, fundamentalmente monocitos y linfocitos. Entre las moléculas de adhesión que expresan las células endoteliales, en el sitio donde tendrá lugar la formación de la placa, se encuentra las selectinas E y P, moléculas implicadas en el rodamiento o *rolling* de los monocitos y los linfocitos circulantes sobre la superficie endotelial. Estas moléculas se unen a ligandos glicosilados de selectinas de las células inmunitarias, aunque dicha unión no es una unión muy fuerte, siendo necesaria la actuación de otras moléculas de adhesión, como son las integrinas, cuya activación está mediada por las propias selectinas y por quimioquinas (74). Tras su activación las integrinas llevan a cabo una serie de cambios conformacionales que las hacen aumentar la afinidad por sus respectivos ligandos (75). La integrina más relevante en aterosclerosis es la VLA-4 (del inglés *very late antigen-4*), y su ligando es la molécula de adhesión a células vasculares 1 (VCAM-1) (76).

La infiltración de las células inmunitarias es fundamental en el inicio y progresión de la aterosclerosis. El conjunto de estas células va a favorecer el desarrollo de la respuesta inflamatoria en la placa. Por otro lado la infiltración de células como las Treg va a contrarrestar la respuesta pro-inflamatoria. A continuación destacaremos el papel de las principales poblaciones inmunitarias que van a infiltrar en la placa, incluyendo monocitos, las DC y células T.

En el caso de los monocitos, se ha descrito que, en situación de hipercolesterolemia, existe una movilización selectiva de monocitos Ly6C^{high}, los cuales se adhieren preferentemente a zonas de endotelio activado (77). Los

monocitos una vez que transmigran a las zonas de lesión son diferenciados a macrófagos bajo la influencia del M-CSF, el cual estimula la expresión de SR por parte de los macrófagos (59, 71). Los SR van a reconocer epítomos específicos en oxLDL, y van a mediar la endocitosis de lipoproteínas modificadas por parte de macrófagos. Esto va a favorecer la formación de células espumosas, las cuales son fundamentales en el inicio y progresión de la aterosclerosis (71). Los dos principales SR involucrados en la internalización del oxLDL por parte del macrófago son el SR-A y el CD36 (64), y la expresión de estos SR está regulada por el factor de transcripción PPAR- γ (del inglés *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ*), el cual tiene entre sus ligandos a componentes derivados de los ácidos grasos del oxLDL (78). PPAR- γ necesita la unión de alguno de sus ligandos y del receptor retinoide X (RXR) para actuar. PPAR- γ regula genes con funciones muy diversas, involucrados en procesos de morfogénesis ósea, control del metabolismo, inflamación, función endotelial, cáncer y aterosclerosis. Uno de estos genes es el que codifica para el transportador de membrana ABCA-1 (79).

En el interior del macrófago, el colesterol es esterificado por la enzima acyl-CoA:colesterol transferasa para evitar la citotoxicidad del mismo, lo que genera la formación de gotas lipídicas (80). Para salir del macrófago, el colesterol tiene que estar libre, no esterificado, y puede usar tres vías distintas: 1. Secretado junto con apolipoproteínas producidas endógenamente, como la apolipoproteína E (ApoE); 2. Secretado como 27-hidroxicolesterol, reacción catalizada por la enzima colesterol oxidasa dependiente de citocromo-P45; 3. Por el eflujo de colesterol por transferencia del mismo a partículasceptoras extracelulares (81). En este último caso existen distintos transportadores involucrados. Si el transporte es pasivo, el principal transportador es el SR-B1. Por el contrario, si el transporte es activo, las proteínas involucradas pertenecen a la familia de los transportadores de membrana ABC, más concretamente ABCA-1 y ABCG-1. Es esta última vía, la que tiene mayor relevancia en la salida de colesterol del interior del macrófago. ABCA-1, interactúa con la apolipoproteína A-1 (apoA-1), la cual tras aceptar el colesterol va a formar partículas de HDL inmaduras. Estas partículas actúan a su vez como aceptores de más colesterol, uniéndose a ABCG-1 y dando partículas de HDL maduras (81).

En la **figura 11** se muestran los procesos implicados en la formación de una célula espumosa, teniendo en cuenta el balance entre la entrada y la salida del colesterol.

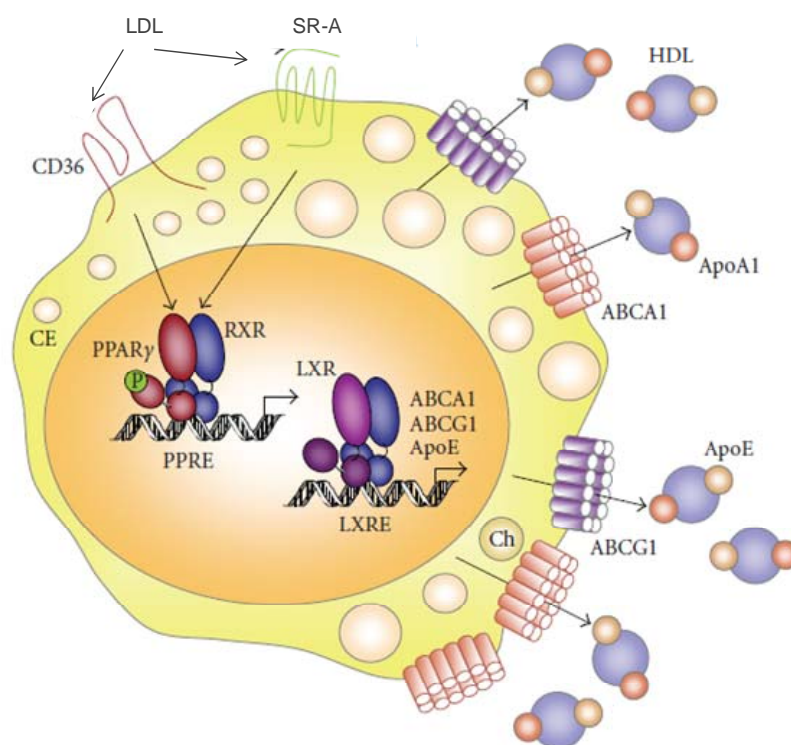


Figura 11. Formación de una célula espumosa. El LDL oxidado es internalizado a través de CD36 y SR-A. En el interior celular se une a PPAR- γ , que junto con RXR va a activar la transcripción de LXR, el cual activa a su vez la expresión de ABCA1, ABCG1 y ApoE. Esto va a favorecer el eflujo de colesterol. Adaptada de (82).

Aunque la mayoría de las células espumosas en aterosclerosis derivan de macrófagos, las SMCs también son capaces de dar lugar a células espumosas. Estas SMCs poseen una gran variedad de receptores involucrados en la entrada de colesterol al interior celular, como son CD36 y los receptores de LDL y de VLDL, y la expresión de los mismos aumenta en presencia de oxLDL y citoquinas como IL-1 β , TNF- α o M-CSF (83).

Además de formar células espumosas, los macrófagos presentes en la placa van a reconocer PAMP y DAMP (entre ellos, oxLDL, HSP60 y fibrinógeno) a través de TLRs, iniciando una respuesta inflamatoria aguda, con la consiguiente producción de citoquinas, quimioquinas y moléculas coestimuladoras (84). Los macrófagos son los leucocitos más numerosos en todos los estados de la aterosclerosis, y su papel en el desarrollo de la enfermedad es fundamental, tanto por la formación de células espumosas como por su acción como mediadores inflamatorios. En la **figura 12** se muestran las principales vías de activación de la respuesta inmunitaria innata mediada por macrófagos en aterosclerosis.

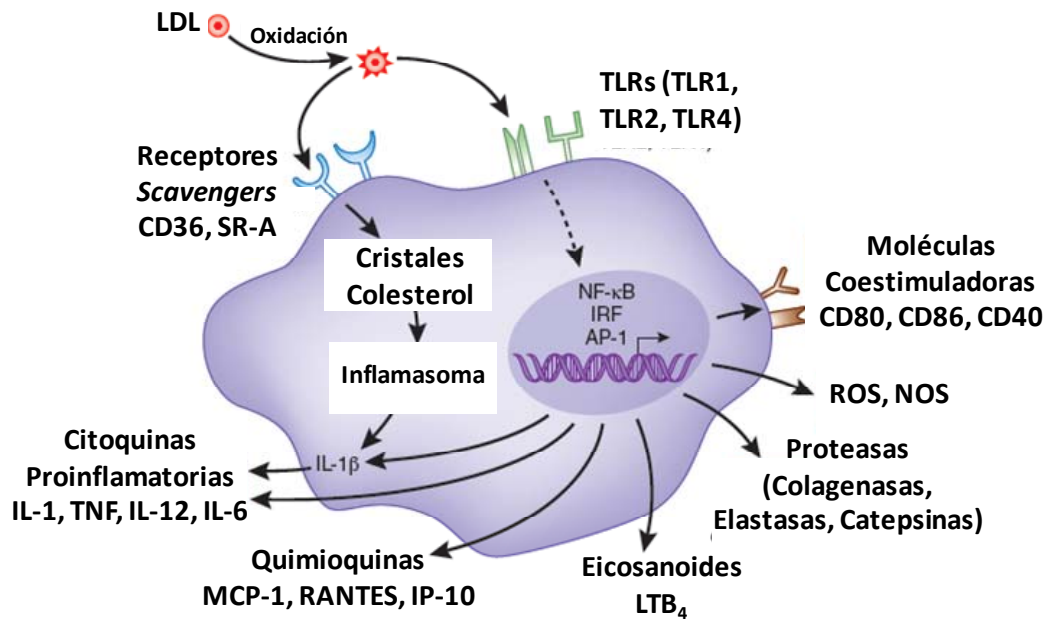


Figura12. Función de los macrófagos en aterosclerosis. El reconocimiento de oxLDL por parte de los SR conlleva la acumulación de colesterol intracelular que activa al inflamasoma, permitiendo la secreción de IL-1 β . Además, distintos componentes presentes en la placa pueden estimular al TLR provocando una activación de cascadas de señalización intracelular que conlleva la expresión de genes que codifican para moléculas proinflamatorias incluyendo citoquinas, quimioquinas, proteasas, eicosanoides, oxidasas y moléculas coestimuladoras. Adaptado de (85).

Otras células que también ven aumentada su adhesión y trans migración a través del endotelio vascular por la presencia de estímulos que aceleran la aterosclerosis, como el oxLDL o el TNF- α son las DC. Además, en una situación de hipercolesterolemia estas células quedan retenidas en la lámina íntima de las arterias (86), donde mantienen su actividad de células presentadoras de antígenos, re-estimulando en la placa a las células CD4⁺ efectoras procedentes de los órganos linfoides secundarios en las zonas de lesión (87).

Por último, la tercera gran población que va a trans migrar a las zonas de lesión son los linfocitos. En los años 80 ya se detectó la presencia de células T CD4⁺ y CD8⁺ activadas en ateromas humanos (88). Hoy día se conocen varios subtipos de células T con distinto grado de implicación en la formación y desarrollo de las lesiones ateroscleróticas, entre los que destacan las células CD4⁺ Th1, Th2, Th17, Treg y las CD8⁺. La mayoría de los estudios que demuestran la importancia de cada subtipo se han realizado con modelos animales, por lo que hablaremos más detalladamente de ellos en apartados posteriores.

Las células CD4⁺ Th1 son prioritarias en el desarrollo de la aterosclerosis. Indirectamente se demuestra su importancia al ver que el IFN- γ , citoquina propia de este linaje celular, es producido por las células T en placas ateroscleróticas humanas en respuesta al oxLDL presentado por medio del HLA-DR de las células

presentadoras de antígenos (89). El ambiente pro-inflamatorio presente en la placa favorece la polarización hacia Th1 tras la interacción de los linfocitos T con las DC (5).

El papel de las células Th2 en aterosclerosis no está exento de controversias. Por un lado las Th2 inhiben la diferenciación de las células Th1, claramente proaterogénicas, por lo que deberían ser ateroprotectoras. Sin embargo, en humanos se ha visto que hay un aumento en esta población en sangre periférica en pacientes con aterosclerosis (90).

También presenta controversia el papel de las células Th17 en aterosclerosis. Por un lado se ha visto que hay una acumulación de células Th17, así como de IL-17, en las lesiones ateroscleróticas. También se ha visto que un aumento en la expresión de IL-17 en lesiones de carótidas humanas está asociado con menor cantidad de macrófagos, y con mayor contenido de SMCs, apoyando un papel de IL-17 en la estabilidad de la placa (91). Por el contrario, otro trabajo muestra un aumento en la expresión de ARNm de IL-17 en placas de carótidas humanas sintomáticas con respecto a las asintomáticas, lo que asocia a esta citoquina con lesiones más inestables, complejas y ricas en lípidos (92).

Las Treg tienen un papel ateroprotector. Esta población celular se ha detectado dentro de las lesiones en arterias humanas, y cambios en el número de Treg circulantes se correlaciona con cambios en la actividad de la enfermedad o en la efectividad del tratamiento. Por lo tanto, se ha propuesto que tratamientos encaminados a aumentar el número de Treg pueden ser efectivos en esta enfermedad (4).

Las células citotóxicas CD8⁺ son mucho menos numerosas que las CD4⁺ en lesiones en humanos, aunque pueden llegar a alcanzar el 50% de las células T en lesiones avanzadas (93).

Con respecto al papel de las células B en aterosclerosis hay que destacar que el resultado difiere según se trate de células B-1 o células B-2 foliculares o de la zona marginal. Así, se ha visto que el título de anti-oxLDL IgM es inversamente proporcional al riesgo de padecer ECV (94), aunque esta relación es directamente proporcional al título de anticuerpos anti-oxLDL de tipo IgG (95).

En este punto, en el que hay una placa incipiente con infiltración de células inmunitarias y con algunas células espumosas, tenemos lo que se conoce como estrías grasas o "*fatty streaks*", las cuales son asintomáticas y aparecen en prácticamente todas las personas en las primeras décadas de vida en las sociedades industrializadas (96). Estas placas incipientes pueden desaparecer con el tiempo o, si no hay una correcta resolución de las mismas, pueden progresar a placas ateroscleróticas maduras (2).

3.3.3.2.2 Progresión de la enfermedad

Si el proceso inflamatorio no se resuelve correctamente, la placa va a progresar dando lugar a una placa fibrosa. Hasta ahora hemos visto como el oxLDL retenido en la región subendotelial puede desencadenar una respuesta inflamatoria crónica, que está inicialmente mediada por los macrófagos y que después involucra a otras células inflamatorias, como son las células T (97).

Además de células del sistema inmunitario, otros tipos celulares como las células endoteliales o SMCs tienen la capacidad de producir citoquinas proinflamatorias dentro de la placa aterosclerótica (98). Este ambiente, aparte de favorecer el proceso de activación endotelial, extravasación celular, y formación de células espumosas como ya se ha indicado en el apartado anterior, favorece la migración de las SMCs desde la lámina media a la íntima así como la proliferación de las mismas. El principal estímulo para la migración y proliferación de las SMC es el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el cual es producido por plaquetas, células endoteliales, SMCs y macrófagos (99).

Las SMCs son las mayores productoras de matriz extracelular tanto en vasos sanos como en aquellos donde hay lesiones ateroscleróticas. La diferencia está en que mientras que en los vasos sanos la matriz extracelular está compuesta fundamentalmente por colágeno fibrilar de tipo I y tipo III, en las zonas de lesión hay mayoritariamente proteoglicanos con algunas fibrillas de colágeno tipo I dispersas y fibronectina (100). Esta composición favorece que el LDL quede atrapado en la matriz, oxidándose y estimulando a las SMCs para que produzcan mayor cantidad de proteoglicanos, formándose un bucle de retroalimentación positiva. Cuando las SMCs se unen a fibrillas de colágeno o a laminina, éstas paran su ciclo celular en G1 mediante la sobreexpresión de inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina cdk2. Por el contrario, cuando se unen a fibronectina o a proteoglicanos estos inhibidores ven disminuida su expresión, favoreciendo la proliferación de las SMCs (83). La matriz extracelular y las SMCs forman una capa fibrosa que envuelve todo el contenido de la placa.

Durante todo el proceso aterosclerótico los distintos componentes celulares van a morir por apoptosis. En general, las altas concentraciones de oxLDL, TNF- α , y ligandos de Fas, hipoxia y ausencia de ATP, favorecen la apoptosis de las células presentes en la placa (101). Concretamente, un aumento en la concentración de oxLDL favorece que las rutas metabólicas implicadas en la modificación de lipoproteínas en los macrófagos estén saturadas, lo que implica que el colesterol libre, el cual es tóxico para la célula, se acumule y provoque una situación de estrés en el retículo endoplasmático, desencadenando la apoptosis del macrófago y la formación del núcleo necrótico (102). Estos procesos de apoptosis van a tener consecuencias muy distintas según en qué momento de la progresión de la

enfermedad nos encontremos. En lesiones iniciales las células apoptóticas van a ser rápidamente fagocitadas por macrófagos adyacentes mediante un mecanismo que se conoce como eferocitosis (103). La eferocitosis inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-8 y TNF- α) y aumenta la producción de IL-10 y TGF- β , lo cual inhibe el reclutamiento de monocitos a las zonas de lesión, controlando el tamaño de la placa (103, 104). Sin embargo, cuando las lesiones están en un estado más avanzado hay una deficiencia en la eliminación de las células apoptóticas (105), aunque no se conocen completamente los mecanismos implicados (103). El hecho de que no exista una correcta eliminación de las células apoptóticas favorece una serie de procesos que contribuyen a crear una placa más inestable, de modo que aumenta la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y se reduce la expresión de citoquinas anti-inflamatorias.

Cuando las células apoptóticas no se eliminan correctamente mueren por necrosis (105) y favorecen la progresión de la enfermedad mediante una serie de procesos. En primer lugar, las células apoptóticas no eliminadas son una fuente de factor tisular, el cual es un elemento iniciador de la cascada de coagulación que media la formación de trombos después de la ruptura de una placa inestable (106). En segundo lugar, la formación del núcleo necrótico en la placa está asociada a la acumulación de derivados del ácido lisofosfatídico, lo cual aumenta la agregación plaquetaria y previene la salida de los macrófagos de las lesiones ateroscleróticas (105, 107). En tercer lugar, los factores inflamatorios en el núcleo necrótico inducen la liberación de proteasas que degradan la matriz extracelular por parte de los macrófagos infiltrados, favoreciendo la inestabilidad de la placa (108). En cuarto lugar, los fagocitos que fallan en la internalización de células apoptóticas son más susceptibles a volverse apoptóticos ellos mismos (109). Por último, los macrófagos necróticos liberan timidina fosforilasa, un potente factor angiogénico que favorece la neovascularización en la placa (110).

La salida de las células inflamatorias del ateroma frenaría el curso de la enfermedad. Sin embargo este proceso está también disminuido en condiciones de hipercolesterolemia (111). Por el contrario, cuando se exponen las placas a niveles bajos de colesterol se favorece la migración de las DC a través de los vasos sanguíneos de la adventicia hasta los ganglios linfáticos locales, en un proceso dependiente del receptor de quimioquina CCR7 (112).

En conjunto tenemos una situación en la que la placa tiene un corazón necrótico, formado fundamentalmente por células inmunitarias que quedan retenidas, células espumosas, musculares, apoptóticas y necróticas, componentes lipídicos liberados al medio tras la necrosis celular, cristales de colesterol, y todo esto rodeado por una capa fibrosa que será cada vez más inestable y que es susceptible de rotura (105).

3.3.3.2.3 Formación de trombos

En último lugar, en la progresión de esta enfermedad tenemos el desarrollo de trombos, que depende principalmente de la composición y vulnerabilidad de la placa más que de la severidad de la estenosis. Así, para la formación de trombos deben darse al menos dos eventos. El primero es la ruptura de la superficie de la lesión, dejando expuesto el contenido subendotelial a la luz del vaso, y el segundo es la erosión de la capa fibrosa (113).

La capa fibrosa debe su fuerza y su estabilidad al colágeno de tipo I y II que la forma. Sin embargo, como hemos mencionado anteriormente, los procesos de inflamación interfieren en la integridad de esta matriz colagenosa, bloqueando la formación de nuevas fibras de colágeno y estimulando la destrucción del colágeno ya existente (114). Por otro lado, la producción de CD40-ligando y de IL-1 por parte de los linfocitos T presentes en la placa, va a favorecer la producción por parte de los macrófagos de enzimas que degradan el colágeno, especialmente las metaloproteinasas (MMP) MMP1, MMP8, MMP9 y MMP13 (58, 113). Otros tipos celulares minoritarios, como los mastocitos presentes en la placa, también pueden liberar MMP que inducen TNF- α así como otras serina-proteasas, triptasas y quimasas que van a activar a proenzimas de MMP (58).

Por último, las células apoptóticas, así como el CD40-ligando, inducen la producción del factor tisular, de modo que una vez provocada la ruptura de la placa fibrosa que envuelve el corazón necrótico se va a liberar este material a la luz del vaso favoreciendo la agregación plaquetaria y la formación de trombos (113).

3.3.3.3 Modelos animales en aterosclerosis.

La búsqueda de modelos animales en los que desarrollar aterosclerosis es algo que se viene haciendo desde comienzo de los años 50. Los primeros ensayos se hicieron usando animales salvajes. En 1952 apareció un trabajo en el que se pone de manifiesto la producción de lesiones ateromatosas en ratas albinas (115). En 1959 Thomas y Hartroft usaron por primera vez una dieta formulada, con un alto contenido en grasa (30%), un 5% de colesterol y un 2% de colato sódico para inducir infarto de miocardio en ratas (116). Una década más tarde, Thompson publicó un trabajo en el que mostraba la formación de placas ateroscleróticas en un modelo de ratón. Para ello utilizó ratones C57BL/6J alimentados con una dieta que contenía un 50% de grasa durante 5 semanas en vez de una dieta regular que posee un 5% (117). La desventaja de esta dieta es que inducía un porcentaje de mortalidad muy elevado por lo que en 1985 Paigen propuso una dieta que contenía 15% de grasa, 1.25% de colesterol y 0.5% de ácido cólico que, aún formando lesiones, era menos agresiva (118). En este mismo trabajo también se describe que esta cepa de ratón es la más susceptible a desarrollar lesiones por esta dieta.

A partir de aquí, empezaron a generarse ratones modificados genéticamente para desarrollar aterosclerosis. Los dos principales modelos tienen alterados genes involucrados en el metabolismo de las lipoproteínas, de modo que uno de ellos es deficiente en el gen que codifica para el receptor del LDL, *ldlr*^{-/-}, mientras que el otro modelo es deficiente para la apolipoproteína E, *ApoE*^{-/-}.

ApoE es una glicoproteína de 24 kDa que forma parte de lipoproteínas como las VLDL, LDL, IDL y HDL, así como de los quilomicrones y sus remanentes. Se sintetiza en el hígado y media en la unión de las lipoproteínas al receptor del LDL (119). En humanos se asocian ciertas variantes genéticas de ApoE deficientes en la unión al LDLR con hiperlipoproteinemia familiar de tipo III, altas concentraciones de colesterol en sangre y muerte prematura por enfermedades coronarias (120). En 1992 Plump y colaboradores demostraron niveles de colesterol muy elevados en sangre en ratones *ApoE*^{-/-} (500 mg/dL vs 60 mg/dL), los cuales desarrollaban espontáneamente lesiones. El número de las lesiones y el nivel de colesterol en sangre aumentaban si se les alimentaba con una dieta tipo occidental, rica en colesterol (121). Hoy en día este tipo de dieta es la más usada, y contiene 21% de grasas y 0.2% de colesterol. Los ratones *ldlr*^{-/-} fueron generados por Ishibashi en 1993 (122). En comparación con los ratones salvajes estos ratones tienen los niveles de LDL elevados pero el desarrollo de las lesiones de modo espontáneo es muy lento, necesitando una dieta rica en colesterol (10% de grasa, 7.5% de manteca de cacao, 1.25% de colesterol y 0.5% de colato) para acelerar la formación de lesiones (122).

A partir de estos modelos, y según el objeto de estudio, se han generado multitud de variantes, con depleción o inducción de genes, así como nuevas técnicas que permiten acelerar los procesos. Como ya se ha indicado anteriormente, el inicio de la aterosclerosis ocurre preferentemente en zonas donde el flujo sanguíneo es irregular creando estrés en las células endoteliales. Así por ejemplo, la ligación parcial en una de las carótidas del ratón genera un flujo oscilante y lento en esta zona que va a favorecer la formación de placas en un periodo corto de tiempo (123).

3.3.3.4 Estudio de la respuesta inmunitaria en modelos animales de aterosclerosis.

El uso de los modelos animales ha permitido entender que la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria y autoinmune, y ha permitido estudiar los procesos inmunitarios involucrados.

Así, la inyección de células T de ratones *ApoE*^{-/-} con aterosclerosis a ratones *ApoE*^{-/-} con un fondo genético SCID transfiere la enfermedad (124). Sin embargo, la mutación de *Rag* en ratones *ApoE*^{-/-}, los cuales tienen su respuesta inmunitaria adaptativa comprometida, no afecta a la formación de lesiones, pero sí al contenido

de las mismas (125). Por lo tanto, si bien la respuesta inmunitaria podría considerarse pro-aterogénica, la ausencia total de la misma hace perder también la parte protectora. La aterosclerosis es por tanto el resultado de balance entre las distintas poblaciones de células inmunitarias y sus productos, entre células T efectoras y reguladoras, entre moléculas coestimuladoras y coinhibidoras, entre células B-1 y B-2 y sus respectivos anticuerpos IgM e IgG (4). A continuación vamos a analizar más detalladamente el papel de cada población celular involucrada en la respuesta inmunitaria adaptativa.

-Células Th1: Como ya hemos indicado anteriormente las células Th1 son fundamentales en el desarrollo de la aterosclerosis (**Figura 13**). Existe una polarización preferencial hacia este tipo celular al interaccionar el receptor CD40, presente en las APCs, y su ligando CD40L, encontrado en células T activadas. Este proceso lleva consigo una respuesta coestimuladora que favorece la inflamación y contribuye a la maduración de DC. La inhibición de esta ruta de señalización reduce el desarrollo de las lesiones y favorece la estabilidad de la placa (126). La IL-12 es una de las citoquinas que favorece la polarización hacia Th1 al activar al factor de transcripción STAT-4 y T-bet, los cuales potencian la expresión de IFN- γ y disminuyen la expresión de IL-4 e IL-5, acelerando el desarrollo de las lesiones (5). Por el contrario, la deficiencia de T-bet en ratones *ldlr*^{-/-} disminuye el tamaño de las lesiones ateroscleróticas, causando un cambio en la población de células T hacia Th2 y en la producción de anticuerpos por las células B (127). La inducción de T-bet y la polarización hacia Th1 está también influenciada por la IL-18, de modo que ratones *Apoe*^{-/-} deficientes en IL-18 presentan una reducción en el tamaño de las placas ateroscleróticas, así como una disminución en la actividad de las células Th1 y un cambio en la predominancia de IgG2a (isotipo asociado a Th1) hacia IgG1 (isotipo asociado a Th2) (128).

El IFN- γ posee potentes acciones proaterogénicas y promueve la polarización hacia Th1 a través de la activación de macrófagos y la maduración de DC. En ratones *Apoe*^{-/-} deficientes en IFN- γ o su receptor se reduce la formación de lesiones y aumenta el contenido en colágeno de la placa (129), mientras que la administración exógena de IFN- γ aumenta la aterosclerosis (130). Además de potenciar la inflamación local, el IFN- γ activa a STAT1, factor de transcripción que media entre otras cosas en la expresión de CD36 favoreciendo la formación de células espumosas (5).

Las células Th1 también van a ejercer una función sobre las células musculares al liberar mediadores como el VEGF que favorece la proliferación de las mismas (131).

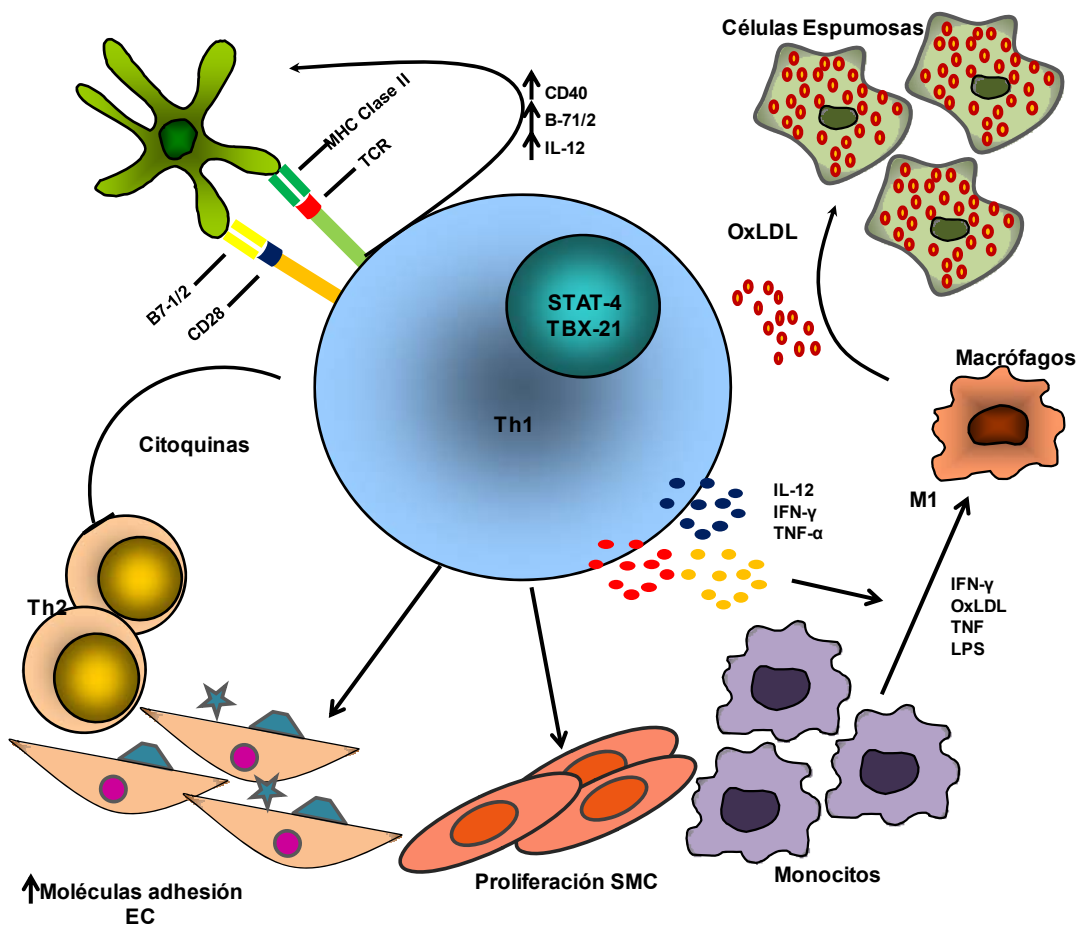


Figura 13. Mecanismos de actuación de las células Th1 en aterosclerosis. Las células Th1 favorecen el desarrollo de la aterosclerosis de varias maneras. Por un lado inhiben la actividad de las células Th2 anti-inflamatorias, por un mecanismo dependiente de la producción de citoquinas (IL-12, IFN- γ o TNF- α). Por otro lado, activan a las DC aumentando la expresión de moléculas coestimuladoras en las mismas. Además, favorecen la diferenciación de los macrófagos hacia macrófagos M1 y la formación de células espumosas. También favorecen la proliferación de las células de músculo liso (SMC) y la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales (EC).

- Células CD4⁺ Th2: Estudios con ratones deficientes en las dos principales citoquinas características de esta población celular, la IL-4 e IL-5 dan resultados poco esclarecedores, debido en parte a su acción sobre otras poblaciones celulares. Así, IL-4 provoca un aumento en la expresión de CD36, VCAM o MMP-1, elementos que aumentan las lesiones, y su deficiencia resulta ateroprotectora (132) o no afecta al desarrollo de la lesión (133). Por su parte, la deficiencia en IL-5 aumenta la formación de lesiones debido fundamentalmente a un descenso en la producción de IgM anti-oxLDL por parte de las células B-1 (134).

- Células CD4⁺ Th17: En ratones, varios estudios muestran un papel tanto ateroprotector como aterogénico de IL-17. Por un lado, ratones *ldlr*^{-/-} a los que se les administra IL-17 tienen disminuida la expresión de VCAM-1 en las células endoteliales, la infiltración de células T y el desarrollo de las placas (91). Por otro lado, ratones *Apoe*^{-/-} a los que se bloquea IL-17 disminuyen las lesiones (135).

- Células CD4⁺ Treg: Varios trabajos han demostrado el papel ateroprotector de las Treg (**Figura 14**). Así la eliminación y la inducción/inyección de Treg provocan un aumento y disminución en las lesiones, respectivamente (136, 137). También se ha descrito que el número de Treg disminuye conforme progresa la formación de placas ateroscleróticas mientras que el de células T efectoras (fundamentalmente Th1) aumenta, lo cual se relaciona con una disminución en el control de la respuesta proaterogénica de las T efectoras por parte de las Treg (138). Además de su papel ateroprotector, al controlar la respuesta de las células Th1, las Treg inhiben *in vitro* la formación de células espumosas y promueven la diferenciación de macrófagos con fenotipo anti-inflamatorio M2, a través de un mecanismo dependiente de IL-10 y TGF- β (139).

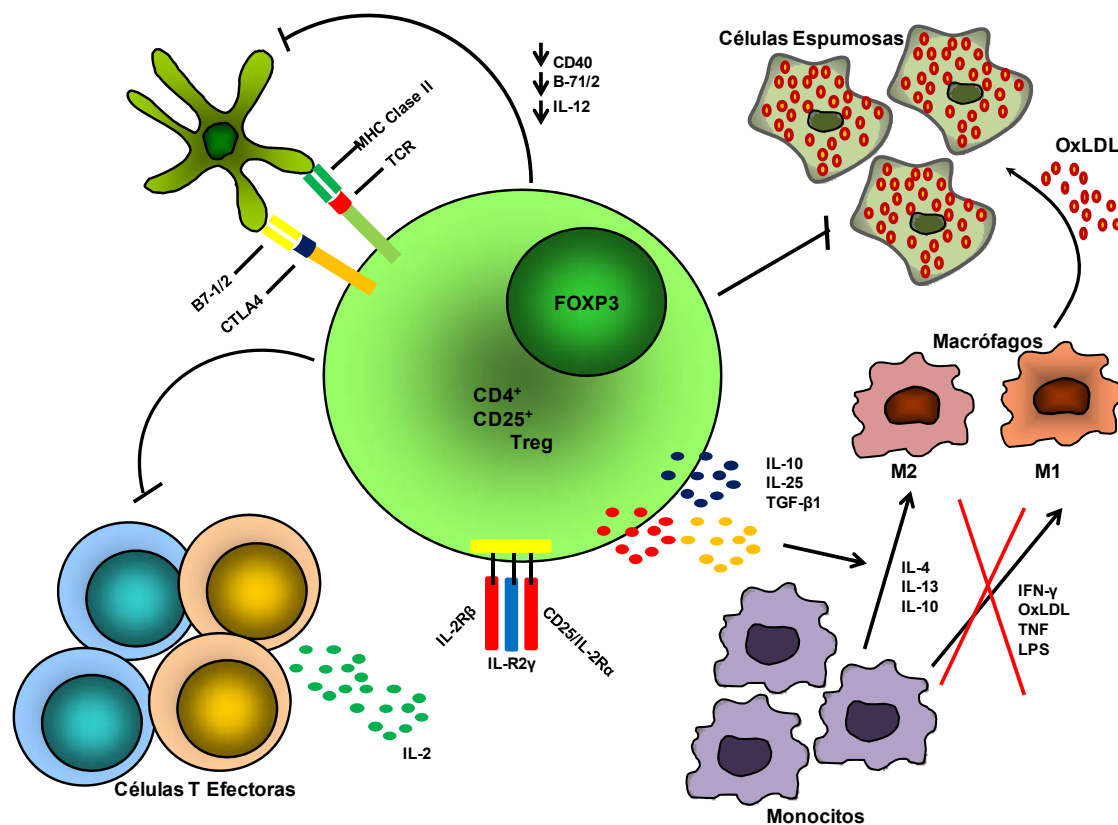


Figura 14. Mecanismos de actuación de las células Treg en aterosclerosis. Las células Treg inhiben la aterosclerosis de varias maneras. Por un lado inhiben la actividad de las células T efectoras por un mecanismo dependiente de contacto celular, de la producción de citoquinas (IL-10, TGF- β o IL-25), o por el uso competitivo de la IL-2 requerida para la proliferación de las células T. Por otro lado, inhiben la capacidad presentadora de antígenos de las células dendríticas por un mecanismo mediado por CTLA-4. Además, segregan citoquinas que inhiben la formación de células espumosas e inducen la diferenciación de los monocitos hacia macrófagos M2, con un perfil anti-inflamatorio. Adaptado de (5).

- Células CD8⁺: La presencia de células CD8⁺ es escasa en las lesiones de ratones, excepto en casos en los que se eliminan moléculas coestimuladoras, como el factor de muerte programada 1 (PD-1) (140). En condiciones de hipercolesterolemia, el número de las CD8⁺ aumenta de manera sistémica y pueden provocar inflamación y desestabilización de la placa (141). Sin embargo, la depleción de células CD8⁺ en ratones *ApoE*^{-/-} no tiene ningún efecto en la formación de lesiones (142).

- Células B: Ratones esplenectomizados desarrollan mayores lesiones ateroscleróticas, y este fenotipo se revierte al transferir células B-1 pero no células B-2 foliculares o de la zona marginal (143). El papel ateroprotector de las células B-1 podría deberse a la producción de anticuerpos anti-oxLDL IgM, los cuales bloquean la captación de oxLDL por los macrófagos (144) y la formación de células espumosas. Por otro lado, la eliminación de células B-2 con un anticuerpo anti-

CD20 en ratones *Apoe*^{-/-} estos disminuyen la el tamaño de las lesiones, demostrando el papel proaterogénico de este tipo celular (145).

Por lo tanto, en general podemos decir que la respuesta inmunitaria controla la formación y el desarrollo de las lesiones en aterosclerosis. Dentro de las distintas poblaciones celulares encontramos que los macrófagos y las células T van a tener un papel prioritario en el control de esta respuesta. Más concretamente, dentro de las células T el efecto mayoritario viene marcado por las células Th1 y las Treg, teniendo cada una de estas subpoblaciones un papel opuesto.

3.3.4 Tratamientos de las enfermedades cardiovasculares. Tratamientos actuales.

Tanto en el caso de la miocarditis como en aterosclerosis la mayor parte de los tratamientos van encaminados a disminuir aquellos agentes que aumentan el riesgo de sufrir dichas enfermedades.

En el caso del tratamiento para la miocarditis, ya indicado en apartados anteriores de la introducción, existen una serie de guías que muestran los pasos a seguir en el tratamiento de la misma, y cuya acción va encaminada a mejorar la función ventricular. Estas guías son de la Sociedad Europea de Cardiología, la Asociación Americana del Corazón, el Colegio Americano de Cardiología y la Sociedad Americana de Fallo Cardíaco. La mayoría de los pacientes van a mejorar con la administración de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o bloqueantes del receptor de la angiotensina, con beta-bloqueantes como el metoprolol o el carvedilol, o con diuréticos (16).

En el caso de la aterosclerosis, los tratamientos de elección van desde el uso de agentes trombolíticos, anti-hipertensivos, inhibidores de la formación de plaquetas e inhibidores de la 3-hidroxy-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa, enzima de la ruta del mevalonato involucrada en la síntesis del colesterol, (conocidos genéricamente como estatinas), hasta procesos invasivos como la dilatación arterial percutánea o la creación de un “bypass” coronario (146). Sin embargo, aunque el tratamiento aplicado sea el adecuado, el riesgo residual a padecer un evento cardíaco adverso grave está en torno al 70-80%, lo cual puede deberse en parte a que estos tratamientos no frenan la respuesta inflamatoria de la aterosclerosis (146). Por lo tanto, cada vez son más los estudios encaminados a reducir el componente inflamatorio de la aterosclerosis.

También en miocarditis hay una necesidad de tratar el componente inflamatorio de la misma. En este sentido se han hecho ensayos de inmunomodulación e inmunosupresión para el tratamiento de la miocarditis en pacientes con cardiomiopatía dilatada, sin tener ningún efecto (147, 148). Los estudios con modelos animales aportan información a este respecto, de modo que

Uso de neuropéptidos anti-inflamatorios en enfermedades cardiovasculares: Aterosclerosis y miocarditis autoinmune.

se ha visto que el uso de drogas anti-inflamatorias no esteroideas (149), o el ejercicio en roedores con miocarditis, aumenta la tasa de mortalidad de los mismos (150). Por el contrario el uso de algunos antivirales, como el IFN- α o la ribavirina reduce la severidad de las lesiones en el corazón y la mortalidad de los ratones (151).

En el caso de la aterosclerosis, el abanico de drogas anti-inflamatorias, algunas comercializadas y otras en ensayo clínico, cuya función es tratar la inflamación en esta enfermedad es mayor. En la **tabla 2** se resumen parte de estas drogas anti-inflamatorias para el tratamiento de la aterosclerosis (146).

Tabla2. Compuestos con función anti-inflamatoria usados en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

Compuesto Compañía	Diana	Ruta Diana	Mecanismos anti-inflamatorios	Validación preclínica y clínica	Estado de desarrollo clínico (Ensayo)	Ref.
Estatinas	HMG-CoA reduc tasa	Biosíntesis colesterol	Desconocidos, ligados a los niveles de CRP	Varios ensayos clínicos que muestran mejora cardiovascular	En el mercado	(152, 153)
Succinobucol (AG-1067); AtheroGenics	Succinobucol	Antioxidante	Antioxidantes no especificados	Fase III MACE; Fase II en imagen; Modelos preclínicos	Fase III (ARISE)	(154)
Varespladib Anthera	sPLA 2	Inhibidor de la fosfolipasa	Modificación lipoproteínas; liberación lípidos bioactivos	No MACE clínico; Modelos animales preclínicos	Fase III (VISTA-16)	(155)
Darapladib; GlaxoSmith Kline	Lp-PLA2	Inhibidor de la fosfolipasa	Modificación lipoproteínas; liberación lípidos bioactivos	No MACE clínico; Fase II en imagen; Modelos animales preclínicos	Fase III (STABILITY SOLID-TIMI52)	(156)
Veliflapon (DG-031);	FLAP	Leucotrienos	Inhibe leucotrienos;	No morbilidad ni mortalidad	Fase II	(157)

DeCODE genetics			Reduce actividad leucocitos en la placa	clínica; Fase II en el estudio de biomarcador		
Atreleuton (VIA-2291); VIA Pharmaceuticals	5-LO	Leucotrienos	Inhibe leucotrienos; Reduce actividad leucocitos en la placa	No MACE clínico; Fase II biomarcador, imagen; Modelos animales preclínicos	Fase II	(158)
MLN1202 Millennium Pharmaceuticals	CCR2	Ruta CCL2-CCR2	Inhibe tráfico de monocitos a la placa	No MACE clínico; Biomarcador; Modelos preclínicos	Fase II	(159)
Academic	Metotrexato	Antiproliferativo	Agente antiproliferativo; bloquea respuesta inflamatoria	Artritis Reumatoide; Niveles altos en aterosclerosis; Biomarcador	Fase III (CIRT)	(160)
Inespecífico	TNF	Ruta del TNF	Efectos mediados por TNF	Resultados clínicos retrospectivos	Desconocidos	(161)
Academic	IL-1	Ruta IL-1	Efectos mediados por IL-1	Genética; Biomarcador	Fase II (MRC-ILA-HEART)	(162)
Roche; RO4905417	P-selectina	Migración celular; Células endoteliales	Bloquea trans migración de monocitos y/o leucocitos	Modelos preclínicos	Fase II	(163)

Dentro de los fármacos tratados en esta tabla es de destacar el papel antiinflamatorio que tienen las estatinas, en parte debido a la disminución de los niveles de LDL en sangre. Como hemos indicado con anterioridad, la hipercolesterolemia en ratones es pro-inflamatoria, permitiendo entre otras cosas la producción de citoquinas y quimioquinas así como la infiltración de células

inmunitarias en la placa(77). Además de su papel en el descenso de colesterol circulante, las estatinas reducen la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 en las células endoteliales, disminuyendo la adhesión y transmigración de las células inmunitarias (164). *In vitro* reducen el crecimiento de los macrófagos y la producción de MMPs, favoreciendo la estabilidad de las placas (165), e inhiben la producción de IFN- γ y la activación de células T (166).

Un elemento a tener en cuenta en el tratamiento de los pacientes con ECV es que son enfermos crónicos, por lo que la administración continuada de anti-inflamatorios puede llevar a la aparición de infecciones oportunistas. Así, se ha descrito que pacientes que toman fármacos que tienen por diana al TNF presentan una incidencia mayor de tuberculosis, y el uso de natalizumab, fármaco que interrumpe el tráfico de leucocitos, predispone a sufrir infecciones víricas cerebrales (167). Por lo tanto, sería necesario buscar nuevos agentes que atajen este tipo de enfermedades sin comprometer al individuo a una mayor predisposición a sufrir infecciones oportunistas.

Ante este escenario de búsqueda de nuevas terapias que den respuesta al componente inflamatorio de ambos tipos de enfermedades sin comprometer al sistema inmunitario, en los últimos años se han propuesto varias terapias alternativas basadas en el uso de neuropéptidos con función inmunorreguladora para el tratamiento de enfermedades inmunológicas con una base inflamatoria y/o autoinmune.

3.3.5 Neuropéptidos como alternativa a los tratamientos actuales.

3.3.5.1 Definición de neuropéptido.

Durante muchos años los inmunólogos han considerado la respuesta inmunitaria únicamente como una consecuencia directa de la estimulación antigénica. Sin embargo, en las últimas décadas del siglo XX se constató que el sistema inmunitario está además regulado por el sistema nervioso central (SNC), bien directamente, o bien a través del eje neuroendocrino. Esto es debido a que entre el sistema neuroendocrino y el sistema inmunitario existe una comunicación bidireccional basada en un lenguaje bioquímico común, que incluye la producción de hormonas, mediadores inmunitarios, neuropéptidos y neurotransmisores por células de ambos sistemas.

Esta intercomunicación entre sistemas permite una acción conjunta ante una situación anormal. Frente a una infección o daño tisular, el sistema inmunitario actúa como un sexto sentido y avisa al sistema nervioso de que existe una situación de peligro. De este modo, el SNC responde modificando el comportamiento del

individuo encaminado a favorecer un estado de recuperación, como por ejemplo, disminuyendo la motilidad, el apetito o la actividad reproductora o mediante la producción de fiebre (168). De igual modo, en condiciones de estrés físico o psicológico, el cerebro afecta a la respuesta por parte del sistema inmunitario, activando núcleos en el hipotálamo que van a mediar la secreción de glucocorticoides a través de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y otras rutas moleculares de naturaleza generalmente inmunosupresora o anti-inflamatoria (168).

Los neuropéptidos van a ser mediadores claves en el dialogo entre los sistemas neuroendocrino e inmunitario. Aunque el término neuropéptido fue acuñado para definir cualquier péptido producido por neuronas con acciones en el sistema nervioso, en la actualidad existen numerosas evidencias que indican que algunos neuropéptidos se comportan como citoquinas o interleuquinas. Esto supone que son producidos por células del sistema inmunitario, y ejercen funciones inmunitarias a través de receptores específicos expresados por células inmunitarias. Los neuropéptidos van a ser mediadores claves en el dialogo entre los sistemas neuroendocrino e inmunitario. Aunque el término neuropéptido fue acuñado para definir cualquier péptido producido por neuronas con acciones en el sistema nervioso, en la actualidad existen numerosas evidencias que indican que algunos neuropéptidos se comportan como citoquinas o interleuquinas. Esto supone que son producidos por células del sistema inmunitario, y ejercen funciones inmunitarias a través de receptores específicos expresados por células inmunitarias (169, 170). Entre estos neuropéptidos, destacan el péptido intestinal vasoactivo y la cortistatina, objeto de estudio de la presente tesis doctoral.

3.3.5.2 Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP).

Como su nombre indica, VIP fue descubierto en 1969 por Sami Said y Viktor Mutt en el intestino porcino por su capacidad vasodilatadora (171). Inmediatamente tras su descubrimiento, se observó que tanto el SNC como las terminaciones nerviosas de una multitud de órganos periféricos expresaban VIP, y se clasificó como neuropéptido. VIP es un péptido de 28 aminoácidos perteneciente a la familia de péptidos estructuralmente relacionados que incluye a secretina, glucagón, factor liberador de la hormona del crecimiento, péptido similar al glucagón-1 y -2, helodermina, péptido inhibidor gástrico y péptido activador de la adenilato ciclasa de la hipófisis (PACAP), péptido que está íntimamente relacionado con VIP, con el que muestra una homología del 68% (172). VIP se expresa por neuronas en varias áreas del cerebro y es almacenado y liberado por fibras nerviosas que inervan gran variedad de órganos, como corazón, pulmón, tiroides, riñón, tracto gastrointestinal y urogenital, y órganos linfoides (bazo, timo, médula ósea y ganglios linfáticos). No sólo las neuronas son capaces de sintetizar VIP, sino que también células del sistema inmunitario y del endocrino lo

expresan y secretan (172). Como otros neuropéptidos, VIP es sintetizado intracelularmente en forma de precursor preproVIP, prepropéptido que contiene VIP y un péptido relacionado llamado péptido histidina isoleucina en la mayoría de las especies o péptido histidina metionina en humanos (173). La estructura secundaria de VIP consiste en dos láminas- β que contienen el extremo N-terminal de ocho aminoácidos, seguido de dos hélices (residuos 7-15 y 19-27), conectados por una región que le confiere flexibilidad (174).

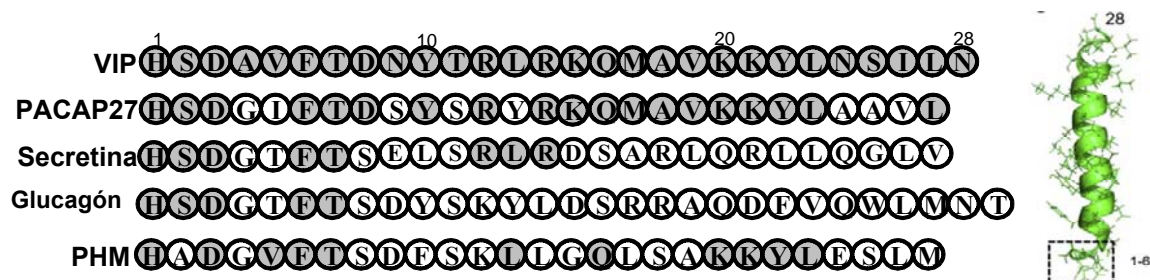


Figura 15: Miembros de la superfamilia a la que pertenece VIP, homología. Estructura tridimensional de VIP. Adaptado de (175).

Su amplia distribución refleja la variedad de efectos que posee como neurotransmisor, vasodilatador, regulador de la respuesta inmunitaria y secretagogo. Así, en el SNC se ha visto que VIP afecta al comportamiento y al aprendizaje, además de tener efectos neurotróficos. Por otro lado, VIP afecta al ritmo circadiano, broncodilatación, contracción de músculo liso y movilidad gastrointestinal. Como secretagogo, VIP induce la liberación de prolactina, hormona luteinizante y hormona del crecimiento por la hipófisis, y regula la liberación de insulina y glucagón por el páncreas. Además, VIP regula el metabolismo óseo, ritmos circadianos, y el desarrollo embrionario. Dentro del sistema inmunitario, VIP afecta tanto a la respuesta innata como a la adaptativa, actuando como un potente anti-inflamatorio en modelos animales de inflamación y autoinmunidad (176). Entre estos modelos, en los que VIP tiene un efecto beneficioso como inmunorregulador y anti-inflamatorio, podríamos nombrar la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria intestinal, la diabetes mellitus de tipo I, la esclerosis múltiple (EAE), el síndrome de Sjogren y la uveoretinitis (172, 177-181).

VIP ejerce su acción por unión a tres receptores de membrana VPAC1, VPAC2 y PAC1, pertenecientes a la superfamilia tipo 2 de receptores con siete segmentos transmembrana acoplados a proteínas G (182). VPAC1 y VPAC2 unen VIP y PACAP con la misma afinidad ($K_d \approx 1\text{nM}$) y activan la ruta de la adenilato ciclasa, mientras que PAC1 tiene mayor afinidad por PACAP ($K_d \approx 0.5\text{ nM}$) que por VIP ($K_d > 500\text{nM}$) y activa tanto la ruta de la adenilato ciclasa como la de la fosfolipasa C (183). VPAC1 se expresa preferentemente en cerebro y tejidos periféricos como hígado, pulmón e intestino, así como en células del sistema inmunitario. VPAC2 se

expresa principalmente en el SNC y en tejidos periféricos como el páncreas, músculo esquelético, pulmón, corazón, riñón, tejido adiposo, testículos, estómago, vasos sanguíneos y el tracto de los sistemas reproductor y gastrointestinal. PAC1, por su parte, se expresa en cerebro y médula de la glándula adrenal(183).

Tabla 3. VIP: Expresión, receptores, funciones principales y señalización.

Principal fuente	Principal acción	Tipo Receptor	Expresión Receptor	Señalización Receptor
SNC, GI, corazón, pulmón, SI, tiroides, riñón, órganos genitales	Vasodilatación, \uparrow gasto cardiac, broncodilatación, hiperglucemia, relajación SMC, \uparrow crecimiento, regulación hormonal, analgesia, hipertermia, efectos neurotróficos, aprendizaje y comportamiento, metabolismo óseo, secreción GI, motilidad gástrica.	VPAC1	SNC, pulmón, SI, GI, vasos sanguíneos	\uparrow AMPc-PKA
		VPAC2	SNC, pulmón, tracto urinario	\uparrow AMPc-PKA
		PAC1	SNC	\uparrow AMPc-PKA \uparrow PKC

Abreviaturas: SNC: Sistema Nervioso Central. SMC: Células Músculo Liso. GI: Tracto Gastrointestinal. SI: Sistema Inmunitario. Adaptada de (184).

Dentro del sistema inmunitario (**Tabla 4**), los distintos receptores de VIP poseen una expresión diferencial, de modo que VPAC1 se expresa de modo constitutivo en linfocitos, macrófagos, monocitos, DC, microglia y mastocitos, mientras que VPAC2 se expresa en muy bajos niveles en células *naive* o sin estimular, pero su expresión se induce tras estimulación en linfocitos y macrófagos (172, 185). PAC1 se expresa constitutivamente en macrófagos y monocitos, donde muestra igual afinidad por VIP y por PACAP. La función inmunorreguladora de VIP está mediada fundamentalmente por VPAC1 (172, 184), aunque la influencia de los otros receptores queda patente al usar ratones deficientes en VPAC2 o PAC1, los cuales son más susceptibles a sufrir enfermedades inflamatorias (186, 187). Por otro lado, se ha documentado que pacientes con enfermedades inflamatorias o autoinmunes presentan bajos niveles de VPAC1 y responden muy levemente a VIP (188, 189).

Tabla 4. VIP y sistema inmunitario: Fuente inmunitaria, receptores, funciones y efecto terapéutico en autoinmunidad.

Principal fuente	Tipo Receptor/ Célula inmunitaria	Función Inmunitaria	Terapia	Ref
Disminuye				
CD4 Th2,	VPAC1/T,Mo,Mφ,DC, PMNC	Citoquinas inflamatorias; quimioquinas; coestimulación DC Mφ; proliferación células T;	RA	
CD8 T2,	VPAC2/T, Mφ	Respuesta Th1:Il-2, IFNγ;	EAE	(172,
PMNC,	(inducible)	Reclutamiento Th1;	EAU	177-
Mastocitos	PAC1/Mo, Mφ	Apoptosis Th2; Respuesta Th2 ;	IBD	181)

Aumenta				
			SD	
IL-10, TGF-β Células Treg, tolDC				

Abreviaturas: VPAC, receptor VIP/PACAP; Mφ, macrófago; Mo, monocito; DC, célula dendrítica; PMNC, célula polimorfonuclear; EAE, encefalomiélitis experimental autoinmune; RA, artritis reumatoide; EAU, uveítis experimental autoinmune; IBD, enfermedad intestinal inflamatoria; T1DM, diabetes mellitus tipo I; SD, enfermedad de Sjogrend. Adaptada de (169).

Además de su acción inmunomoduladora, VIP ejerce diversas acciones en el sistema cardiovascular que apoyan el estudio de su potencial efecto terapéutico en ECV. VIP es un potente vasodilatador, efecto que ejerce mediante su acción en las SCMs, y no sobre el endotelio vascular (190), ya que son las SMCs, y no las células endoteliales, las que expresan los receptores para VIP, siendo VPAC1 el receptor más representado (191). La inducción de relajación por VIP está asociada a una reducción intracelular de los niveles de calcio, lo cual apoya que el efecto está mediado, al menos en parte, por la adenilato ciclasa (192). Además, VIP inhibe la proliferación y migración de SMCs arteriales (193), lo que es atractivo para una terapia en aterosclerosis.

Importante desde el punto de vista de una futura aplicación terapéutica en clínica es el hecho que VIP se ha usado con éxito en varias patologías en humanos, con una seguridad de uso total. Hasta la fecha, VIP se ha usado en el tratamiento de la disfunción eréctil, la hipertensión pulmonar y la sarcoidosis. Así, Invicop (Plethora Solutions, UK) es una combinación de VIP y mesilato de fentolamina, y tiene efectos en el flujo sanguíneo arterial y la veno-oclusión, usándose para el tratamiento de la disfunción eréctil moderada o severa (194). En la hipertensión

pulmonar idiopática arterial, la inhalación de VIP ha dado como resultado una reducción de la presión arterial pulmonar, una vasodilatación pulmonar temporal, una mejora en el volumen del latido y en la saturación de oxígeno así como una reducción de la resistencia pulmonar vascular (195, 196). Por último, la inhalación de VIP nebulizado reduce los marcadores de inflamación y aumenta el número de células Treg en el lavado broncoalveolar de pacientes con sarcoidosis crónica (197).

3.3.5.3 Cortistatina.

Cortistatina es un neuropéptido cíclico de la familia de la somatostatina descubierto en 1996 por Luis de Lecea en el cerebro de rata (198). Su nombre se debe a que tiene una expresión predominantemente en interneuronas de la región cortical y por su capacidad de disminuir la actividad neuronal en esta zona (199).

Cortistatina deriva de una prepro-proteína (preproCST) de 114 aminoácidos en ratón y 105 aminoácidos en humanos. La preproCST genera la proCST tras un procesamiento proteolítico del precursor, generando la cortistatina-14, cortistatina-17, cortistatina-29 o cortistatina-13 (200). Mientras que la cortistatina de ratón y rata son idénticas, la proteína humana tiene una única sustitución de 1 aminoácido y 3 aminoácidos adicionales en la región C terminal (en la forma cortistatina-17). La preproCST humana se ha clonado a partir de diferentes tejidos periféricos, incluyendo corazón fetal, pulmones, próstata, riñón y algunos tumores (201). Es importante destacar la presencia del ARN para preproCST pero no para la somatostatina, en células del sistema inmunológico.

Cortistatina muestra una alta homología con somatostatina, con la que comparte 11 de sus 14 aminoácidos, incluyendo la secuencia de unión a receptor (FWKT) y las dos cisteínas que permiten la formación de la estructura cíclica en ambos péptidos mediante un puente disulfuro (**Figura 16**) (199).

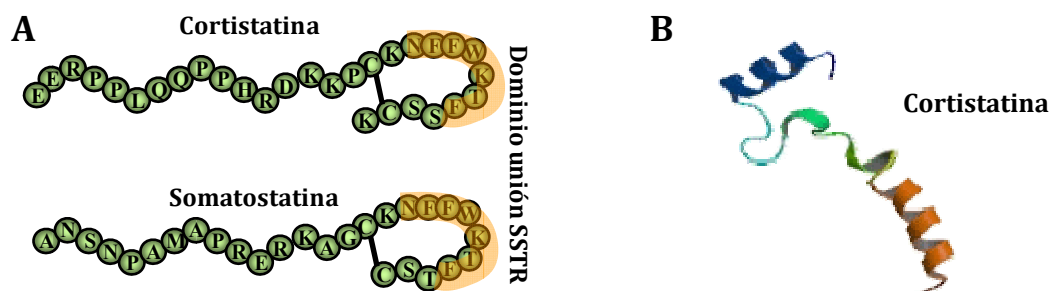


Figura 16: A. Estructura secundaria de CST y somatostatina. B. Estructura terciaria de CST.

En base a su similitud estructural, la cortistatina se une con alta afinidad a los receptores de la somatostatina, SST1, 2, 3, 4 y 5, motivo por el cual ambos péptidos comparten varias funciones biológicas, como son la disminución de los niveles de

AMPC en células de la hipófisis, la inhibición de la proliferación celular y la disminución de la actividad neuronal en el hipocampo. Sin embargo, a pesar de su gran similitud estructural con somatostatina, cortistatina presenta diferencias funcionales importantes. Por ejemplo, en la inducción del sueño, cortistatina provoca un aumento del sueño de ondas lentas mientras que la somatostatina disminuye esta acción. Durante la vigilia y el sueño hay una variación en los niveles de acetilcolina. Se ha demostrado que la cortistatina antagoniza los efectos de la acetilcolina, mientras que la somatostatina mejora los efectos de la misma (198). Por otro lado, la cortistatina, y no la somatostatina, afecta a la reducción de la actividad locomotora (202). También se ha descrito que en el sistema cardiovascular la cortistatina, y no la somatostatina, es capaz de reducir la calcificación vascular en ratas al unirse al receptor 1a de la grelina (GHSR1a, del inglés *Growth hormone secretagogue receptor*) (203).

Las diferencias funcionales descritas entre somatostatina y cortistatina, junto con el hecho de que en ratones deficientes en somatostatina no existe un aumento en la expresión de cortistatina (204), sugieren que la cortistatina no tiene un papel compensatorio, y que podría estar uniéndose a otros receptores distintos de los de somatostatina. Uno de estos receptores es el receptor de grelina, el GHSR1a, al cual cortistatina es capaz de unirse y señalizar activando la vía de AMPc/PKA (205). Además de unirse a GHSR1a, se ha descrito que la cortistatina se une con gran afinidad al receptor huérfano recientemente descubierto en humanos MrgX2 (del inglés, *Mas-related GPCR, member X2*), mientras que somatostatina puede unirse a este receptor pero con baja afinidad (206). La unión a GHSR y MrgX2 es una explicación plausible para las acciones distintas de ambos péptidos (**Figura 17**). Sin embargo, MrgX2 no se expresa en roedores y un receptor homólogo está aún por identificar. Además, la formación de homodímeros o heterodímeros de los receptores de somatostatina y moléculas modificadoras de la actividad de los receptores, RAMPs, también podrían explicar las diferencias funcionales entre cortistatina y somatostatina, introduciendo mayor complejidad a este singular escenario (207). Así, dependiendo del tipo celular, del contexto y del tipo de estimulación, las rutas de señalización desencadenadas por la unión del péptido al receptor son diferentes incluyendo activación de proteína quinasa C (PKC), inducción de AMPc, o aumento de calcio intracelular.

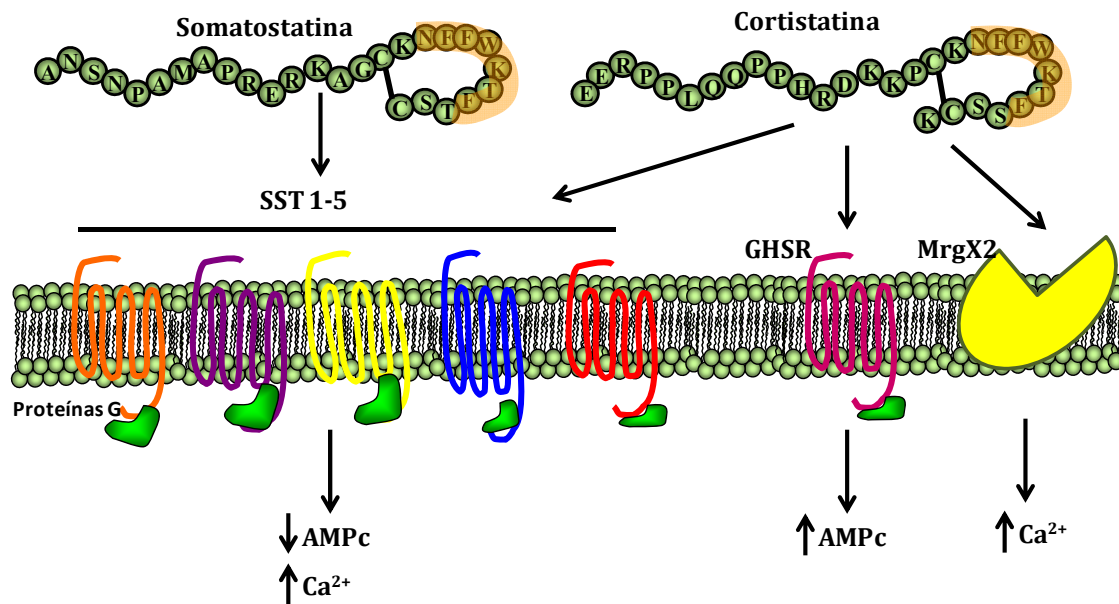


Figura 17 - Efecto diferencial de la somatostatina y cortistatina: Cuestión de especificidad del receptor. La somatostatina se une a los SST1-5 y la acción es principalmente debida a la disminución de los niveles de AMPc. Cortistatina, además de unirse a SST1-5, se une al receptor de la grelina (GHSR) y activa la vía AMPc/PKA y en humanos, a un receptor específico de CST, el MrgX2, aún no identificado en roedores. Adaptado de (208).

En la **tabla 5** se recoge un resumen de la principal acción de CST así como su fuente, receptor, expresión de receptor y rutas de señalización en el organismo.

Tabla 5. CST: Expresión, receptores, funciones principales y señalización.

Principal fuente	Principal acción	Tipo Receptor	Expresión Receptor	Señalización Receptor
SNC, SI, riñón, estómago	↓ Actividad locomora, ↑ sueño de ondas lentas, ↓ hormona del crecimiento, ↓ proliferación celular.	SST 1-5	SNC, SI, riñón, pulmón, páncreas, estómago, pituitaria, hígado	↑ Ca ²⁺ -PKC ↓ AMPc
		GHSR	SNC, GI, SI, pituitaria, páncreas, corazón, pulmón, músculo	↑ AMPc-PKA

Abreviaturas: SST: Receptor de Somatostatina. GHSR: Receptor Grelina. SNC: Sistema Nervioso Central. GI: Tracto Gastrointestinal. SI: Sistema Inmunitario. Adaptada de (184).

Otra diferencia entre somatostatina y cortistatina es la distribución de ambos péptidos, quedando la presencia de cortistatina más restringida en tejidos periféricos. Sin embargo, en el sistema inmunológico son varias las células, incluyendo linfocitos, monocitos, macrófagos y DC que producen cortistatina pero no somatostatina, y sus niveles de producción se correlacionan con la diferenciación y activación de estas células, lo cual apunta al papel

inmunorregulador de la cortistatina en el sistema inmunológico, papel no compartido totalmente con la somatostatina (209, 210) (**Tabla 6**).

Esta diferencia en la función inmunorreguladora también puede deberse al hecho de que CST se une al receptor de la grelina, además de a los receptores de somatostatina, en distintas células del sistema inmunitario, y la vía de señalización es distinta en cada caso. Así, células T, DC, macrófagos y monocitos expresan tanto receptores para somatostatina, fundamentalmente SST2, como el receptor de la grelina, GHSR (169). El receptor específico de CST, MrgX2, no se ha detectado en células del sistema inmunitario (169). CST lleva a cabo su acción anti-inflamatoria e inmunorreguladora a través de los distintos receptores a los que se une, si bien la acción anti-inflamatoria más potente es a través de la señalización por GHSR y la consiguiente activación de la ruta AMPc/PKA. Es por esto, que CST tiene un mayor papel en situaciones de inflamación y autoinmunidad que somatostatina (208). En el siguiente apartado detallaremos más la función inmunorreguladora y anti-inflamatoria de CST.

En la **tabla 6** se muestra un resumen de la acción de CST en el sistema inmunitario, a que familia pertenecen, cuales son los principales productores, sus receptores, y su uso en terapia.

Tabla 6. Acción de CST en autoinmunidad: Familia, Fuente inmunitaria, Receptores, Funciones y Efecto terapéutico.

Principal fuente	Tipo Receptor/ Célula inmunitaria	Función Inmunitaria	Terapia	Ref
T, Mo, Mφ	SST1-5/ T, Mo, Mφ, DC	Disminuye Citoquinas inflamatorias; quimioquinas ; proliferación células T; Respuesta Th1: Il-2, IFNγ	RA IBD	(211-214)
	GHSR/ T, Mo, Mφ, DC	----- Aumenta IL-10, TGF-β Células Treg	EAE	

Abreviaturas: SST1-5, receptor somatostatina 1-5; GHSR, receptor grelina; CST, cortistatina; T, célula T; Mφ, macrófago; Mo, monocito; DC, célula dendrítica; EAE, encefalomiелitis experimental autoinmune; RA, artritis reumatoide; IBD, enfermedad intestinal inflamatoria. Adaptada de(169).

Actualmente se está utilizando CST en clínica, en pacientes con síndrome de Cushing, en los cuales el tratamiento con CST inhibe la hipersecreción de ACTH y de cortisol (215).

3.3.5.4 Función inmunorreguladora de CST y VIP.

Hasta ahora hemos visto que CST y VIP son dos péptidos que, a pesar de pertenecer a distintas familias, tener distintas funciones fisiológicas y no compartir homología (169), comparten características que los hacen ser candidatos a péptidos moduladores de la respuesta inmunológica. Entre estas características destaca el hecho de que son péptidos producidos por células del sistema inmunitario en respuesta a una señal de inflamación, daño, o frente a una estimulación antigénica (172, 210). Además ejercen su función mediante la unión a receptores acoplados a proteínas G expresados en distintas células del sistema inmunitario, y, su principal ruta de señalización es mediante la activación de la proteína quinasa A (PKA) dependiente de AMPc, ruta relacionada con inhibición de mediadores inflamatorios (184).

En la **figura 18** se muestran los mecanismos moleculares y factores de transcripción involucrados en la activación de la ruta AMPc/PKA, si bien, la mayor parte de estos datos se han obtenido de estudios con VIP (212) y deben ser validados para CST.

Uso de neuropéptidos anti-inflamatorios en enfermedades cardiovasculares: Aterosclerosis y miocarditis autoinmune.

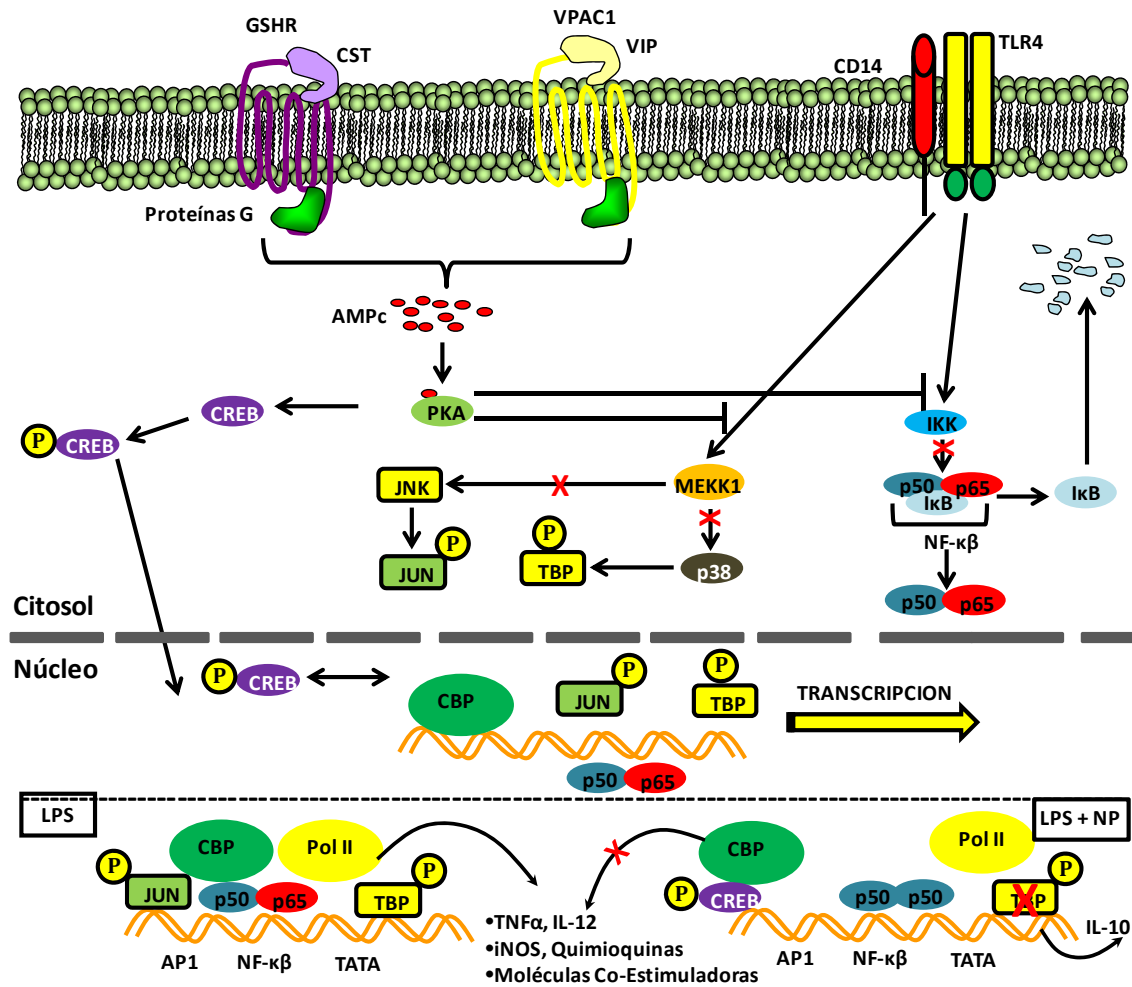


Figura 18. Mecanismos moleculares y factores de transcripción implicados en el efecto anti-inflamatorio de VIP y CST. Adaptada de (212).

- La activación de PKA induce la fosforilación de CREB (del inglés, *AMPC-responsive-element-binding protein*) que, debido a su alta afinidad por CBP (del inglés, *co-activator CREB-binding protein*), evita la asociación de CBP con p65 (componente clave de la vía de NF-κB).
- La activación de PKA inhibe la activación de IKK (del inglés, *IκB kinase*), lo que impide la fosforilación de IκB, manteniendo la estabilidad del complejo NF-κB (del inglés, *nuclear factor-κB*) en el citosol.
- La activación de PKA inhibe la activación y fosforilación de MEKK1 (del inglés, *MAPK/ERK kinase kinase 1*) comprometiendo la fosforilación de p38, lo que impide la fosforilación de TBP (del inglés, *TATA-binding protein*) y su translocación nuclear. La unión de TBP fosforilada a la región TATA del ADN es esencial para la actividad de la ADN polimerasa II.
- La inhibición de MEKK1 por PKA posteriormente, desactiva JNK y la fosforilación de cJun. Se produce un cambio en la composición del complejo AP-1 (del inglés, *activator protein 1*), que requiere para su funcionalidad la presencia de cJun fosforilado.

La consecuencia final de la activación de la vía AMPc-PKA, tras la unión de CST y VIP a sus respectivos receptores, es la inhibición del complejo transcripcional y, consecuentemente, la unión del mismo a los promotores de diversos genes involucrados en inflamación tras la estimulación del TLR4 (212). En el caso de VIP, hay que destacar que la activación de PAC1 en macrófagos y monocitos también activa a la fosfolipasa C y la proteína quinasa C, lo cual conlleva la inhibición de la translocación nuclear de NFκB (172).

El efecto terapéutico de estos neuropéptidos está asociado con una reducción tanto de las fases iniciales de las enfermedades autoinmunes, donde se establece una respuesta frente a auto-antígenos, como de las fases tardías, donde hay una respuesta inflamatoria destructiva. Así, los neuropéptidos van a afectar al desarrollo de células Th1, su entrada en los órganos diana, y la liberación de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas, con el consecuente reclutamiento de macrófagos y neutrófilos. Como resultado disminuye la producción de mediadores pro-inflamatorios por células infiltrantes o residentes. Al mismo tiempo hay una estimulación de la producción de citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10, por parte de los macrófagos, células T o DC (169).

Los mecanismos por los cuales CST y VIP inhiben elementos de la respuesta Th1 no se conocen totalmente, si bien diversos estudios, la mayoría de los cuales se han realizado con VIP, indican que ambos neuropéptidos regulan el balance Th1/Th2 a través de varios mecanismos no excluyentes (**Figura 19**). Estos mecanismos comprenden efectos directos sobre la diferenciación de las células T, e indirectos sobre la regulación de las APC. De este modo, son capaces de disminuir la proliferación de las células Th1 activadas, la producción de IL-2, del factor de transcripción T-bet, así como el reclutamiento de células Th1 al inhibir la secreción de la quimioquina CXCL10 por macrófagos y DC (211, 213, 216-218). Por otro lado, se ha visto que VIP induce la expresión de CD86 en las DC, el cual es importante para la diferenciación hacia Th2, favorece el reclutamiento de células Th2 a través de la inducción de CCL2, la inhibición de la apoptosis específica de Th2 mediada por FasL y la granzima B y la inducción de factores de transcripción involucrados en la diferenciación de Th2, c-MAF, GATA-3 y JUNB (216-219).

VIP induce anergia en células T al inhibir la secreción de IL-2 (220) y al inducir la expresión de CTLA-4 de células T activadas (220). Además, la inhibición de los linfocitos Th1 auto-reactivos conlleva una disminución de los niveles de autoanticuerpos, especialmente del tipo IgG2a, los cuales intervienen en la activación del complemento y de los neutrófilos (177, 181, 211, 213).

Otra característica que comparten CST y VIP, en la generación de una respuesta inmunorreguladora, es que son capaces de generar células Treg, las cuales van a ser importantes en el papel de CST y VIP en el control de

enfermedades autoinmunes como la encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE), la artritis experimental, la colitis experimental o la uveoretinitis experimental, (211, 221-223). CST y VIP inducen la generación de células Treg a partir de células T CD4⁺CD25⁻, dando células Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ antígeno específicas, las cuales suprimen la actividad de células T y B autorreactivas, así como la respuesta inflamatoria localizada. La manera que tienen las células Treg de inducir supresión de las células T auto-reactivas es mediante el contacto directo dependiente de CTLA-4 y/o la producción de citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y/o TGF- β . Además, se ha demostrado que VIP es capaz de inducir la diferenciación a DC tolerogénicas (tolDC) a partir de precursores de médula ósea o monocitos (224-226). Estas tolDC tienen la capacidad de generar células Treg antígeno-específicas y de transferir tolerancia inmunológica *in vivo* (172).

También se ha visto que VIP y CST tienen un papel sobre las células Th17, de modo que disminuyen la presencia de las mismas en tejidos inflamados y en ganglios linfáticos (177, 181, 211, 213). Sin embargo, los mecanismos de acción de los mismos sobre esta población celular aún están por clarificar. Estudios *in vitro* muestran como VIP induce la generación de células Th17 en presencia de TGF- β , aunque estas células secretan IL-17 e IL-22 pero no IL-6 o IL-21 (227).

En la **figura 19** se muestra, a modo de esquema, el papel inmunorregulador de los VIP y de CST (212).

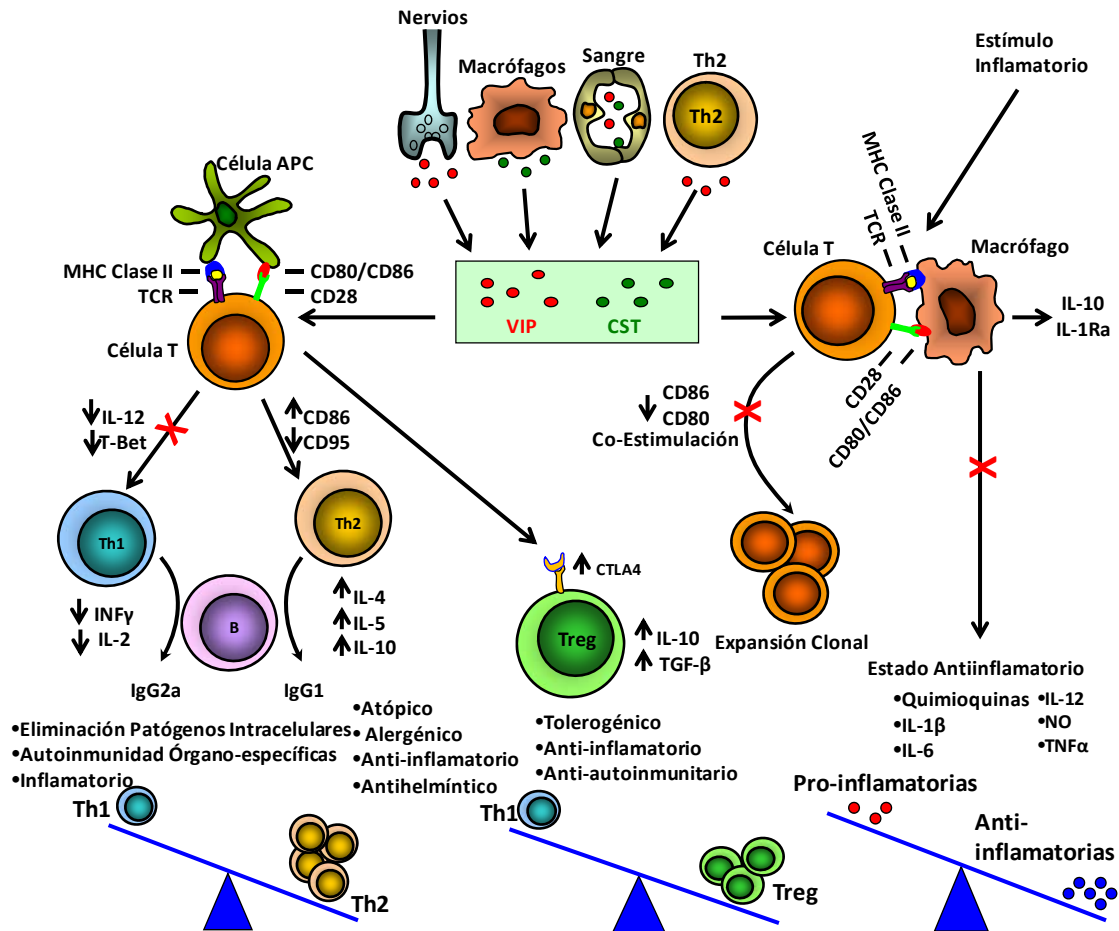


Figura 19: Control de la tolerancia inmunológica de VIP y CST. VIP y CST son liberados por terminaciones nerviosas, sangre, células Th2 o macrófagos en respuesta a una estimulación inflamatoria o antigénica. Inducen tolerancia e inhiben la respuesta autoinmune a través de distintos mecanismos no excluyentes. El primero de ellos es la diferenciación hacia Th2 y la disminución de las funciones Th1, lo cual lo hacen de un modo directo sobre las células T o indirectamente a través de la regulación de las células presentadoras de antígenos (APC). El segundo conlleva la inhibición de citoquinas y quimioquinas inflamatorias así como la producción de radicales libres por parte de los macrófagos. Además, disminuyen la actividad co-estimuladora de las APC, con la consiguiente inhibición de la expansión clonal de células T. En tercer lugar, VIP y CST inducen la generación de células Treg que suprimen la activación de células T autorreactivas. Adaptada de (212).

4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 Hipótesis

Existe una creciente necesidad de encontrar nuevos tratamientos eficaces que controlen el componente inflamatorio y/o autoinmune de las enfermedades cardiovasculares de alta incidencia en la población mundial, como son la miocarditis autoinmune y la aterosclerosis. Numerosas evidencias indican que los neuropéptidos VIP y cortistatina tienen la capacidad de modular la respuesta inmunitaria, ante una situación de inflamación exacerbada o autoinmunidad, favoreciendo un estado de tolerancia inmunológica. Además, ambos péptidos poseen receptores en células del sistema cardiovascular, como son las células de músculo liso arterial, células endoteliales y cardiomiocitos, y son capaces de ejercer una respuesta en este sistema.

Ante estos antecedentes nos planteamos la hipótesis de que tanto VIP como CST podrían tener un efecto terapéutico en miocarditis y aterosclerosis, bien sea por su papel inmunoregulador y anti-inflamatorio así como por un posible efecto sobre las distintas poblaciones celulares que se pueden ver afectadas en estas enfermedades.

4.2 Objetivos

Para analizar el papel de VIP y cortistatina en el desarrollo de la miocarditis autoinmune y la aterosclerosis planteamos los siguientes objetivos:

1. Evaluar el efecto terapéutico del tratamiento con VIP o cortistatina *in vivo* en un modelo de miocarditis experimental autoinmune (MAE) mediante el estudio de los parámetros clínicos, histopatológico e inmunológicos característicos de la enfermedad.
2. Estudiar el efecto del tratamiento con VIP o cortistatina en la formación de placas ateroscleróticas, así como en la respuesta inmunitaria aterogénica, en un modelo agudo de aterosclerosis *in vivo*.
3. Evaluar el efecto terapéutico de VIP y cortistatina en un modelo experimental de aterosclerosis crónica, así como los mecanismos inmunológicos implicados.
4. Analizar *in vitro* el efecto de VIP y cortistatina sobre otras poblaciones celulares involucradas en el desarrollo de aterosclerosis: células endoteliales, células espumosas y células de músculo liso.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Péptidos

El péptido de la cadena pesada de la miosina, Myhc- $\alpha_{614-629}$ (Ac-RSLKLMATLFSTYASADR-OH) se adquirió de la casa comercial Anaspec. Este péptido está acetilado en el extremo amino terminal, una modificación crítica en su actividad inmunogénica. Además, el péptido está flanqueado por dos argininas, necesarias para aumentar su solubilidad en medio acuoso. Myhc- $\alpha_{614-629}$ se disolvió en PBS (tampón fosfato salino: 130mM NaCl (Sigma-Aldrich), 70mM Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich), 3mM NaHPO₄ (Sigma-Aldrich), pH 7.2.) a una concentración de 2 mg/ml, y se emulsionó 1:1 con adyuvante completo de Freund (CFA), quedando a una concentración final de 1 mg/ml. Los neuropéptidos VIP y Cortistatina se adquirieron de American Peptide y Phoenix Pharmaceuticals, y se disolvieron a una concentración de 10⁻⁴M en tampón fosfato 20mM pH 7.0 (se almacenaron a -80°C hasta su uso).

5.2 Animales y modelos de experimentación

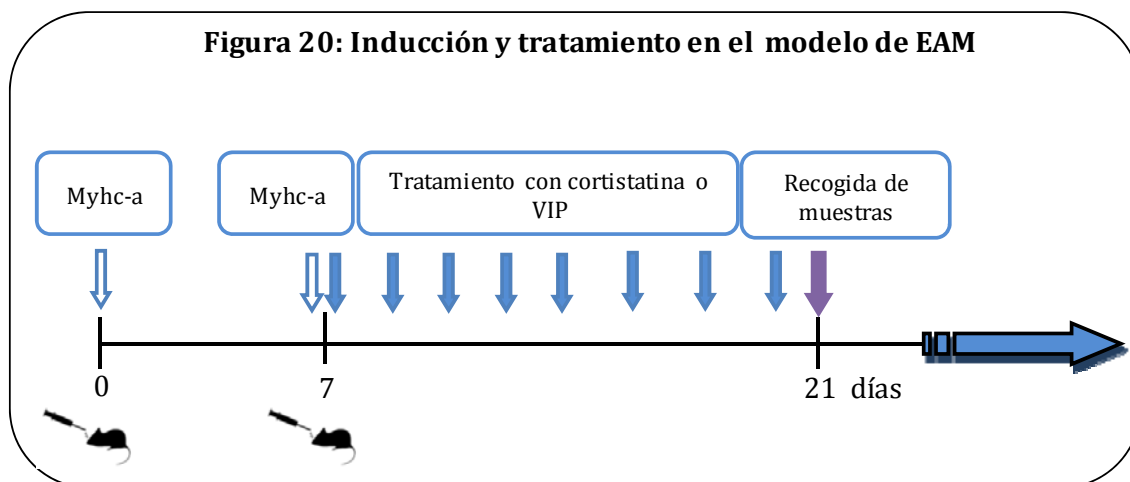
Todos los estudios con animales se realizaron bajo la normativa de la Unión Europea sobre el manejo y uso de animales de laboratorio. Los modelos utilizados en esta tesis fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López Neyra”. Todos los animales se obtuvieron de Charles River y, tras su recepción en nuestra unidad de experimentación animal, se mantuvieron en un ambiente controlado con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas a una temperatura constante de 23°C. La atención diaria de los animales, además de la alimentación y limpieza, se han realizado por los veterinarios y técnicos acreditados del animalario. Todos los ratones se mantuvieron bajo una dieta estándar y agua ad libitum a excepción de los ratones utilizados en los modelos de aterosclerosis, que tuvieron una dieta especial tipo occidental (U8958, Panlab).

Para los modelos de aterosclerosis y ligación parcial de la carótida se utilizaron ratones C57BL/6 ApoE^{-/-}; para el modelo de ligación completa de la carótida, ratones FVB/NJ; para la obtención de médula ósea y células CD4⁺, ratones C57Bl/6; y para el modelo de MAE, ratones BALB/c. Todos los animales se obtuvieron del centro de producción Charles River.

5.2.1 Modelo de miocarditis autoinmune experimental (MAE) y tratamiento.

Para inducir el modelo de MAE, inmunizamos subcutáneamente (SC) ratones BALB/c (hembras y machos, 6-8 semanas de edad) en la zona cervical con 100µg por animal de una emulsión del péptido Myhc- $\alpha_{614-629}$ en CFA (volumen de 100µL). Siete días después, se realizó una segunda inmunización con el péptido idéntica a la anterior (Figura 1). Los animales fueron tratados intraperitonealmente (IP) con 1nmol de VIP o CST, disuelto en 200µL de PBS, tres días en semana, desde el día 7

hasta el momento del sacrificio en el día 21. La dosis utilizada se eligió en base al efecto terapéutico de estos neuropéptidos en otros modelos experimentales de autoinmunidad (181, 211, 213, 223). Los controles recibieron PBS en lugar de neuropéptido. 21 días después de la primera inmunización, pesamos y sacrificamos a cada animal por inhalación de CO₂. Se aislaron los ganglios linfáticos mediastinales para el análisis de la respuesta inflamatoria y auto-reactiva y se extrajo sangre para determinar el título de auto-anticuerpos frente a Myhc- $\alpha_{614-629}$. Posteriormente, se perfundió al animal con PBS a través del ventrículo izquierdo, se diseccionó y pesó el corazón, y se fijó en 4% de paraformaldehído (Sigma) durante 4-8 horas a 4°C. La relación entre el peso del corazón y el peso corporal es una medida de la presencia de inflamación cardiaca, ya que en ratones con miocarditis esta relación se incrementa significativamente. Tras la fijación, se criopreservó el corazón en 30% sacarosa (Sigma-Aldrich) y tras extensos lavados en PBS finalmente se incluyó en una resina (O.C.T.: *optimal cutting temperature* de Tissue Tek), se congeló en nieve carbónica y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento. Tras equilibrarlo a -20°C, se obtuvieron secciones de 10 μ m en un criostato (Leica CM 1850 UV). Los criocortes se almacenaron a -80°C hasta su análisis por inmunofluorescencia o tinción con hematoxilina y eosina (H-E).



El análisis histopatológico del corazón se realizó en las secciones teñidas con H-E atendiendo a los grados de miocarditis expuestos en la **tabla 7**.

Tabla 7. Grados de miocarditis.

Grado	Características
0	Ausencia de infiltración
1	Infiltración leve, generalmente en la periferia del corazón.
2	Presencia de uno o dos focos de infiltración de tamaño pequeño. Superficie infiltrada < al 20% de la superficie total del corazón.
3	Múltiples focos de infiltración con severidad moderada
4	Infiltración severa > al 50% de la superficie total del corazón

5.2.2 Modelo de aterosclerosis aguda en arteria carótida y tratamiento

La inducción de un modelo de aterosclerosis aguda y local se realizó en ratones ratones C57BL/6 apoE^{-/-} sometidos a una ligación parcial de la carótida izquierda y alimentados con una dieta tipo occidental. En este modelo se generan lesiones ateroscleróticas únicamente en la arteria ligada de una forma rápida debido a una concentración elevada de colesterol en sangre y la creación de un flujo sanguíneo irregular en la región. Ratones C57BL/6 apoE^{-/-} (de 6 semanas de edad, machos) se anestesiaron por vía intramuscular con una mezcla de 0.8mg/Kg de ketamina (Imalgene 1000, Merial) y 2mg/Kg acepromacina (CalmoNeosan, Pfizer). Se realizó una incisión de 4-5mm en la línea media ventral del lado izquierdo del cuello, se expuso la carótida y se ligaron tres de las cuatro ramas (la carótida externa izquierda, la carótida interna y la arteria occipital) con hilo de sutura 6-0, dejando a la arteria superior tiroidea intacta (123). (**Figura 21**).

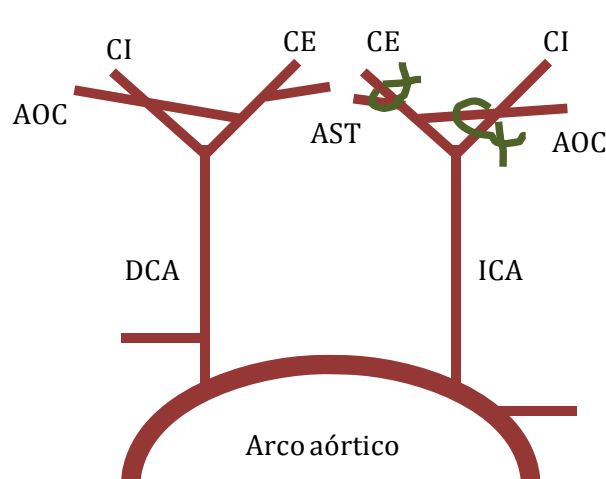


Figura 21. Esquema ligación parcial de la carótida.

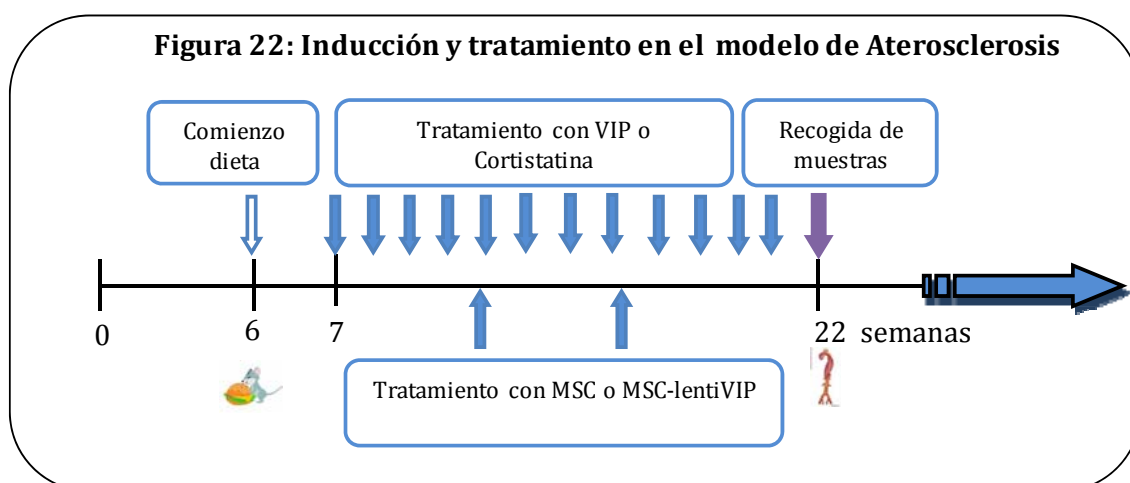
La ligación parcial de la arteria carótida izquierda (ICA) se realizó con hilo de sutura 6-0, ligando tres ramas de la ICA: carótida externa izquierda (CE), carótida interna (CI) y arteria occipital (AOC). La arteria carótida derecha (DCA) y la arteria superior tiroidea izquierda (AST) se dejan sin ligar.

La incisión se cerró con hilo de sutura 6-0. Tras la cirugía los animales se alimentaron con la dieta hiperlipidémica tipo occidental y con agua *ad libitum*.

Durante tres semanas posteriores a la ligación, los ratones se trataron con 1nmol de VIP o CST, disuelto en 200 μ L de PBS, inyectado IP, tres días por semana. Al grupo control se les inyectó PBS. A día 21, se sacrificaron los animales y se diseccionaron las carótidas izquierda y derecha para el análisis la formación de placas y de la respuesta inmunitaria. Las carótidas destinadas al análisis de la formación de lesiones se incluyeron en paraformaldehido al 4% y se procesaron para histología como se indicó anteriormente. Las carótidas destinadas al estudio de la respuesta inmunitaria se pusieron en medio RPMI completo [Medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute médium-1640*, (PAA)) suplementado con 10% de suero bovino fetal descomplementado (SBF) (Gibco), 100U/ml penicilina (Gibco), 100 μ g/ml estreptomycin (Gibco), 0.25 μ g/ml anfotericina B (Gibco), 2mM L-glutamina (Gibco), 50 μ M β -mercaptoetanol (Sigma)] para la consiguiente estimulación. También se aislaron células de los ganglios linfáticos faciales, de la yugular interna y el cervical posterior y se cultivaron en medio RPMI completo para el consiguiente análisis inmunológico.

5.2.3 Modelo de aterosclerosis crónico y tratamiento

El modelo de aterosclerosis crónica se realizó en ratones hembra C57BL/6 apoE^{-/-} que se alimentaron *ad libitum* con una dieta hiperlipidémica tipo occidental (contiene 20% de lípidos y 0.15% de colesterol) desde la semana 6 de vida y hasta el momento del sacrificio, en la semana 22. El tratamiento consistió en la inyección IP de 1nmol de VIP o CST, disuelto en 200 μ L de PBS, tres días por semana, desde la semana 7 hasta el momento del sacrificio. Los ratones control recibieron PBS. La dosis utilizada se eligió en base al efecto terapéutico de estos neuropéptidos en otros modelos de autoinmunidad (181, 211, 213, 223). Los grupos tratados con células madre mesenquimales (MSC, del inglés *Mesenchymal Stem Cells*) y con MSC trasducidas con vectores lentivirales que expresan VIP recibieron dos inyecciones, con dos millones de células por ratón en la 13 y 18 (Figura 22).



Para determinar el efecto de los dos neuropéptidos a tiempos tempranos, el tratamiento con VIP o CST (1nmol, 3 veces/semana) se realizó desde la semana 7 a la semana 14, momento en que los animales se sacrificaron para su análisis. Por su parte, para ver el efecto del tratamiento una vez establecida la enfermedad, el tratamiento con VIP o CST (1nmol, 3 veces/semana) se inició a partir de la semana 15 hasta la semana 22.

Durante el desarrollo de la aterosclerosis, se midieron los niveles de colesterol en sangre obtenidas de muestras sanguíneas de la cola de los ratones una vez cada dos semanas, usando como anti-coagulante 4% de citrato sódico y como test de medida de colesterol tiras de Accuntred Plus (Roche).

A la semana 14 o 22 de vida, los ratones se sacrificaron por inhalación de CO₂. Se aislaron los ganglios linfáticos lumbares para el análisis posterior de la respuesta inmunitaria. Tras perfundir al animal con PBS, se aisló la aorta desde el seno aórtico (mitad superior del corazón) hasta la bifurcación de las arterias iliacas. Posteriormente, se dividió la aorta en tres partes. 1) El seno aórtico, que se encuentra en la mitad superior del corazón, se fijó en 4% de paraformaldehído para el posterior análisis de formación de placas ateroscleróticas. 2) El arco aórtico, comprende el segmento de aorta desde su salida del corazón hasta el comienzo de la aorta descendente, e incluye la salida del tronco braquicefálico, de la arteria carótida común izquierda y de la arteria subclavia izquierda. El arco aórtico se incluyó en formalina tamponada al 10% (3.7% formaldehído disuelto en PBS) para el análisis de la presencia de placas ateroscleróticas. 3) La aorta descendente, que abarca desde el arco aórtico hasta la bifurcación de las arterias iliacas, se incluyó en formalina tamponada al 10 % para el análisis de la formación de placas ateroscleróticas.

Las muestras incluidas en paraformaldehído al 4% se procesaron para su análisis histopatológico de modo similar al expuesto en el modelo de MAE. Los criocortes se almacenaron a -80°C hasta el análisis de marcadores por inmunofluorescencia o por tinción con Oil Red O (Sigma-Aldrich). Las muestras incluidas en formalina tamponada al 10% se lavaron con PBS. La aorta descendente se tiñó con Sudán IV (Sigma-Aldrich). Las muestras de arco aórtico fueron embebidas en parafina siguiendo una técnica estándar, se seccionaron con un micrótopo (Leica) y las secciones se tiñeron con H-E.

5.2.4 Modelo de ligación completa de la carótida y tratamiento

Este modelo se utiliza para el análisis de la proliferación de la lámina íntima de las arterias. Ratones FVB/NJ (machos, de 6 semanas de edad), anestesiados como se indicó anteriormente, se les practicó una incisión de 4-5mm en la línea media ventral del lado izquierdo del cuello. Una vez expuesta la arteria carótida izquierda, se realizó una ligación completa con hilo de sutura 6-0 en un punto

cercano a la bifurcación de la arteria carótida interna con la arteria occipital (Figura 23).

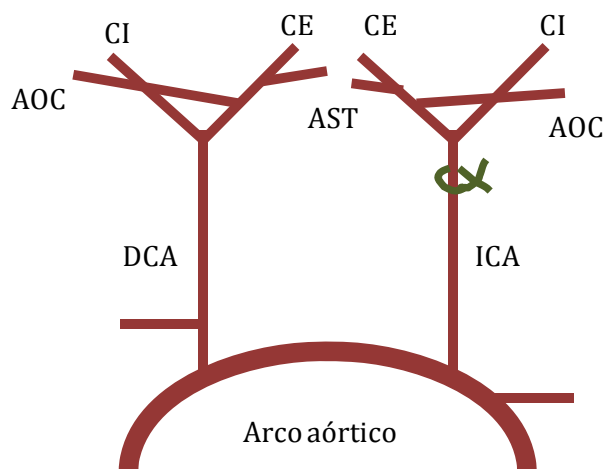


Figura 23. Esquema ligación completa de la carótida.

Ver abreviaturas en la leyenda de la Figura 2.

Después de la cirugía, los ratones se trataron IP durante cuatro semanas con 1nmol de VIP o CST, disuelto en 200 μ L de PBS, tres días en semana. Al grupo control se les inyectó con PBS. Los animales se sacrificaron en el día 28, se aislaron las carótidas izquierda (ligada) y derecha (sin ligar), se fijaron en formalina tamponada al 10%, se incluyeron en parafina, y se procesaron según el modo explicado en el modelo de aterosclerosis crónico. Tras tinción con H-E, se determinó el grado de proliferación de la lámina íntima como se indica en apartados posteriores.

5.3 Tinción con Sudan IV

El Sudán IV es un colorante con alta afinidad por lípidos, clásicamente usado para el análisis de la formación de lesiones ateroscleróticas en la superficie de aortas descendentes. Nosotros lo utilizamos para teñir las aortas descendentes en el modelo de aterosclerosis crónico. La aorta descendente una vez aislada y fijada, y libre de adventicia, se tiñó con una solución del 5% de Sudán IV disuelto en una mezcla 1:1 de acetona y 70% de etanol durante 15 minutos. Posteriormente, se decoloró durante 5 minutos en etanol 80% y, por último se lavó durante una hora con agua corriente. Una vez teñida, la aorta se diseccionó longitudinalmente con la ayuda de un microscopio/lupa y se inmovilizó sobre un soporte de resina para ser fotografiada. El área total de la aorta y el de la lesión se calculó utilizando el programa ImageJ versión 1.45j.

5.4 Tinción de Oil red O

El Oil red O es un colorante que tiñe lípidos neutros, y se utilizó para teñir los criocortes procedentes de las muestras de seno aórtico y arteria carótida. Una vez descongelados, los criocortes se tiñeron con una solución del 5% de Oil Red O en

100% de propilenglicol (Research AG) durante 20 minutos en un baño precalentado a 60°C. Posteriormente, se lavaron tres veces en propilenglicol al 85%, y dos veces en agua destilada. Los núcleos se contrastaron con hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos. Tras lavar las muestras de nuevo en agua destilada, se montaron con 70% de glicerol (228). El área total de las secciones de seno aórtico y de carótida, y el área total de la lesión se calcularon usando el programa ImageJ versión 1.45j. El resultado se expresa como porcentaje de lesión con respecto al área total del seno aórtico o la carótida.

5.5 Tinción de Hematoxilina y Eosina (H-E)

Esta tinción se realizó en las secciones procedentes de las muestras incluidas en parafina y de criocortes. La hematoxilina tiñe estructuras ácidas, como el núcleo celular, y la eosina tiñe estructuras básicas, como el citoplasma de las células. Los cortes de las muestras de arco aórtico incluidas en parafina se desparafinaron siguiendo las técnicas estándares (229). Estas muestras, al igual que las muestras de corazón procedentes del modelo de MAE y las muestras de carótida procedentes del modelo de ligación completa, se lavaron dos veces en agua destilada durante 10 minutos, y posteriormente se incubaron con hematoxilina de Harris durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras dos lavados con agua destilada, se incubaron con eosina alcohólica durante 5 minutos. Tras dos nuevos lavados en agua destilada, las muestras se deshidrataron mediante inclusión en baños sucesivos de alcohol de graduación creciente, y se procedió a su montaje con medio de montaje permanente (EUKITT®, Sigma).

5.6 Inmunofluorescencias

La inmunodetección de antígenos específicos se llevó a cabo en criocortes seriados del tejido previamente fijado e incluido en OCT. Estas muestras se descongelaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se fijaron de nuevo con paraformaldeído al 4% (Sigma) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación, se lavaron las muestras dos veces con PBS (cada lavado implica una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente con PBS, retirando el exceso de solución por inversión). A continuación, las muestras se permeabilizaron con 0.2% TritonX-100 (Sigma-Aldrich) disuelto en una solución de PBS con 1% de suero de cabra (Gibco, 16210-064) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras eliminar la solución de permeabilización, las muestras se lavaron una vez y se bloquearon las uniones inespecíficas incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente con solución de bloqueo (PBS con Tritón 0.1% con 10% de suero de cabra). A continuación, se añadieron el anticuerpo conjugado a fluoróforo, rat anti-mouse CD45, el anticuerpo primario monoclonal mouse anti-sma, o el anticuerpo primario monoclonal mouse anti-rat CD68, a sus respectivas concentraciones, **(tabla 7)** disueltos en solución de anticuerpo (PBS con Tritón 0.1% y 1% de suero de cabra). Los portaobjetos se incubaron a 4°C en cámara húmeda durante 18

horas en oscuridad. En el caso del marcaje para CD68 o actina de músculo liso las muestras se lavaron tres veces y se incubaron con el anticuerpo secundario policlonal conjugado Alexa Fluor 546 goat anti-mouse o Alexa fluor 488 goat anti-mouse (**tabla 8**). Todas las muestras se lavaron tres veces, los núcleos se tiñeron con una solución de Hoechst 33342 (dilución 1:1000 de una solución 1mM en agua; Molecular Probes) y se las muestras se montaron en Prolong (Molecular Probes) para evitar la pérdida de fluorescencia hasta su observación.

Tabla 8. Anticuerpos para Inmunofluorescencia

Anticuerpos	Casa comercial	Número Catálogo	Concentración Stock	Concentración de uso
Anti-CD45-PE	BD bioscience	553081	0.2 mg/ml	2 µg/ml
Anti-CD68	AbD Serotec	MCA341R	1 mg/ml	2 µg/ml
Anti-SMA	Sigma	A5228	0.2 mg/ml	2 µg/ml
Alexa Fluor 546	Invitrogen	A11030	2 mg/ml	2 µg/ml
Alexa Fluor 488	Invitrogen	A11029	2 mg/ml	2 µg/ml

5.7 Obtención de órganos y aislamiento de células

5.7.1 Procesamiento de ganglios linfáticos

Al finalizar cada modelo experimental, se aislaron los ganglios linfáticos drenantes de la aorta, de la carótida, o del corazón (indicados en cada modelo), y se homogeneizaron por disgregación mecánica en medio RPMI completo utilizando portaobjetos esmerilados. Las células obtenidas se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos. La suspensión celular resultante de los ganglios se resuspendió en RPMI completo, y se contabilizaron las células viables por tinción con el colorante azul de Trypan (Sigma), empleando una cámara de Neubauer (Brand). Las células se diluyeron a una concentración de 10⁶ células/ml.

5.7.2 Explantes de carótida.

Para ver la respuesta inmunitaria local en el modelo de ligación parcial de la carótida, se aislaron tanto la carótida derecha como la izquierda de los ratones de los distintos grupos. Tras ser cortadas con dos hojas de bisturí en trozos de aproximadamente 1mm de grosor, se cultivaron con 500µL de medio RPMI completo en placas de 24 pocillos. A continuación se estimularon con 25ng/ml de acetato de forbol miristato (PMA, Sigma) y 0.5µg/ml de ionomicina (Sigma).

5.7.3 Obtención de suero

La obtención del suero se realizó por punción cardiaca de los ratones sometidos a MAE. Se anestesió de manera terminal a los ratones mediante la inhalación excesiva de CO₂. Tras abrir el esternón, se introdujo una aguja de calibre 22G, acoplada a una jeringa de 1 ml, 5-10mm en el ventrículo izquierdo. Se obtuvieron entre 0.8-1 ml de sangre por ratón. La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 horas. A continuación, se centrifugaron las muestras a 2000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, se recogió el suero localizado en la fase superior, y se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.8 Estudio de la respuesta inmunitaria en los modelos animales

5.8.1 Ensayo de proliferación linfocitaria

Para analizar la respuesta proliferativa de las células inmunitarias, se incubaron 10⁵ células procedentes de los ganglios linfáticos de los distintos modelos en placas de 96 pocillos, a una concentración de 10⁶ células/ml. La incubación se realizó en presencia o ausencia de 2,5µg/ml de Concanavalina A (conA, Sigma-Aldrich) en RPMI completo a 37°C y 5% CO₂ durante 72 horas. La conA es una lectina con capacidad de unión a varios azúcares, activando a distintos tipos celulares, entre ellos a las células T, siendo un mitógeno de las mismas.

En el modelo de MAE se realizó también una estimulación específica con 10µM de Myhc-α₆₁₄₋₆₂₉, para analizar la proliferación en respuesta específica de antígeno. En este modelo también se estudió el efecto directo de CST y VIP sobre las células inmunitarias. Para ello se estimularon *in vitro* células procedentes de los ganglios linfáticos mediastinales de ratones del grupo control con el antígeno de la miosina en ausencia o presencia de 10⁻⁷M de CST o VIP.

En este ensayo se utilizó un nucleótido marcado radiactivamente, la timidina, que se incorpora a las cadenas de DNA de nueva síntesis durante la división celular mitótica. En nuestro caso, tras el cultivo de las células de los ganglios linfáticos durante 72 horas en presencia/ausencia de los estímulos descritos, se añadió 2.5µCi/ml de timidina tritiada ([³H]-metil-Tdr, Amersham) por pocillo durante las últimas 8 horas de cultivo. A continuación, se recuperaron las células con el uso del harvester (Inotech) y se inmovilizaron con etanol 70% sobre una membrana de vidrio (Wallac). Después de secar la membrana durante 2 minutos en un horno microondas a la potencia máxima, se sumergió la membrana en líquido de centelleo y la incorporación de [³H]-metil-TdR se cuantificó con el contador de centelleo de placas Microbeta counter 1450 (Wallac). Los resultados se expresan como índice de proliferación de acuerdo con el número de cuentas radiactivas obtenidas por minuto (c.p.m)

5.8.2 Caracterización de marcadores intracelulares y de superficie mediante citometría de flujo

Para el marcaje de las células Th1 y Th17, las células procedentes de los ganglios linfáticos de los ratones sacrificados se estimularon *in vitro* en medio RPMI completo durante 10-12 horas en presencia o ausencia de 25ng/ml de PMA y 0.5µg/ml de ionomicina, y con 3µM de monensina (Sigma), inhibidor del transporte vesicular en el complejo de Golgi. El análisis de células Treg, Th1 y Th17 mediante citometría de flujo se realizó con 0.5×10^6 células/marcaje distribuidas en tubos de poliestireno de 5 ml (BD Falcon). Las células se lavaron (a 300g durante 5 minutos a 4°C) dos veces con 1 ml de tampón de citometría de flujo (PBS con 10% de SBF y 1% de azida sódica), eliminando el sobrenadante de cada tubo por inversión. Antes del marcaje específico, las células se incubaron 10 minutos a 4°C con 25µl de una mezcla del anticuerpo anti-2.4G2 (Mouse BD Fc Block™) y el compuesto 7-AAD (7-Amino-actinomicina D, Calbiochem) ambos disueltos a una proporción 1:100 en tampón de citometría. El anti-2.4G2 bloquea la unión inespecífica de inmunoglobulinas a los receptores FCyII, FCgIII y probablemente FCgI, y el 7-AAD es un agente fluorescente intercalante de DNA usado para exclusión de células muertas, ya que el compuesto no es permeable a la membrana plasmática de células vivas. Tras esta incubación, se lavaron las muestras con 1 ml de tampón de citometría y se incubaron con 50µl/tubo del anticuerpo CD4 conjugado con APC (**tabla 9**) a la concentración apropiada, o con el isotipo correspondiente. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C. A partir de este punto, durante todas las incubaciones las células se protegieron de la exposición a la luz. Tras este marcaje de superficie, las células se lavaron dos veces y se permeabilizaron mediante incubación con 0.75ml de la solución FIX/PERM (BD PharMingen), durante 30 minutos a 4°C. Para eliminar el exceso de esta solución, las células se lavaron con 1 ml de solución de lavado PERM WASH (BD PharMingen). Seguidamente se realizó el marcaje de citoquinas intracelulares. Para ello se incubaron las células con 50µl de una disolución de los anticuerpos anti-IFN-γ conjugado a FITC o a PE, anti-IL-17 conjugado a PE, o sus correspondientes isotipos, en solución FIX/PERM durante 30 minutos a 4°C (**tabla 9**). Tras dos lavados con solución PERM WASH, las células se resuspendieron en 0.5 ml de tampón de citometría. Para la determinación de Foxp3 intracelular se siguió este mismo protocolo hasta el marcaje de CD4. A partir de ahí se utilizaron las soluciones de fijación, permeabilización y lavado de eBioscience específicas para la detección de este factor. La adquisición y análisis de las muestras se realizó en el citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson), utilizando del programa Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

Tabla 9. Anticuerpos utilizados en citometría

Anticuerpos	Casa comercial	Catálogo	Concentración del Stock	Concentración de Uso
Anti-mouse IgG FOXP-3-PE	ebioscience	12577380	0.2 mg/ml	2 µg/ml
Anti-mouse IgG CD4 - APC	BD Pharmingen	553051	0.2 mg/ml	2 µg/ml
Anti-mouse IgG IFN-γ - FITC	BD Pharmingen	554411	0.5 mg/ml	5 µg/ml
Anti-mouse IgG IFN-γ - PE	BD Pharmingen	554412	0.2 mg/ml	2 µg/ml
Anti-mouse IgG IL-17 - PE	BD Pharmingen	554467	0.2 mg/ml	2 µg/ml
(Isotipo) IgG2a- PE	BD Pharmingen	553930	0.2 mg/ml	2 µg/ml
(Isotipo) IgG1 - FITC	BD Pharmingen	553953	0.5 mg/ml	5 µg/ml
(Isotipo) IgG2a- APC	Biolegend	402012	0.2 mg/ml	2 µg/ml

5.8.3 Determinación de proteínas mediante ELISA (del inglés, Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Para analizar la producción de citoquinas de las células inmunitarias procedentes de los ganglios linfáticos de los ratones sacrificados, se cultivaron 10^6 células (10^6 células/ml) en placas de 24 pocillos, a 37°C y 5% CO_2 . Estas células se incubaron en presencia o ausencia de $2,5\mu\text{g/ml}$ de ConA en RPMI completo durante 48 horas. Tras la incubación, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C para un posterior análisis de citoquinas mediante ELISA. En el modelo de MAE se realizó también una estimulación específica con $10\ \mu\text{M}$ de Myhc- $\alpha_{614-629}$, para ver la producción de citoquinas en respuesta al antígeno. También se estudió el efecto directo de CST y VIP sobre las células inmunitarias en el modelo de MAE al estimular *in vitro* células procedentes de los ganglios linfáticos mediastinales de ratones del grupo control con el antígeno de la miosina y con 10^{-7}M de CST o VIP.

Los niveles de citoquinas/quimioquinas en sobrenadantes de cultivos de ganglios linfáticos y de los explantes de la carótida se analizaron mediante ELISA. Para ello usamos anticuerpos de captura y de detección conjugados con biotina (BD Pharmingen o PeproTech), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante en cada caso. Se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunc, Maxisorb) recubiertas durante 18-24 horas a 4°C con $50\mu\text{l}$ del anticuerpo purificado (anticuerpo de captura) disuelto en sus respectivos tampones de unión con pH específicos (**tabla 10**). El tampón de pH9 está compuesto por 10ml de agua y 10ml de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\ 0.2\text{M}$. El tampón de pH6 está

compuesto por 10ml de agua, 8,77ml de NaH₂PO₄ 0.2M y 1,23ml de Na₂HPO₄ 0.2M. A continuación, se eliminó el exceso de anticuerpo no unido a la placa mediante dos lavados con 350µl de tampón de lavado (PBS con 0.1%, Tween-20 (Sigma)) y se bloquearon las uniones inespecíficas con 200µl de tampón de bloqueo (PBS con 10% SBF) durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras el período de bloqueo, se añadieron 100µl de las muestras o de diluciones seriadas de las citoquinas/quimioquinas recombinantes de concentración conocida (curva patrón) y se incubaron entre 18-24 horas a 4°C. La curva patrón se preparó diluyendo las respectivas proteínas recombinantes en solución de bloqueo, a las siguientes concentraciones: 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3, 0.15, 0.07, 0.03 ng/ml. Como blanco se utilizaron 100µl de la solución de bloqueo. Tras la incubación, se lavaron las placas cuatro veces para eliminar el exceso de muestras, y se añadieron 100µl del anticuerpo biotinilado específico de cada citoquina disuelto en solución de bloqueo (**tabla 11**). Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 hora e inmediatamente se lavaron seis veces para eliminar los restos de anticuerpo no unidos. Se añadieron 100µl del conjugado avidina-peroxidasa 2µg/ml (Sigma) disuelto en solución de bloqueo y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Tras ocho lavados para eliminar los residuos de avidina-peroxidasa, se añadieron 100µl de una solución de sustrato ABTS 0.1 M (Fluka) junto con 0.03% H₂O₂ (Sigma). Este sustrato cromogénico es oxidado por la peroxidasa, dando lugar a un producto de reacción de color verde que absorbe la luz en el espectro visible (405 nm), siendo la densidad óptica obtenida proporcional a la cantidad del producto medido. Los valores obtenidos de D.O. de cada muestra en un espectrofotómetro VersaMax de placa se interpolaron en la curva patrón para determinar la concentración de cada citoquina, utilizando el programa SoftMax Pro (Molecular Devices).

Tabla 10. Anticuerpos de captura para ELISA

Anticuerpos de captura	Casa comercial	Catálogo	Concentración del Stock	Concentración de uso	Tampón de unión
Anti-IL-2	BD bioscience	554424	0.5 mg/ml	2 µg/ml	pH9
Anti- IL-17	BD bioscience	14-7175	0.5 mg/ml	2 µg/ml	pH 6
Anti-TNFa	BD bioscience	551225	0.5 mg/ml	2 µg/ml	pH 6
Anti- IFN	BD bioscience	551309	0.5 mg/ml	2 µg/ml	pH9
Anti-MCP-1	PeproTech	500-P113	0.5 mg/ml	1 µg/ml	pH 6
Anti-IP-10	PeproTech	500-P129	0,5 mg/ml	1 µg/ml	pH9

Tabla 11. Anticuerpos biotinilados para ELISA

Anticuerpos biotinilados	Casa comercial	Catálogo	Concentración del Stock	Concentración de uso
Anti-IL-2	BD bioscience	554426	0.5 mg/ml	2 µg/ml
Anti- IL-17	Ebioscience	13-7177	0.5 mg/ml	2 µg/ml
Anti-TNF-α	BD bioscience	554415	0.5 mg/ml	2 µg/ml
Anti- IFN-γ	BD bioscience	551506	0.5 mg/ml	2 µg/ml
Anti-MCP-1	PeproTech	500-P113 Bt	0.5 mg/ml	2 µg/ml
Anti-IP-10	PeproTech	500-P129 Bt	0.5 mg/ml	2 µg/ml

5.8.4 Determinación en suero de la producción de inmunoglobulinas

La presencia de anticuerpos específicos anti-Myhc-α en el suero de ratones con MAE, se determinó por ELISA. Para llevar a cabo esta técnica, se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano Maxisorb (Nunc), que se tapizaron con 100µl de Myhc-α₆₁₄₋₆₂₉ (2µg/ml) disuelto en PBS durante 18-20 horas a 4°C. Posteriormente, los pocillos se lavaron tres veces con 350µl de tampón de lavado para ELISA y se bloquearon con 100µl de la solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, se añadieron 100µl de una dilución 1/50 del suero obtenido por punción cardíaca en el pico de la enfermedad de los distintos grupos experimentales, y se incubó la placa 2 horas a temperatura ambiente. Tras lavar cuatro veces, añadimos 100µl, (2.5µg/ml) de los anticuerpos biotinilados goat anti-mouse IgG1 o IgG2a (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Tras la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron las placas seis veces para eliminar los anticuerpos no unidos. El resto del procedimiento de detección fue idéntico al descrito anteriormente para la técnica de ELISA.

5.9 Preparación de células Th1.

El procedimiento fue previamente descrito por Alcaide y colaboradores (230). El aislamiento de la población de CD4⁺ se realizó a partir de las células de bazo de ratones C57BL/6. Para ello, se utilizaron las columnas magnéticas de Miltenyi Biotec. Las células se centrifugaron a 300g durante 10 minutos a 4°C y se resuspendieron en 500µl de tampón base (PBS pH 7.2 suplementado con 0.5% BSA (Sigma-Aldrich) y 2mM EDTA (Sigma-Aldrich)) con 40µl de bolas magnéticas anti-CD4 (Miltenyi Biotec 130-049-201), y se incubaron durante 20 minutos en hielo y en oscuridad. Se añadieron 10ml del tampón base para lavarlas y se centrifugaron a 300g 5 minutos a 4°C. A continuación se resuspendieron en 5 ml de tampón base y, tras filtrarlas con un filtro de 70µm (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA), se pasaron por la columna magnética LD (capacidad: 10⁸ células

marcadas magnéticamente de un total de 5×10^8 células). Las columnas LD se acoplaron a un separador magnético (Miltenyi Biotec) y se equilibraron con 2 ml de tampón base. Una vez pasada la suspensión celular por la columna, y tras dos lavados con tampón base, se recogieron las células eluidas (células T CD4⁺). Las células CD4⁺ aisladas se centrifugaron a 300g durante 10 minutos, y se resuspendieron en DMEM completo (Medio DMEM (*Dulbecco-modified Eagle Medium*, PAA) suplementado con suero bovino fetal (SBF) 10% (Gibco), penicilina (100 U/ml, Gibco), estreptomycin (100 µg/ml, Gibco), anfotericina B (0.25 µg/ml, Gibco), L-glutamina (2 mM, Gibco)). Las células se plaquearon en placas de 24 pocillos previamente incubadas con 300µl/pocillo de anti-CD3 (5µg/ml, BioLegend 100302) disuelto en PBS a 4°C durante al menos 1 hora. Se plaquearon 1×10^6 células/ml. Para la diferenciación se usó un coctel de citoquinas que queda detallado en la **tabla 12**.

Tabla 12. Citoquinas para la diferenciación a Th1

Citoquina	Th1	Casa comercial
Anti-CD28	5µg/ml	BD Pharmingen 553295
IL-2	50 U/ml	R&D Systems MAB702
Anti-IL-4	5µg/ml	BD Pharmingen 554434
IL-12	10 ng/ml	R&D Systems MAB4991

A día 3 las los cultivos de células Th1 se diluyeron con medio fresco que contenía IL-2 (25 U/ml) en una proporción 1:1. Las células se usaron a día 5 para los distintos experimentos. Para comprobar que la diferenciación hacia células Th1 ha sido correcta se hizo un marcaje intracelular de IFN γ .

Para los distintos experimentos usamos grupos controles y grupos de células que fueron diferenciadas en presencia de CST o VIP, a una concentración de 10^{-7} M. Los neuropéptidos se añadieron a día 0 y a día 3 en el momento de estimular los cultivos.

5.10 Aislamiento de aorta y ensayo de unión ex vivo.

Para este ensayo las aortas se aislaron de ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad, desde el arco aórtico hasta la bifurcación de las arterias ilíacas. El procedimiento fue previamente descrito por Smith y colaboradores y Maganto-Garcia y colaboradores (138, 231). Se abrieron longitudinalmente las aortas y se pincharon en placas de agar estéril. Una vez abiertas, la aortas se incubaron con 20ng/ml de IL-1 β (R&D Systems) y 100 ng/ml de TNF α (PeproTech) en medio

RPMI completo a 37°C durante 6 horas, para estimular la producción de moléculas de adhesión por las células endoteliales.

Las células Th1, que habían sido previamente diferenciadas, se tiñeron con Hoechst33342, y se incubaron durante 45 minutos a 37°C al 5% de CO₂ con las aortas previamente estimuladas. Para ver la unión basal se incubaron células diferenciadas en ausencia de neuropéptidos sobre aortas no estimuladas. Tras 45 minutos las células se lavaron con PBS y las aortas se escanearon en un microscopio "spinning disk" Olympus, usando un objetivo 10X y un laser para UV que va a detectar las células adheridas y/o transmigradas a través de la monocapa de células endoteliales. El análisis posterior se realizó usando el programa Methamorph tomando imágenes consecutivas de la aorta entera. Una vez deconvolucionadas las imágenes para eliminar el ruido se cuantificó en número total de células Th1 unidas o transmigradas en la aorta.

5.11 Unión de células Th1 a quimeras de P y E selectina bajo condiciones de flujo

Esta técnica se usó para ver de modo indirecto la unión diferencial de las células T a las células endoteliales, mediante su unión a quimeras de P-selectina y E-selectina (R&D System) (138, 230, 232). Las células Th1, obtenidas de las preparaciones de Th1, se pusieron en contacto con quimeras de P-selectina o E-selectina bajo condiciones de flujo (1 dyn/cm²). Las células se resuspendieron en PBS con 0.1% BSA (Albumina Sérica Bovina), 20 mM HEPES, pH 7.4 previamente calentado a 37°C (5x10⁵ células/ml) y se perfundieron sobre cubreobjetos previamente incubados con las quimeras (5µg/ml de quimera de P- o E-selectina, 16 horas). Se usó una cámara de flujo de Harvard Apparatus y las interacciones celulares con las quimeras se grabaron usando un microscopio con un objetivo de contraste de fase (20X) conectado al *software Videolab* (Ed Marcus Laboratories, Boston, MA). La acumulación celular se determinó contando el número de células que se unen al cubreobjetos, en cinco campos visuales diferentes, durante un total de un minuto.

5.12 Ensayo de trans migración celular

El experimento se realizó de acuerdo a lo publicado en el artículo de Lim y colaboradores (233). Las células endoteliales de corazón murinas (MHEC, del inglés, *mouse heart endothelial cells*), cuyo procedimiento para la obtención se detalla en el apartado posterior, se plaquearon hasta la confluencia en cubreobjetos de cristal de 25 mm cubiertos de 30µg/ml de fibronectina, y se estimularon con 100 ng/ml de TNF-α durante 4 horas. Tras la estimulación, las distintas subpoblaciones de células Th1 se pusieron en contacto con las MHEC bajo un flujo de 1 dyn/cm². De modo similar al ensayo de unión a las quimeras de P y E selectina, se grabó en un único campo la trans migración de las células T usando un

objetivo de 60X. En este caso una vez adheridas las células T a la monocapa de células endoteliales, comenzó a tomarse instantáneas cada 10 segundos durante 10 minutos, formando una película que muestra la transmigración de las células Th1.

5.13 Aislamiento y cultivo de Células Endoteliales de Corazón Murinas (MHEC).

En primer lugar, las bolas de oveja anti-rata-IgG (Dynal, 110.07) se incubaron con los anticuerpos monoclonales anti-PECAM-1 (BD Pharmingen, 553369) o con anti-ICAM-2 (BD Pharmingen, 553325) a una relación de 2.5 µg anticuerpo por cada 2×10^7 bolas durante 16 horas a 4°C, en un rotor orbital. Tras esto se resuspendieron en PBS con un 0.1% de BSA a una concentración de 4×10^8 bolas/ml y se almacenaron a 4°C hasta el momento de usarlas, durante un máximo de 2-3 semanas.

Los corazones se aislaron de 6-9 ratones C57BL/6 de entre 7 y 15 días, los cuales fueron sacrificados por inhalación de CO₂, y se lavaron con 50 ml de DMEM completo con un 20% de suero (DMEM-20%) para quitar los eritrocitos. Los corazones se trocearon en fragmentos de 1 mm³ y se incubaron con 15 ml de colagenasa a una concentración de 180 a 200U/ml (Worthington) durante 30 minutos en un baño a 37°C. Una vez digerido, el producto resultante se pasó por un filtro de 70µm (Becton Dickinson Labware) y se centrifugó a 400g, 10 minutos a 4°C. El precipitado celular se resuspendió en 2ml de PBS frío y se incubó con las bolas magnéticas recubiertas con PECAM-1 (4µl bolas/ratón) durante 10 minutos a temperatura ambiente en un rotor orbital. Tras esto, las bolas se aislaron con un separador magnético, se lavaron en DMEM-20% y finalmente se resuspendieron en 10ml de medio de cultivo completo (DMEM completo con un 20% de suero bovino fetal, suplementado con 100µg/ml de heparina de cerdo (Sigma), 100µg/ml de factores de crecimiento para células endoteliales (Biomedical Technologie, Stoughton), aminoácidos no esenciales (Gibco) y piruvato de sodio (Gibco)). Las células se plaquearon en una placa de 10 cm de diámetro a las que previamente se trató con gelatina al 0.1%. Tras dos días de incubación las células que no se adhirieron a la placa se retiraron y las adherentes se lavaron con DMEM-20%, añadiéndoles 10 ml de medio de cultivo fresco. Este procedimiento se repitió cada dos días hasta que las células llegaron a un 70-80% de confluencia.

Cuando las células adquirieron una confluencia del 70-80% se despegaron de la placa usando tripsina-versene previamente calentada (Biowhittaker, 17-161E), para generar una suspensión de células aisladas. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 2 ml de PBS al que se añadió las bolas magnéticas previamente recubiertas con ICAM-1 (8µl/ml de células). Se incubaron durante 10 minutos en un rotor a temperatura ambiente y se separaron magnéticamente. Tras lavar dos

veces con PBS se resuspendieron en 10 ml de medio de cultivo completo y se plaquearon en otra placa de 10 cm de diámetro previamente cubierta de gelatina.

Las células se expandieron hasta un máximo de 5 pases, una vez que llegaban a un 75-100% de confluencia. Cada dos días se les cambió el medio de cultivo.

5.14 Ensayo de unión THP-1/HUVEC.

Las HUVEC son una línea celular de células endoteliales de la vena umbilical (Lonza). Son células adherentes, que se cultivaron con el medio EGM-2 (Lonza) manteniéndolas entre un 40 y un 80% de la confluencia.

Las células THP-1 son una línea de monocitos humanos (ATCC). Son células en suspensión que se cultivaron a una densidad de entre 2×10^5 y 1×10^6 células/ml en medio RPMI completo.

2×10^4 HUVEC se cultivaron en pocillos de placas de 96 pocillos. Una vez adheridas y alcanzada la confluencia se estimularon o no durante 24 horas con $50 \mu\text{g/ml}$ de oxLDL (KALEN Biomedical, LLC) con distintas concentraciones de CST (10^{-6} , 10^{-8} o 10^{-10} M).

Las células THP-1 se incubaron durante 30 minutos con $10 \mu\text{M}$ de calceína (Sigma-Aldrich), complejo fluorescente que es transportado al interior celular a través de la membrana plasmática de las células. Tras este tiempo se lavaron con RPMI completo y se incubaron con las HUVEC, previamente estimuladas, durante 1 hora a 37°C . A continuación las células no adheridas se retiraron y se lavaron las adheridas tres veces con PBS eliminando los restos por inversión de la placa. Tras el último lavado se añadieron $200 \mu\text{l}$ por pocillo de PBS y se midió la fluorescencia emitida usando el filtro verde en un lector de fluorescencia (Infinite 200 PRO series, Tecan). El número de células THP-1 unidas a las HUVEC es proporcional a la cantidad de fluorescencia emitida, y se representa como % de células unidas con respecto al control de células HUVEC sin estimular.

5.15 Ensayo de expresión de moléculas de adhesión en HUVEC mediante RNA.

Para estudiar la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales se cultivaron 5×10^5 HUVEC, en placas de 6 pocillos. Una vez adheridas y alcanzada la confluencia se estimularon o no durante 24 horas con $50 \mu\text{g/ml}$ de oxLDL y con 10^{-8} M CST en $1,5 \text{ ml}$ de medio EGM-2. Tras esto se retiró el medio y se lavó con 1 ml de PBS antes de pasar a aislar el ARN, según el protocolo detallado a continuación.

5.15.1 Aislamiento del ARN

El aislamiento del ARN se realizó utilizando el reactivo Tripure (Roche), según las indicaciones del fabricante. 1 ml de Tripure se añadió directamente a los pocillos de las placas tras 24 horas de tratamiento. Tras el lisado de las células, éstas se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se les añadieron 200 µl de cloroformo por muestra, se agitaron vigorosamente, y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, los tubos se centrifugaron a 12000g durante 15 minutos a 4°C, consiguiéndose así la separación de 3 fases: una fase inferior rojiza (cloroformo y proteínas), una interfase (ADN) y una fase superior acuosa e incolora (ARN), que es la que se recogió. Para la precipitación del ARN se añadió 500µl de isopropanol, se incubaron las muestras durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugaron a 12000g durante 15 minutos a 4°C. El ARN precipitado se lavó una vez con etanol 70% para eliminar los restos de isopropanol y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado de ARN se resuspendió en agua libre de nucleasas (Invitrogen) y las muestras se almacenaron a -80°C hasta su cuantificación y uso. La cuantificación se realizó utilizando el espectofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

5.15.2 Transcripción inversa (RT)

La transcripción inversa consiste en la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN. Para llevar a cabo esta reacción, utilizamos el Kit *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas), que utiliza la enzima transcriptasa inversa M-MuLV y pequeños cebadores de seis nucleótidos (*Randon Hexamer Primers*, RHP). Para cada reacción utilizamos 1 µg de ARN, siguiendo las indicaciones del fabricante. El producto final de la reacción (20µl) se diluyó cuatro veces mediante la adición de 80µl de agua libre de nucleasas y se guardó a -20°C hasta su análisis posterior.

5.15.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real.

Esta reacción permite la amplificación enzimática *in vitro* de un segmento específico de ADN o ADNc. Se basa en la incorporación de una sonda, en este caso SYBER-Green, que se intercala en la doble cadena del ADN emitiendo fluorescencia tras su estimulación (absorción de 497nm y emisión a 520nm). La emisión de fluorescencia se recoge por el sistema detector del equipo en cada ciclo de la PCR, y es proporcional a la cantidad de AND sintetizado (234). El ciclo de PCR en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina Ciclo Umbral o *cycle threshold value* (C_t) y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de ADN de la muestra. Por lo tanto, comparando los C_t de las distintas muestras a ensayar, se puede calcular el incremento de la expresión génica de una determinada muestra con respecto a una condición control.

Para llevar a cabo las reacciones usamos el kit de *Applied Biosystems StepOne Plus* (BIO-RAD). Por cada reacción, que contiene un volumen total de 25 µl, usamos 2 µl de cada producto de ADNc procedente de la RT. La reacción se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante. Todas las muestras se normalizaron con respecto al gen 18S. La PCR se realizó en el termociclador *iCycler Detection System* (Bio-Rad Laboratories, Hercules; California). El perfil térmico fue el siguiente: 5 minutos a 94°C para una desnaturalización inicial de la doble cadena del ADN; etapa de amplificación, de 42 ciclos: 1) desnaturalización (94°C, 30 segundos), 2) hibridación de los cebadores a las regiones adecuadas del ADN (60°C, 30 segundos), 3) extensión (72°C durante 15 segundos); bajada de la temperatura a 4°C. La secuencia de los cebadores se especifica en la siguiente **tabla 13**.

Tabla 13. Secuencia de los cebadores para PCR

Genes	Secuencia de los cebadores
	5' - 3' - sense
	5' - 3' - antisense
ICAM-1	5'- AGCCAAGAGGAAGGAGCAAG -3'
	5'- GCATACCCAATAGGCAGCAA -3'
VCAM-1	5'- AAAGGCCAGTTGAAGGATG -3'
	5'- GCACGAGAAGCTCAGGAGAA -3'
P-SELECTINA	5'- TGCATTAGTTGGACCGGAAG -3'
	5'- AAAAGCAGTGAGCGGATGAA -3'
E-SELECTINA	5'- TGGGTAGGAACCCAGAAACC -3'
	5'- TCTCCACGCAGTCCTCATCT -3'
18-S	5'- CCCATTCGAACGTCTGCCCTATC -3'
	5'- TGCTGCCTTCCTTGGATGTGGTA -3'

La cuantificación relativa de la expresión génica se determinó usando el método comparativo previamente descrito de las C_t (235, 236).

Así el N° de veces de inducción es $= 2^{-\Delta\Delta C_t}$, donde $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t_{\text{muestra problema}} - \Delta C_t_{\text{muestra control}}$ para un determinado gen de interés. En nuestro caso $\Delta C_t_{\text{muestra problema}}$ es el valor de C_t de la muestra o gen problema, normalizado según la expresión del gen 18S y $\Delta C_t_{\text{muestra control}}$ es el valor C_t de la muestra control sin tratar para ese mismo gen normalizado de acuerdo a la expresión del gen 18S.

5.16 Aislamiento de células mesenquimales de ratón (MSC).

Para la obtención de células mesenquimales de ratón se utilizaron ratones C57BL/6, a los cuales se les retiró el tejido adiposo inguinal. El tejido adiposo se lavó con HBSS (PAA). Tras lavarlo, se cortó en fragmentos de 1-3 mm³ y se incubó con 2.5 ml de 2mg/ml de Collagenasa I (Sigma) por cada gramo de tejido, a 37°C durante 30 minutos, agitándolo cada 5 minutos. Pasado este tiempo se añadieron 10ml de HBBS, y el volumen total se filtró a través de un filtro de 100 µm y se centrifugó a 300g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez centrifugado la fase superior se descartó y el sedimento se filtró de nuevo usando un filtro de 40µm. Tras volver a centrifugar las células se resuspendieron en medio MesenCult (medio MesenCult (Stem Cell) suplementado con un 20% de suplemento para la estimulación de células mesenquimales de ratón (Stem Cell) y con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina). Las células se cultivaron a una densidad de 15000-30000 células/cm² expandiéndolas al alcanzar el 80-90% de la confluencia.

Las células mesenquimales trasducidas con vectores lentivirales fueron suministradas por el laboratorio del Dr. Francisco Martín. El método de obtención fue descrito por Cobo y colaboradores (237). Resumidamente indicar que, para la construcción de los vectores se usaron tres plásmidos, el plásmido de empaquetamiento, el pCMVΔR8.91, que codifica para los genes *gag*, *pol*, *tat* y *rev* del HIV, el plásmido pMD.G, que codifica la glicoproteína vesicular del virus de la estomatitis G (VSVg), y el plásmido vector que codifica para VIP, LentiVIP, o para GFP (usado para control de la trasducción), cuya expresión está bajo un promotor fuerte como es el CMVTet0. Los vectores lentivirales se produjeron por co-transfección de los tres plásmidos en la línea celular de riñón 293T, usando Lipofectamina 2000. Los sobrenadantes, que poseen las partículas virales, se recogieron y filtraron a través de un filtro de 0.45 µm e inmediatamente fueron congelados a -80°C hasta su uso para trasducir las MSCs. Las partículas de los vectores se concentraron por ultracentrifugación y el título de los vectores se realizó teniendo en cuenta el número de células GFP⁺ tras 7 días de la trasducción de las MSCs, o bien lisando las células trasducidas con LentiVIP y cuantificando mediante PCR a tiempo real. Para la trasducción de las MSC con LentiVIP se usó un MOI de entre 2 y 5. Las células se expandieron hasta que obtuvieron un 80-90% de confluencia.

5.17 Macrófagos derivados de médula ósea (BM-MØ)

Para diferenciar los BM-MØ se aisló la médula ósea del fémur y la tibia de las patas de un ratón C57BL/6. Para ello, una vez retirado el músculo completamente, se limpiaron las tibias y los fémures introduciéndolos en etanol al 70% durante 4 minutos, tras lo cual se pasaron a DMEM completo. Con una hoja de bisturí se

cortaron los extremos de los huesos y con una aguja de 25G se inyectó 5 ml de DMEM completo por el interior de los huesos, con la finalidad de obtener la médula ósea. Este proceso se realizó sobre un filtro de 40µm para recolectar el contenido celular, el cual se centrifugó a 300g durante 8 minutos a 4°C, y tras ser lavado, se resuspendió en DMEM completo con un 20% de SBF suplementado con 20 ng/ml de M-CSF (R&D System). Las células se plaquearon a una densidad de 1×10^6 células/ml, 10 ml, en placas de 10 cm de diámetro. A día 3 se les añadió 5ml de DMEM con un 20% de SBF y con 20 ng/ml de M-CSF. A día 6-8 se utilizaron las células en los distintos experimentos de salida de colesterol, estudio de la expresión proteica de mediadores relacionados con el flujo de colesterol en el macrófago, o análisis de formación de células espumosas. Para ello lavamos las placas con PBS y las células adherentes se levantaron utilizando PBS con 2nM de EDTA (Sigma). Tras lavar las células con DMEM al 10% de SBF, las plaqueamos a una densidad de 10^6 células/ml para los distintos experimentos.

5.18 Acumulación de gotas lipídicas y formación de células espumosas.

Los BM-MØ se trataron con oxLDL para ver la formación de células espumosas y el efecto que CST o VIP pudieran tener en la formación de las mismas. 5×10^5 BM-MØ se cultivaron en DMEM al 10% de SBF sobre cubreobjetos de cristal (Thermo Scientific) previamente esterilizados con etanol absoluto. Una vez adheridas al cristal, se cambió el medio por DMEM al 5% de SBF y se dejó en este medio toda la noche. Tras esto se hizo un pretratamiento en DMEM al 2% de SBF durante 30 minutos seguido de el tratamiento en el mismo medio suplementado con 50 µg/ml de oxLDL y con o sin 10^{-7} M de cortistatina o VIP durante 24 horas. Pasado el tiempo establecido las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras lavarse con agua las muestras se tiñeron durante 15 minutos con una dilución 3:2 en agua del stock de Oil Red O. El stock de Oil Red O (Sigma-Aldrich) es una solución al 0,25% de este compuesto en isopropanol. Una vez teñidas las células se lavaron varias veces hasta eliminar el exceso de colorante con agua, y los núcleos se contrastan con hematoxilina de Mayer durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras teñir los núcleos las células se lavaron de nuevo y se montaron con glicerol al 70%.

Las imágenes fueron registradas utilizando un microscopio Zeiss AXIO y una cámara AxioCam ICc1, y la cuantificación de las mismas se hizo manualmente con el programa ImageJ, utilizando una escala que va del 0 al 4 y que tiene en cuenta el número de gránulos y el tamaño de los mismos (**Tabla 14**).

Tabla 14. Cuantificación de células espumosas.

Tipo	Descripción
0	Ausencia de gránulos
1	Presencia de 1-4 gránulos de pequeño tamaño
2	Presencia de citoplasma rosado con algunos gránulos
3	Gránulos en más del 50% del citoplasma con algunas zonas libres
4	100% del citoplasma con gránulos lipídicos de gran tamaño: células espumosas

5.19 Ensayo de salida de colesterol.

Para estudiar si el tratamiento con los péptidos afectaba al flujo de colesterol en el macrófago realizamos un ensayo de salida de colesterol del mismo.

Plaquamos 10^5 BM-MØ por pocillo en placas de 96 pocillos. Tras ser adheridos, cambiamos el medio a DMEM con un 5% de SBF y los dejamos toda la noche. Seguidamente cambiamos el medio por medio DMEM completo sin SBF y con 0.2% de BSA libre de ácidos grasos (Sigma-Aldrich) e incubamos durante 10 horas. A continuación, los BM-MØ se estimularon con oxLDL (50 µg/ml), 0.5µCi/ml [³H]-colesterol (PerkinElmer), y con o sin 10^{-7} M de cortistatina o VIP, en DMEM-0,2% de BSA durante 10 horas. Tras este tiempo las células se lavaron dos veces con DMEM-0,2% BSA y se incubaron con DMEM-0,2% BSA con 10 µg/ml de ApoAI (Sigma) con o sin 10^{-7} M de cortistatina o VIP. Tras 2, 4, 6, 8 o 10 horas de incubación, 20 µl del medio se añadieron a 1ml de líquido de centelleo (National Diagnostics) y se midió la radioactividad del colesterol que se ha liberado al medio. Tras eliminar los restos de líquido añadimos 0.5 ml de 0.1 N de NaOH para lisar las células y las incubamos durante 5 horas a temperatura ambiente. Transferimos 20µl de esta lisis a 1ml de líquido de centelleo y medimos la radioactividad. Cada muestra se determinó por triplicado. Como control positivo se estimularon las células, cada vez que se usaron los neuropéptidos, con forskolina (FSK) a una concentración de 10^{-5} M, un activador de la adenilato ciclasa que aumenta la producción de cAMP en la célula. El porcentaje de eflujo de colesterol se determinó dividiendo la radioactividad encontrada en el sobrenadante celular entre la suma de la misma con la radioactividad presente en el lisado celular (% eflujo = Radioactividad sobrenadante / (Radioactividad sobrenadante + radioactividad lisado celular)).

5.20 Análisis de la expresión proteica.

Para determinar si el tratamiento con cortistatina o VIP media en la expresión de proteínas relacionadas con el flujo de colesterol en el macrófago, se analizó la expresión de los transportadores de membrana ABCA-1 y CD36, y del factor de transcripción PPAR- γ .

5.20.1 Obtención de extractos proteicos.

1 x 10⁶ de BM-MØ en placas de 6 pocillos se estimularon con o sin 50 μ g/ml de oxLDL y 10⁻⁷M de cortistatina o VIP durante 24 h en DMEM con un 2% de SBF. Después de los tratamientos aspiramos el medio de cultivo y lavamos las células en monocapa dos veces con PBS estéril. Para la obtención de los extractos proteicos lisamos las células con tampón de lisis (50mM tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Tritón Tx-100, 1% ácido desoxicólico, 0.1% SDS y 10 μ g/ml de un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigam-Aldrich)). Añadimos 250 μ l de tampón de lisis por pocillo, homogenizamos con un raspador, y recogimos el lisado, el cual se incubó durante 15 minutos a 4°C en un agitador orbital. A continuación, centrifugamos las muestras a 14000g durante 15 minutos a 4°C y los sobrenadantes se guardaron a -20°C hasta su uso.

5.20.2 Cuantificación de extractos proteicos.

Los extractos proteicos fueron cuantificados mediante Bradford, que es un procedimiento analítico espectroscópico que se usa para medir la concentración de proteínas en una solución, de modo que el colorante usado, el azul brillante coomassie, interacciona con las proteínas. Para cuantificar la cantidad de proteínas utilizamos una curva patrón con BSA. El análisis se realizó con el programa SoftMax Pro (Molecular Devices).

5.20.3 Analisis de la expresión proteica por Western Blot.

Una vez cuantificadas, 20 μ g de proteínas, junto con tampón de carga 6X (375mM TRIS-HCl pH 6.8, 12% SDS, 10% Glicerol, 30% β -mercaptoetanol, 0.1%Azul de Bromofenol, H₂O MiliQ), se resolvieron en geles del 7.5% de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, en cubetas de electroforesis vertical Biorad. Las cubetas estaban llenas de tampón de corrida (0.024M TRIS-HCl, 0,2M Glicina, 2% SDS, pH8,8).

El gel de poliacrilamida al 7,5% posee dos partes, la de empaquetamiento y la de separación. La de empaquetamiento se compone (para 5 ml) de: 1.25ml de buffer 0,5M TRIS-HCL pH 6.8, 50 μ l de 10% SDS, 0.7ml de 30% (29:1) acrilamida/bisacrilamida (Bio-Rad), 35 μ l de 10% persulfato amónico (APS), 5 μ l de TEMED y 3 ml de H₂O destilada. 5 ml de la parte de separación se componen de: 1.25ml de 0,5M buffer tris pH 8.8, 50 μ l de 10% SDS, 1.25ml de 30% (29:1)

acrilamida/bisacrilamida (Bio-Rad), 35µl de 10% APS, 5µl de TEMED y 2.4ml de H₂O destilada.

Resueltos los geles, se transfirieron a membranas de PVDF (Biorad, Berkeley, CA) para lo cual se usó un sistemas de transferencia semiseca y un tampón de transferencia (1M TRIS-HCl, 0.04 M Glicina, 5% Metanol y 0.1% SDS). Las membranas se bloquearon con una solución al 5% de leche desnatada en PBS-*tween20* (PBS con 1% de *tween20*) durante una hora. Posteriormente se incubaron durante toda la noche en agitación a 4°C, con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 15**). Los anticuerpos primarios se utilizaron disueltos en PBS 0,1% *tween20* con un 1% de leche desnatada. A continuación se lavaron las membranas tres veces con PBS-*tween20* durante 10 minutos cada lavado, y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-rabbit unido a Peroxidasa, en proporción 1:5000 en PBS-*tween20* al 1% de leche desnatada durante 90 minutos. Finalmente lavamos las membranas tres veces con PBS-*tween20*.

Tabla 15. Anticuerpos utilizados en Western Blot.

Anticuerpo	Concentración	Casa Comercial
Rabbit anti-ABCA-1	1/1000	Novus Biologicals, NB400-105SS
Rabbit anti CD36	1/1000	Novus Biologicals, NB400-144SS
Rabbit anti PPARγ	1/500	Cell Signaling, 2443
Rabbit anti-GAPDH	1/5000	R&D System, 2275
Goat anti-rabbit IgG HRP	1/5000	Dako, 12040703

Las bandas se visualizaron utilizando el reactivo de revelado ECL-PLUS (*Amersham Biosciences*), el sistema de imagen digital *ChemiDoc XRS System* (Biorad), y películas fotográficas médicas AGFA. Para localizar el tamaño de la banda se usó un marcador de peso molecular conocido, el Precision Plus Protein™ Unstained Standards (Biorad).

La expresión de las distintas proteínas se representa como % de expresión en unidades de densitometría relativas a la expresión de GAPDH de la misma muestra y en la misma membrana.

5.21 Ensayo de proliferación de hAoSMC.

Las hAoSMC son una línea de células humanas de músculo liso aórticas (hAoSMC, Lonza), utilizadas para ver el efecto de cortistatina o de VIP en la proliferación y migración de las mismas en respuesta a PDGF.

Para el ensayo de proliferación de las células musculares se cultivaron 10^4 hAoSMC/pocillo en placas de 96 pocillos en medio SmGM-2 (*Smooth Muscle Growth Medium-2*, Lonza, suplementado con un 5% de SBF) durante 12 horas. Tras ésto se cultivaron durante 24 horas en medio SmGM (*Smooth Muscle Growth Medium*, Lonza,) con 10 ng/ml de PDGF en presencia o ausencia de cortistatina o VIP a distintas concentraciones (10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} o 10^{-12} M). Durante las últimas 12 horas de cultivo se añadió 1 μ Ci/pocillo de timidina tritiada ([3 H]-metil-Tdr, Amersham). La incorporación de timidina tritiada se determinó como se explicó anteriormente. Los resultados se expresan como porcentaje de proliferación con respecto a las células control tratadas con PDGF.

5.22 Ensayo de migración de hAoSMC.

Una vez conseguida una suspensión celular de hAoSMC, 10^4 células/pocillo se colocaron en la parte superior de una cámara de migración de 48 pocillos junto con cortistatina o VIP a distintas concentraciones (10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} o 10^{-12} M). Separando la parte superior de la inferior de la cámara pusimos un filtro de policarbonato con poros de 8 μ m de tamaño (NeuroProbe, Gaithersburg, MD), la cual incubamos previamente con 100 μ g/ml de colágeno tipo I y 10 μ g/ml de vitronectina, para crear una superficie similar a la matriz extracelular. En la cámara inferior pusimos 10 ng/ml del quimioatrayente PDGF. Durante 6 horas incubamos la cámara a 37°C y 5% de CO₂. Pasado este tiempo retiramos el filtro, lo lavamos con PBS y retiramos las células que no habían migrado con un raspador. La parte inferior de la membrana se fijó durante 5 minutos con metanol frío, y las células se tiñeron con DAPI (del inglés *4',6-diamidino-2-phenylindole*). Tras ésto se determinó el número de células migradas utilizando un microscopio de fluorescencia.

5.23 Análisis estadístico

Los resultados se han expresado como los valores de la media \pm error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó teniendo en cuenta el tipo de muestra. Para ello primero se analizó si los valores seguían una distribución normal mediante el uso de los test de normalidad Shapiro-Wilk y D'Agostino y Pearson. Si los valores muestrales según una distribución normal se aplicó el test *t*-Student para comparar entre dos grupos. Si los valores no seguían una distribución normal se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney. Por último, para variables discretas el test estadístico aplicado fue el test de Kruskal-Wallis.

*Uso de neuropéptidos anti-inflamatorios en enfermedades cardiovasculares:
Aterosclerosis y miocarditis autoinmune.*

Un valor de $p < 0.05$ refleja que las diferencias obtenidas son estadísticamente significativas. El análisis estadístico ha sido llevado a cabo de forma informatizada con la versión 5.0 del programa GraphPad.

6 RESULTADOS

6.1 Estudio del efecto de cortistatina y VIP en un modelo de miocarditis autoinmune experimental (MAE).

En este primer apartado de resultados estudiaremos el efecto terapéutico del tratamiento con cortistatina o con VIP en un modelo de MAE. Como parámetros a analizar estudiaremos rasgos macroscópicos (relación peso del corazón/peso corporal) y microscópicos (infiltración celular en el miocardio). Finalmente realizaremos un estudio completo de la respuesta inmunitaria a nivel local (tamaño y caracterización del infiltrado cardiaco), y periférico (ganglios linfáticos mediastinales).

6.1.1 Efecto de VIP y cortistatina en la incidencia y severidad en un modelo de MAE.

Para desarrollar el modelo de MAE utilizamos ratones BALB/c que inyectamos con Myhc- $\alpha_{614-629}$ tal y como se especifica en materiales y métodos. La inoculación de Myhc- $\alpha_{614-629}$ junto con CFA va a generar una respuesta autoinmune frente a la miosina cardiaca en una fase temprana, seguida de una respuesta inflamatoria en una fase más tardía. Como consecuencia de esta respuesta, en aquellos ratones en los que se establezca la enfermedad va a aumentar la infiltración de células inmunitarias en el miocardio, con la consiguiente degeneración de los cardiomiocitos. El ventrículo izquierdo responde aumentando su tamaño para mantener la función sistólica del mismo, por lo que se va a producir un aumento en el tamaño del corazón en los ratones afectados con miocarditis. Aunque nuestro objetivo era estudiar la fase aguda de la enfermedad, en el momento en el que tomamos las muestras ya puede observarse un aumento en el peso del corazón de los ratones enfermos, aunque este aumento será mayor en la fase crónica de la enfermedad.

Por tanto, en primer lugar determinamos la relación existente entre el peso del corazón y el peso corporal de los distintos grupos de ratones a los que se les indujo MAE. En la **figura 24A** observamos, a nivel macroscópico, que hay un aumento en el tamaño del corazón en los ratones a los que se les ha inducido MAE y que han sido tratados con PBS (grupo MAE), en relación al tamaño del corazón de ratones Balb/c naive de la misma edad. Además de presentar un tamaño mayor, los ratones con MAE poseen extensas áreas con fibrosis pericárdica. Sin embargo, los corazones de los ratones con MAE tratados tanto con VIP como con CST, presentan un aspecto muy similar al de los ratones naive (**Figura 24A**), sin presencia de zonas fibróticas. Numéricamente observamos que la relación entre el peso corazón/peso corporal de los ratones del grupo MAE control tienen un valor medio de $(6,64 \pm 0,15)$ significativamente mayor al encontrado en los ratones tratados con cortistatina $(5,31 \pm 0,15)$ o VIP $(5,69 \pm 0,20)$ (**Figura 24B**). Igualmente, la incidencia de la enfermedad desciende desde un 75% (en ratones MAE control) a un 11% y 25% en ratones tratados con CST o con VIP, respectivamente (**Figura 24C**).

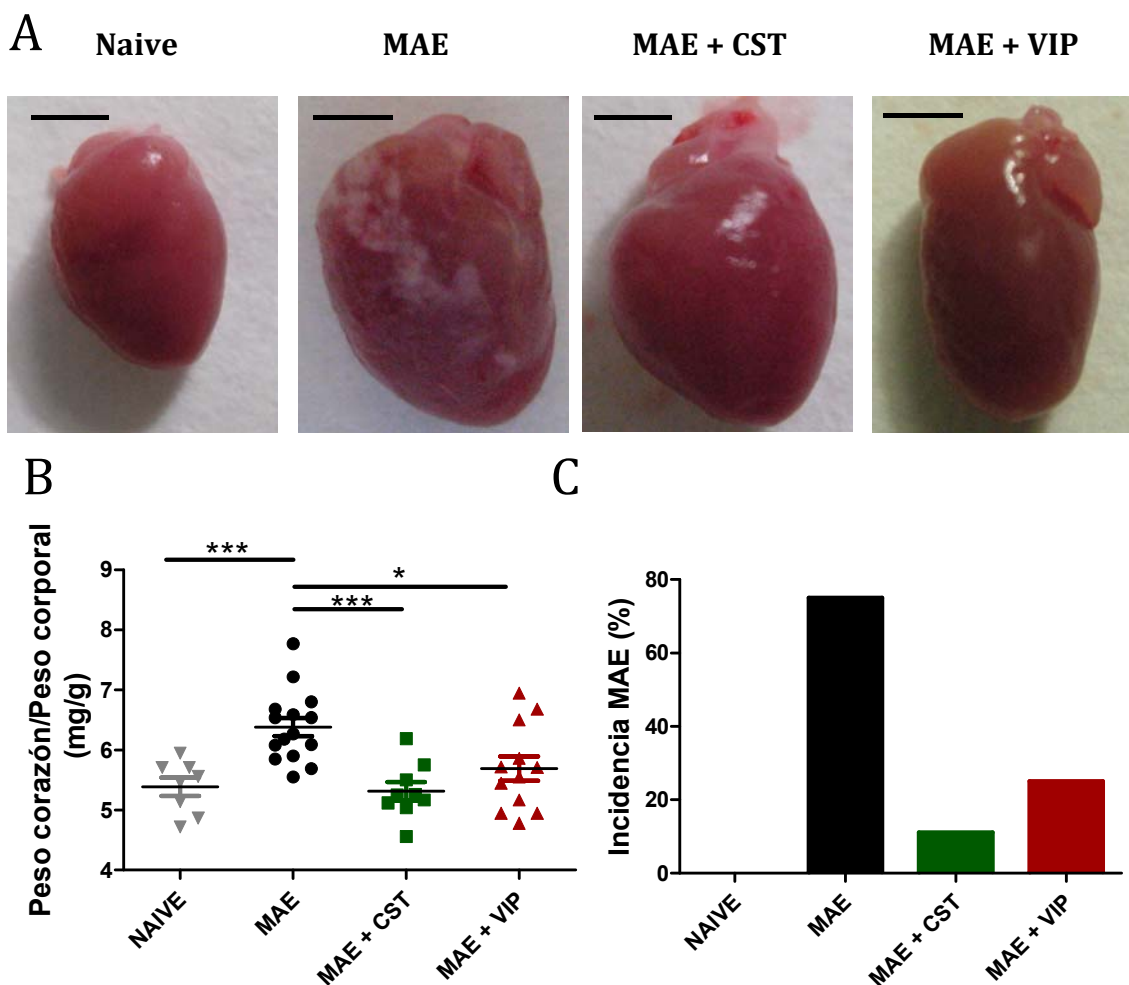


Figura 24. Efecto terapéutico de cortistatina y VIP en MAE. Ratones BALB/C naive o inmunizados con Myhc- $\alpha_{614-629}$, a día 0 y 7, y tratados con PBS, CST o VIP tres veces en semana, desde el día 7 al 21. Muestras tomadas a día 21. **A.** Imágenes representativas del corazón de un ratón de cada grupo de estudio. La barra de escala representa 2 mm. **B.** Cociente entre el peso del corazón de cada ratón y su peso corporal. La línea negra de cada grupo representa la media de la población. Cada punto corresponde a un ratón. **C.** Incidencia de la enfermedad en los distintos grupos. Se considera que un ratón está enfermo cuando el valor del cociente entre el peso del corazón y el peso corporal del mismo es superior al valor mayor de esta relación en un ratón naive. N=1 o 2 experimentos con 7-8 ratones por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. CST=Cortistatina

Tras este análisis macroscópico determinamos el grado de infiltración celular en el corazón mediante histología con una tinción de H-E en secciones obtenidas de la mitad inferior del corazón (zona de corte señalada en la **Figura 25A**). Observamos que en los corazones de los ratones del grupo MAE, hay una mayor presencia de infiltrados celulares que en los ratones tratados con cortistatina o VIP, tanto a nivel de la periferia del corazón (**Figura 25B-D**), como en la zona central del mismo (**Figura 25E-G**).

En función del grado de infiltración del corazón se realiza una clasificación de la severidad de la enfermedad en grados que comprenden del 0 al 4, según el criterio establecido en materiales y métodos. Aplicando estos parámetros

analizamos la severidad de la infiltración en los corazones de los distintos grupos, y pudimos comprobar que, efectivamente, tanto el tratamiento con cortistatina como el tratamiento con VIP disminuyen el grado de infiltración cardiaca de forma significativa en el modelo de MAE. En los ratones con MAE sin tratar se detecta la presencia de infiltrados en 23/25 ratones, con un valor histológico medio de $2,76 \pm 0,23$, mientras que en el caso de los ratones tratados con cortistatina sólo hay infiltración en 3/9 con un valor medio de $0,44 \pm 0,24$, y en los tratados con VIP la presencia de infiltrados se detecta en 9/23 ratones con un grado de infiltración de $0,56 \pm 0,18$ (**Figura 25H**).

Mediante inmunofluorescencia analizamos la naturaleza del infiltrado, comprobando que se trata de células inflamatorias de origen hematopoyético CD45⁺ (**Figura 26**). Además, al teñir cortes seriados con H-E y con anti-CD45 comprobamos que existe una linealidad entre el grado de infiltración celular visto con H-E y la presencia de células CD45⁺, demostrando que estos infiltrados tienen un origen leucocitario, tal y como se muestra en otros trabajos (238).

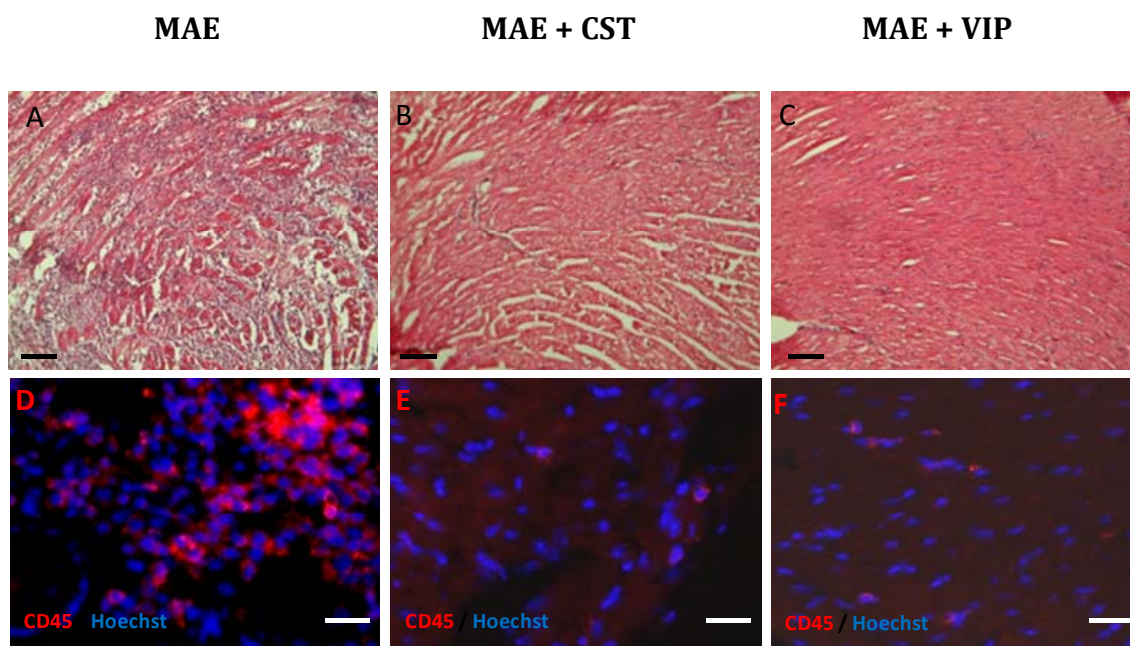


Figura 26. Caracterización del infiltrado celular en MAE. Inducción de MAE según lo especificado en la figura 1. Tinción de cortes seriados del corazón de ratones de los distintos grupos teñidos con H-E (A-C) o marcados con anti-CD45 mediante inmunofluorescencia (D-F). Las escalas señalan corresponden a 50µm. Imágenes representativas de un experimento. CST=Coritstatina

6.1.2 Efecto del tratamiento con cortistatina o VIP en la respuesta inflamatoria y autorreactiva en ganglios linfáticos en MAE.

Puesto que la MAE es una enfermedad autoinmune e inflamatoria, quisimos estudiar el efecto del tratamiento con CST o VIP en la respuesta inmunitaria en dicha enfermedad. Para ello aislamos los ganglios linfáticos mediastinales de los ratones de los distintos grupos de estudio y analizamos el número y perfil de células T presentes en los mismos, así como la respuesta proliferativa y el patrón de citoquinas que producían específicamente en respuesta a Myhc- $\alpha_{614-629}$.

En primer lugar observamos, que el tratamiento con CST o VIP de ratones con MAE no afectaba al número de células totales presentes en los ganglios linfáticos drenantes en comparación con el número de células encontradas en ratones del grupo control o naive (**Figura 27**).

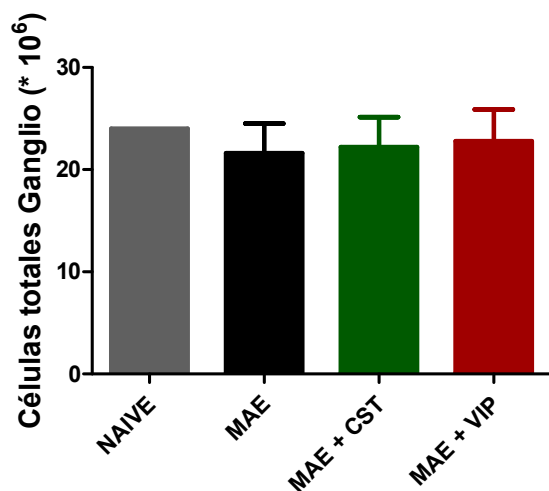


Figura 27. Número de células en ganglios mediastinales en ratones con MAE. Toma de muestras a día 21 tras la inducción de MAE. N=5 ratones por grupo, representativo de 3 experimentos. Naive N=1. CST=Coritstatina

A continuación analizamos la composición en los distintos subtipos de células T CD4⁺ presentes en los ganglios linfáticos. Para ello se midió la expresión de marcadores intracelulares dentro de las células CD4⁺ mediante citometría de flujo. Así, para ver la proporción de células Th1 se midió la expresión de IFN- γ dentro de las CD4⁺, y para ver la proporción de células Th17 se midió la expresión de IL17 dentro de este mismo subtipo celular. En la **figura 28** se muestra como el tratamiento con CORTISTATINA o VIP de los ratones con MAE no ejerce un cambio en el porcentaje de células IFN- γ ⁺ CD4⁺ (**Figura 28A**), mientras que el porcentaje de células CD4⁺ IL17⁺ disminuye de un modo significativo con respecto a la proporción de este tipo celular en el grupo de los ratones MAE (**Figura 28B**).

Como ya hemos indicado en la introducción, las células Th17 constituyen una subpoblación de células CD4⁺ que está tomando cada vez más importancia en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias y autoinmune. El hecho de que el tratamiento con los péptidos haga que dicha subpoblación celular esté disminuida en los ganglios linfáticos, es indicativo de que la respuesta inmunitaria local tiene un perfil menos inflamatorio en comparación con los ratones MAE sin tratamiento.

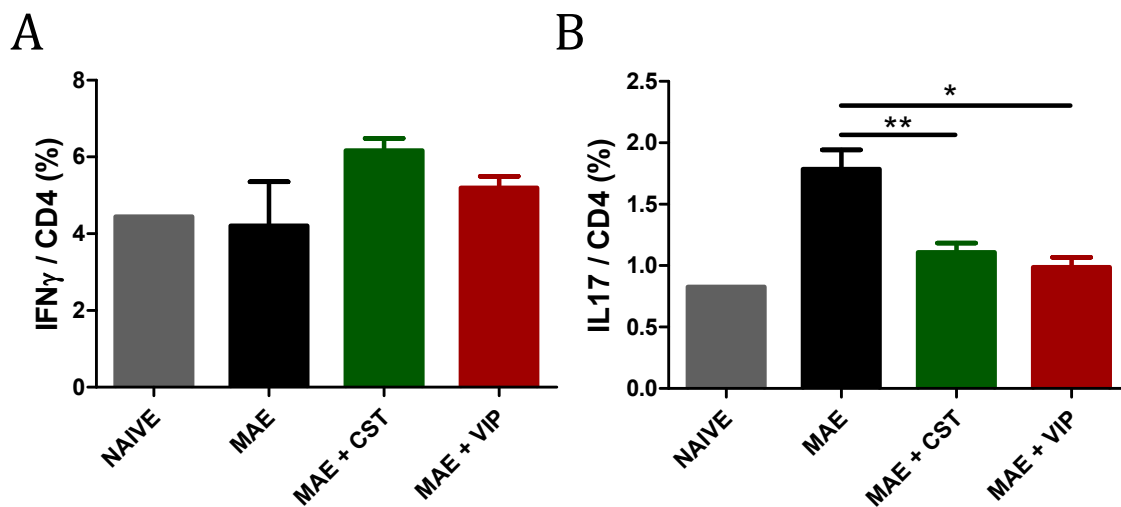


Figura 28. Efecto de cortistatina y VIP sobre el porcentaje de células Th1 y Th17 en los ganglios linfáticos locales en el modelo de MAE. La enfermedad se indujo según lo expuesto en la figura 1. Las células se estimularon con PMA/ionomicina/monensina durante 12 horas. Análisis de la expresión de IFN γ (A) e IL17 (B) dentro de la población de células CD4⁺ mediante citometría de flujo. N=5. Representativo de 3 experimentos. Naive N=1. *p<0,05; ** p<0,01. CST=Cortistatina.

Las células Treg son una población celular fundamental en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica, presentando un papel clave en el desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes. Puesto que VIP y cortistatina generan células Treg *in vivo* en algunos modelos animales de inflamación y autoinmunidad, en este trabajo hemos analizado el efecto que tienen ambos neuropéptidos sobre este tipo celular a nivel de ganglios linfáticos mediastinales de ratones con MAE. El tratamiento con VIP no produce ningún efecto sobre el porcentaje de células Foxp3⁺ dentro de la población de CD4⁺ con respecto a los ratones MAE, mientras que el tratamiento con cortistatina reduce ligeramente este porcentaje (Figura 29).

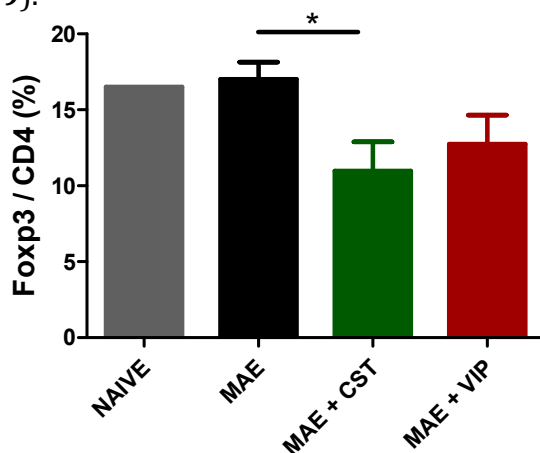


Figura 29. Efecto del tratamiento con CST o VIP en el porcentaje de células Treg en ganglios linfáticos. La enfermedad se indujo según lo expuesto en la figura 1. Marcaje intracelular de Foxp3 dentro de las células CD4⁺ medido por citometría de flujo. N=5 (MAE, CST, VIP). Naive N=1. Representativo de 3 experimentos. *p<0,05. CST=Cortistatina.

Tras analizar la población de células Th1, Th17 y Treg en los ganglios linfáticos mediastinales, pasamos a estudiar el patrón de citoquinas producidas en ausencia o presencia de estímulos, tanto específicos (Myhc- $\alpha_{614-629}$) como inespecíficos (ConA). El patrón de citoquinas/quimioquinas liberadas es indicativo del estado de inflamación que hay en los ganglios linfáticos y, por consiguiente, del grado de enfermedad del ratón. En la **figura 30** observamos que la estimulación de las células con Myhc- $\alpha_{614-629}$ o con ConA provoca un aumento en la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, como son IFN- γ (**Figura 30A**), IL17 (**Figura 30B**), o la quimioquina IP10 (**Figura 30D**). También provocan un aumento en la producción de citoquina IL-2 (indicativo del grado de activación celular) (**Figura 30C**). El tratamiento de los ratones con cortistatina o VIP favorece que no se produzca este aumento cuando se estimulan las células con Myhc- $\alpha_{614-629}$. Este dato señala el papel de cortistatina y VIP *in vivo* en la desensibilización de células autorreactivas. Cuando la estimulación es inespecífica con ConA, no se observa un descenso en la producción de estos mediadores inflamatorios por parte de las células procedentes de los ratones tratados con cortistatina o VIP en relación a la producción por parte de las células procedentes de ratones del grupo MAE (**figura 30**). Este dato indica que el efecto de estos péptidos cursa con una inhibición parcial de la respuesta específica de antígeno, sin afectar la capacidad de activación policlonal de las células T del animal tratado.

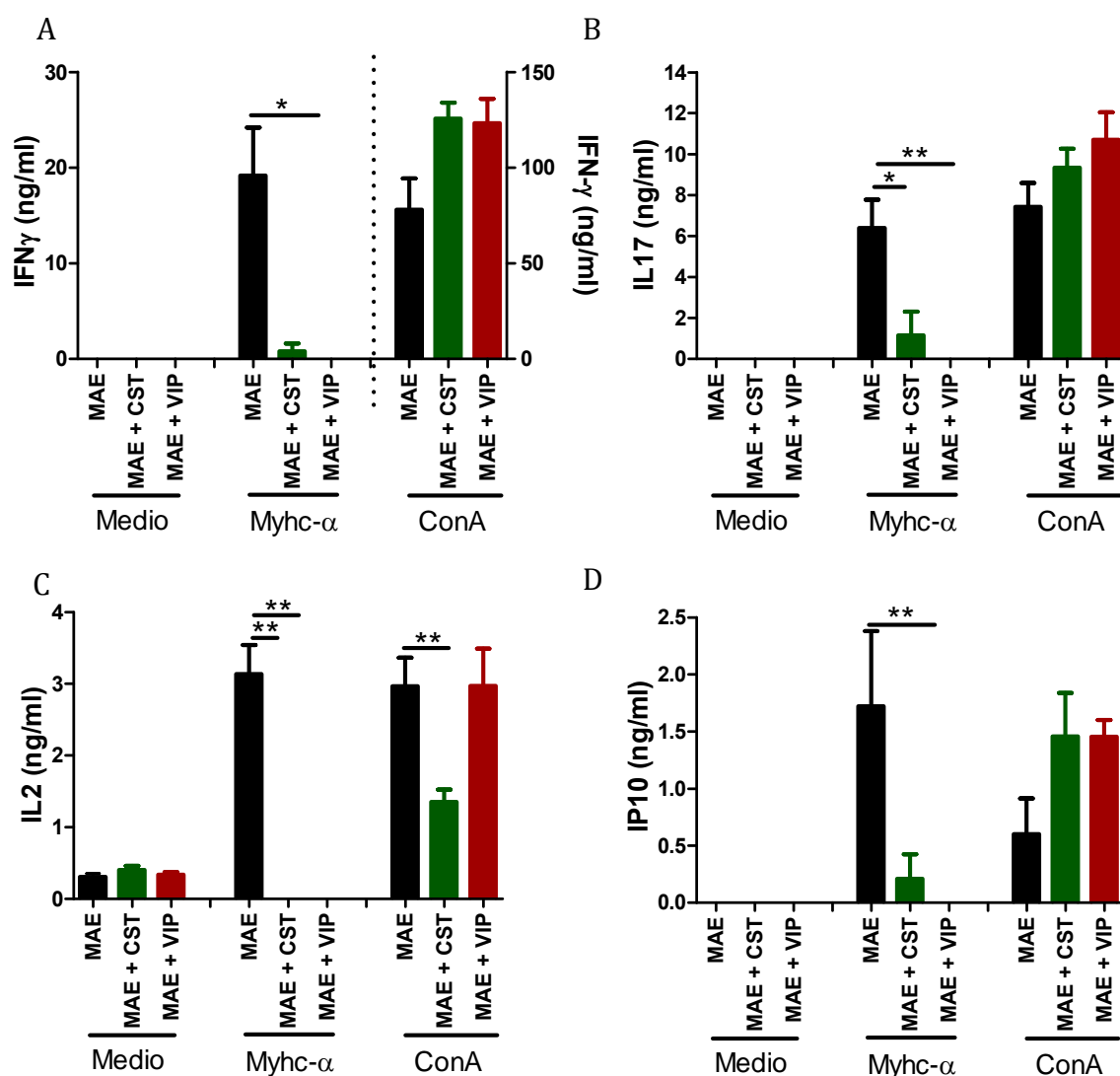


Figura 30. Cortistatina y VIP reducen la respuesta autorreactiva en ratones con MAE. Análisis de la producción de citoquinas y quimioquinas mediante ELISA por células procedentes de ganglios linfáticos mediastinales en ratones con MAE tratados o no con CST o VIP. Efecto de la estimulación con medio, Myhc- $\alpha_{614-629}$, o con ConA durante 48 horas. Producción de IFN γ (A), IL17 (B), IL-2 (C) e IP10 (D). En el caso de IFN γ el eje de la izquierda refleja los valores de producción tras la estimulación con medio y miosina y el de la derecha la producción tras estimular con ConA. N=5 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. CST=Cortistatina.

A continuación quisimos analizar si las diferencias observadas en la producción de citoquinas y quimioquinas en los ganglios linfáticos en los ratones tratados con cortistatina o VIP, se debía a un cambio en la capacidad proliferativa de las células de dichos ganglios. Los resultados muestran que las células aisladas de los ganglios de ratones con MAE proliferan de forma específica en respuesta a

Myhc- $\alpha_{614-629}$, reflejo de una respuesta cardiomiogénica, mientras que las células aisladas de los ratones con MAE tratados con cortistatina o con VIP tienen disminuida la capacidad auto-reactiva frente a dicho antígeno, mostrando niveles similares a los encontrados en los ratones naive (**Figura 31**). De modo similar a lo que ocurre en la producción de citoquinas, en el caso de una estimulación inespecífica no vemos diferencias significativas en la proliferación celular *in vitro* entre los distintos grupos (**Figura 31B**), de nuevo sugiriendo que el tratamiento con los péptidos no inmunodeprime de modo general al animal tratado, sino que actúa generando un equilibrio inmunológico de modo antígeno-específico.

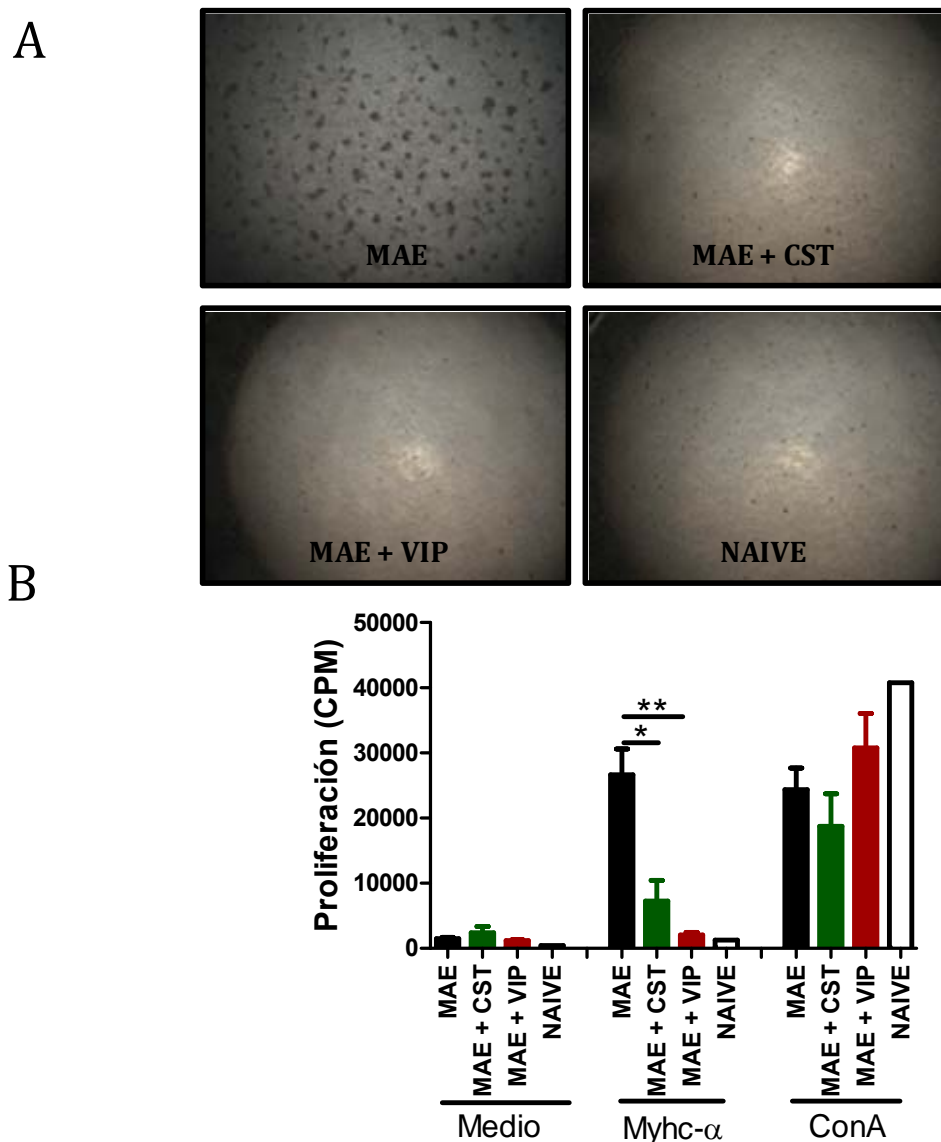


Figura 31. Cortistatina y VIP inhiben de forma antígeno-específica la proliferación celular en un modelo de MAE. Estudio de la proliferación celular de células de ganglios mediastinales en MAE, en presencia de medio, Myhc- $\alpha_{614-629}$ o ConA durante 72 horas. **A.** Clones de diferenciación resultado de la proliferación linfocitaria frente Myhc- $\alpha_{614-629}$ en los distintos grupos. **B.** Incorporación de timidina tritiada representada como cuentas por minuto (CPM). N=5 (MAE, CST, VIP), N=1 (Naive). ** p<0,01, *** p<0,001. CST=Cortistatina.

Tras ver que existe una menor activación de células T inflamatorias en los ganglios de los ratones tratados con cortistatina o VIP, quisimos comprobar si el efecto de estos péptidos era directo sobre estas poblaciones celulares, o si por el contrario, estos péptidos están generando una respuesta a otro nivel que favorece la inhibición de este tipo celular. Para ello aislamos células de los ganglios linfáticos de ratones con MAE, las cuales tienen la capacidad de responder frente al antígeno de la miosina produciendo mediadores pro-inflamatorios y proliferando (**Figura 30-31**) y los estimulamos *in Vitro* en ausencia o presencia de CST o VIP. El tratamiento con los péptidos *in vitro* inhibe la producción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias (**Figura 32**) y la proliferación (**Figura 33**) en respuesta a Myhc- $\alpha_{614-629}$.

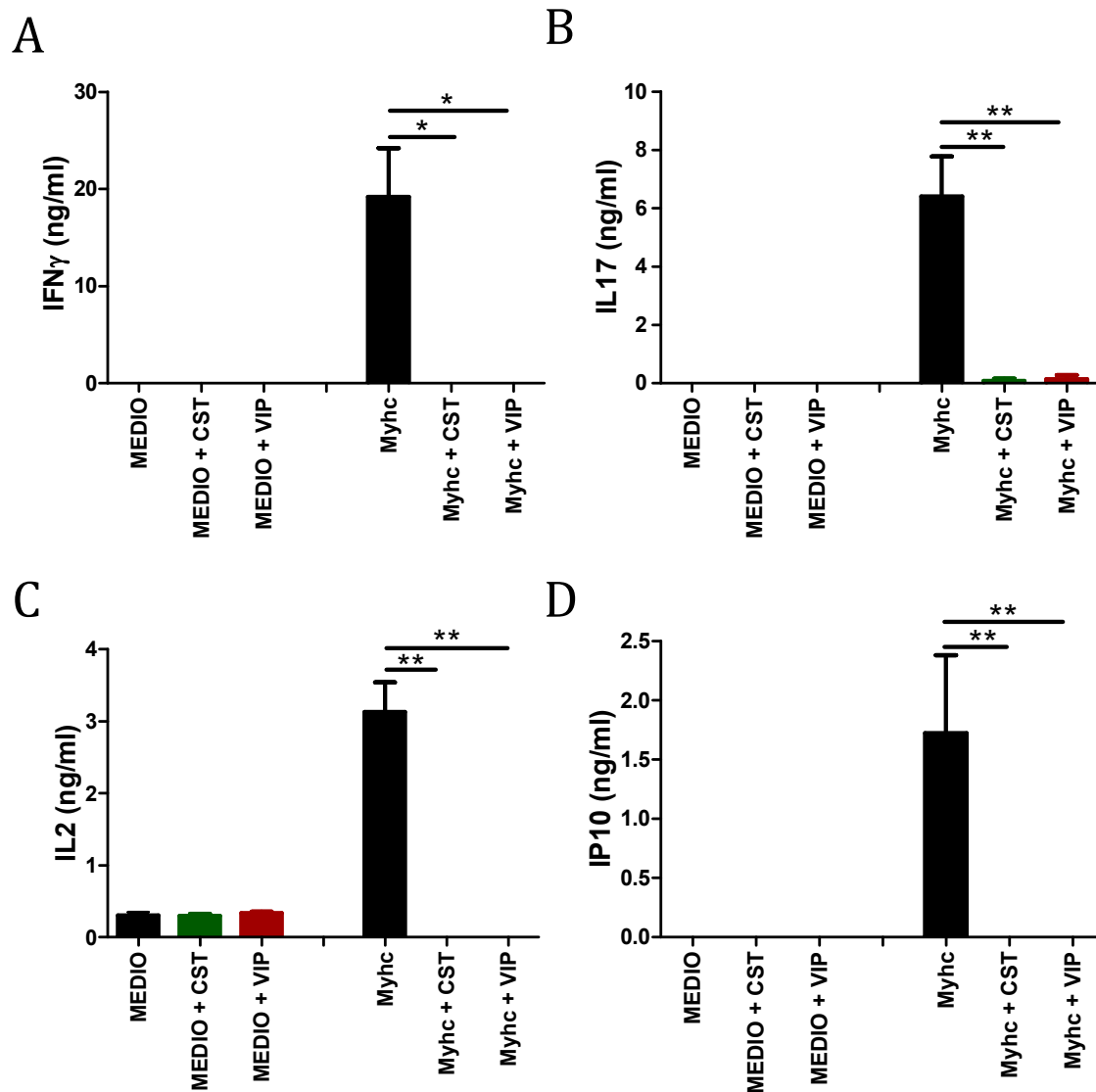


Figura 32. Cortistatina y VIP inhiben de forma antígeno-específica la producción de citoquinas y quimioquinas *in vitro*. Células provenientes de ganglios linfáticos de ratones con MAE se estimularon con medio o Myhc- $\alpha_{614-629}$ en presencia o ausencia de CST (MEDIO+CST o Myhc+CST) o VIP (MEDIO+VIP o Myhc+VIP) durante 48 horas. Mediante ELISA se analizó la producción de IFN γ (A), IL17 (B), IL-2 (C) e IP10 (D). N=5. *p<0,05, ** p<0,01. CST=Cortistatina.

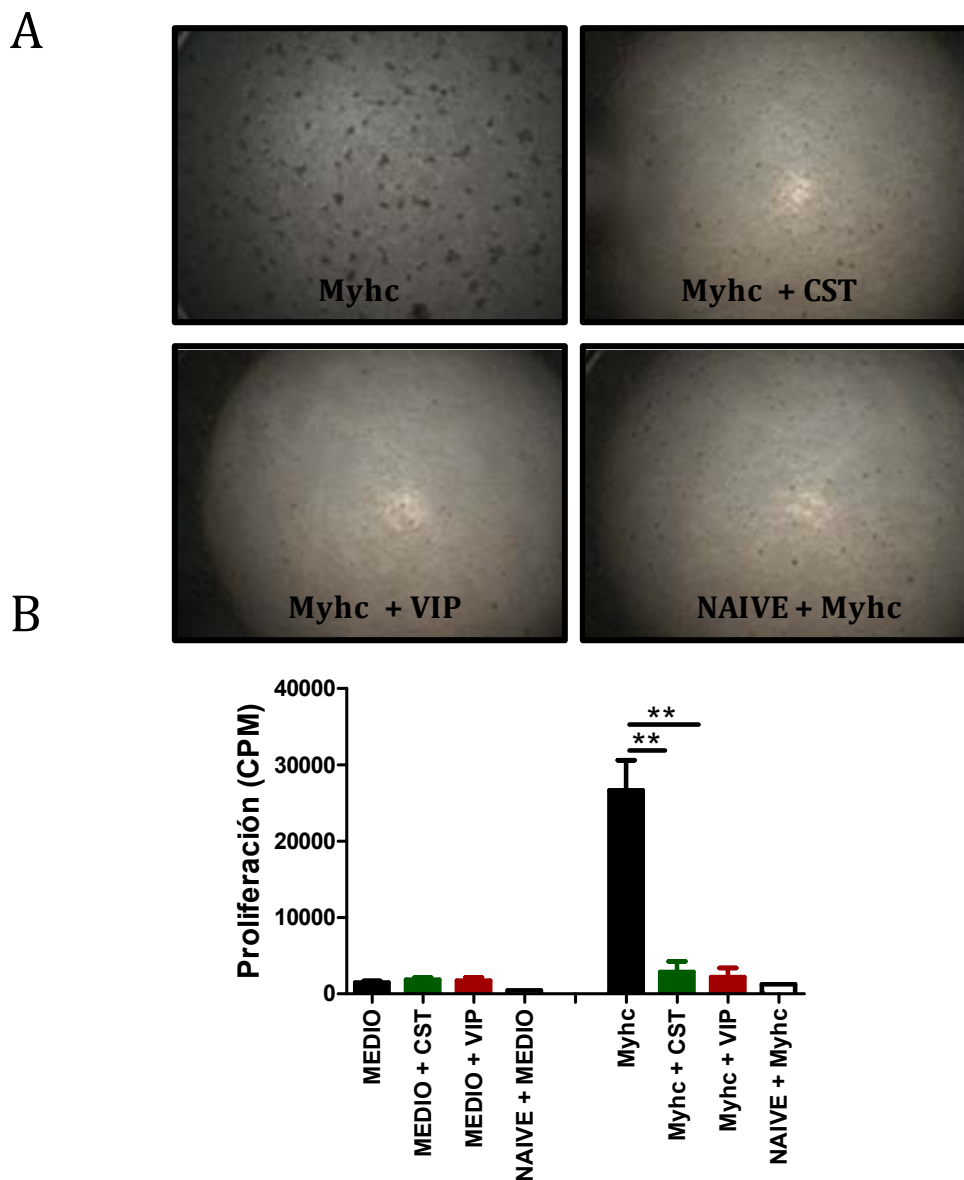


Figura 33. Cortistatina y VIP inhiben de forma antígeno-específica la proliferación celular in vitro. Células provenientes de ganglios linfáticos de ratones con MAE se estimularon con medio o Myh- $\alpha_{614-629}$ en presencia o ausencia de CST (MEDIO+CST o Myhc+CST) o VIP (MEDIO+VIP o Myhc+VIP) durante 72 horas. Células del ratón naivo se estimularon con medio o Myhc- $\alpha_{614-629}$. **A.** Focos de proliferación frente al antígeno de la miosina. **B.** La incorporación de timidina tritiada representada como cuentas por minuto (CPM). N=5 o 1 (Naive). ** p<0,01. CST=Cortistatina.

6.1.3 El tratamiento con CST o VIP reduce la presencia de autoanticuerpos en MAE.

Los niveles de autoanticuerpos circulantes contra antígenos cardíacos están elevados en pacientes con miocarditis autoinmune (239). La presencia de los mismos es indicativa del daño al corazón que se está generando. La **figura 34** refleja como la inducción de la enfermedad supone un aumento en la producción de IgG frente a Myhc- α en el suero, en comparación con los niveles encontrados en los ratones del grupo naive (**Figura 34A**). Por su parte, en los ratones que han sido tratados con cortistatina o con VIP hay una reducción en los niveles de IgG total (**Figura 34A**), así como de IgG1 (**Figura 34B**), e IgG2a (**Figura 34C**).

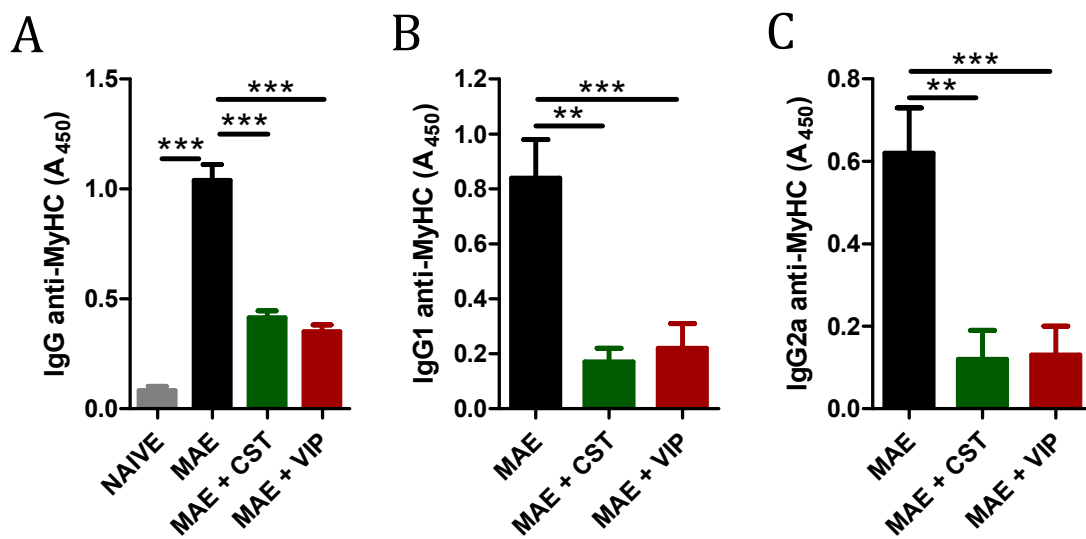


Figura 34. El tratamiento con CST y VIP reduce el número de anticuerpos específicos contra Myhc- α en MAE. La enfermedad se indujo como se muestra en la figura 1. Tras 21 días se obtuvo el suero de los ratones y se determinaron los niveles de IgG total (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) específicos para Myhc- α mediante ELISA. N=6 - 16 ratones por grupo. **p<0,01 ***p<0,001. CST=Cortistatina.

Estos resultados demuestran que tanto CST como VIP tienen un papel en la desactivación de los clones autorreactivos en los órganos linfoides secundarios. Además, de modo indirecto vemos que CST y VIP impiden la activación de células Th1 (median la producción de IgG2a) y Th2 (median la producción de IgG1).

Resumen

Cortistatina y VIP tienen un efecto terapéutico en el modelo de MAE. Este efecto se observa tanto macroscópicamente (**Figura 24**) como microscópicamente (**Figura 25**). Dicho efecto se debe, al menos en parte, a que tanto cortistatina como VIP son capaces de modular la respuesta inmunitaria en esta enfermedad. Así, a nivel de los ganglios linfáticos mediastinales, observamos una disminución en la producción de células Th17 (**Figura28**). También hay un descenso en la producción de IL17, citoquinas tipo Th1 (IFN- γ e IL-2) y en la proliferación celular,

de modo antígeno-específico, en las células provenientes de los ratones tratados con cortistatina o VIP (**Figuras 30-31**). Esta inactivación es por una acción directa de cortistatina y VIP sobre células del sistema inmunitario (**Figura 32-33**). Por otro lado, cortistatina y VIP tienen un efecto inhibitorio en la producción de auto-anticuerpos frente a la miosina cardiaca (**Figura 34**). Queda demostrado por tanto, la capacidad de cortistatina y VIP para regular la respuesta inmunitaria en un modelo de ECV como la miocarditis autoinmune.

6.2 Estudio del efecto de CST y VIP en aterosclerosis.

6.2.1 Análisis del papel de CST y VIP en un modelo de aterosclerosis aguda.

El modelo de ligación parcial de la carótida es un modelo de aterosclerosis agudo, donde se potencian los factores necesarios para la formación de placas ateroscleróticas, como son: fondo genético (ratones ApoE^{-/-}); nivel de colesterol en sangre (dieta tipo occidental); y velocidad del flujo sanguíneo en una zona concreta (ligación de la carótida izquierda), favoreciendo así la retención y transmigración de células inmunitarias y del LDL desde la luz del vaso a la capa íntima de la arteria. Este modelo permite estudiar la respuesta inmunitaria en aterosclerosis, debido a que es un modelo que acelera la generación de placas ateroscleróticas. Para determinar si CST o VIP tienen algún efecto en este modelo analizamos su influencia sobre la formación de placas ateroscleróticas en la carótida, así como el papel que ejercen en la respuesta inmunitaria que acompaña a esta enfermedad.

6.2.1.1 El tratamiento con CST o VIP inhibe la formación de placas ateroscleróticas en un modelo aterosclerosis agudo.

Una vez desarrollada la enfermedad, se analizó la formación de placas ateroscleróticas en la carótida en ratones tratados con PBS (grupo control), cortistatina o VIP. Para ello teñimos con Oil Red O secciones transversales a la luz del vaso de la carótida ligada y sin ligar. En la **Figura 35A** se muestra como en los ratones tratados con cortistatina o VIP hay una inhibición en la formación de placas ateroscleróticas con respecto a los ratones del grupo control. La cuantificación de las lesiones indica que en los ratones del grupo control el 100% de los ratones desarrollan placas, las cuales ocupan una media de 79,0±6,5% de la luz del vaso, mientras que en los ratones tratados con cortistatina el porcentaje de ratones afectados desciende a un 14% con lesiones que ocupan un 12,1±12,1% de la luz del vaso. Por su parte, en los ratones tratados con VIP la incidencia de la enfermedad desciende a un 14%, y el valor promedio de la luz del vaso ocupada por lesión es de un 11,5±11,5% (**Figura 35B**). Como esperábamos, el desarrollo de lesiones se produjo a nivel local en la zona de ligación, sin verse afectada la carótida contralateral no ligada (**Figura 35A**).

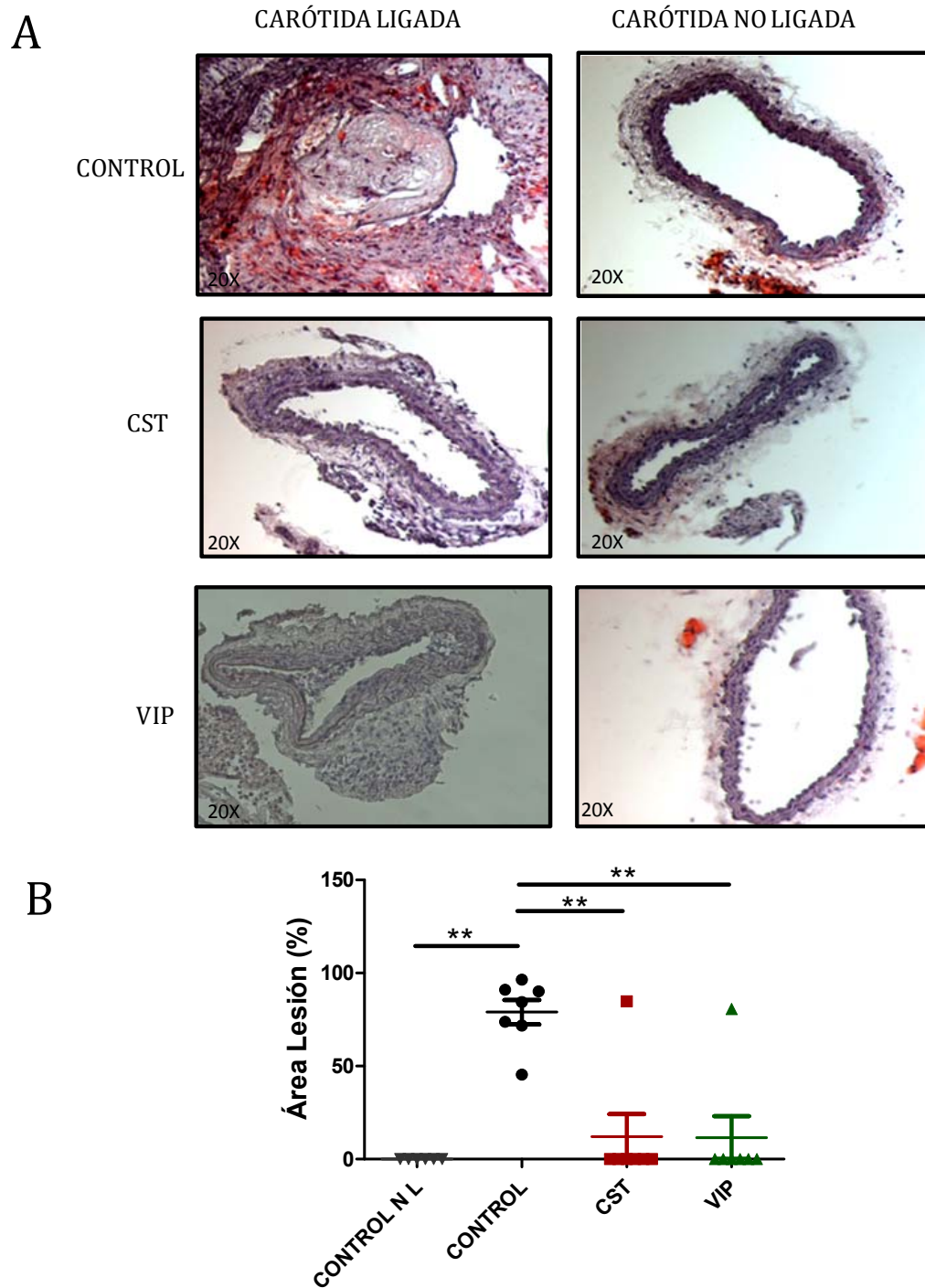


Figura 35. Cortistatina y VIP inhiben la formación de placas ateroscleróticas en el modelo de aterosclerosis agudo. A ratones apoE^{-/-} se les ligó parcialmente la carótida izquierda, se alimentaron con una dieta aterogénica y se trataron durante 21 días con PBS (control), CST o VIP. Al final del tratamiento se aisló la carótida izquierda (ligada) y la derecha (no ligada). **A.** Análisis de la formación de placas ateroscleróticas tras tinción con Oil Red O. **B.** Cuantificación de la formación de lesiones, representada como porcentaje de luz del vaso ocupada por placas ateroscleróticas. Control NL=Carótida no ligada del grupo control. N=7. *** p<0,001. CST=Cortistatina.

6.2.1.2 Caracterización de las placas ateroscleróticas.

Para estudiar la composición de las placas ateroscleróticas analizamos la expresión en la placa de CD45 (antígeno común de leucocitos), CD68 (marcador de macrófagos) y sma (marcador de la actina de músculo liso) mediante inmunofluorescencia (**Figura 36**). Como resultado de esta caracterización comprobamos que la composición celular de las placas ateroscleróticas en el modelo de ligación parcial de la carótida se corresponde con la presente en placas ateroscleróticas de un modelo crónico de aterosclerosis.

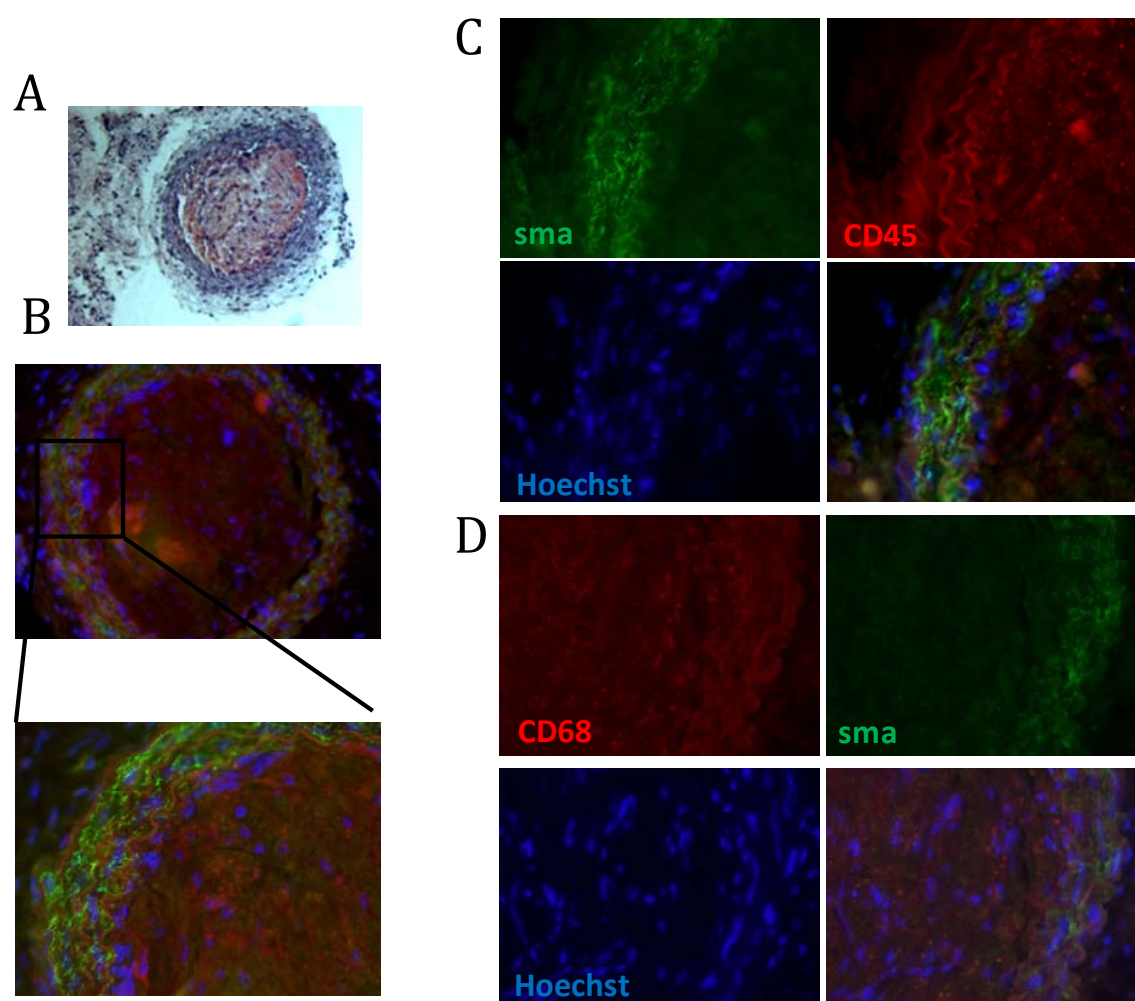


Figura 36. Caracterización de las placas ateroscleróticas en un modelo de aterosclerosis agudo. A. Tinción con Oil Red O de una placa aterosclerótica. **B.** Detalle de la región donde se toma la imagen. Alexa-488: sma (verde). Alexa-546: CD45 (rojo). **C.** Inmunofluorescencias de sma y CD45. **D.** Inmunofluorescencia de sma y CD68. La barra de escala representa 20µm.

6.2.1.3 Estudio del efecto de CST y VIP en la respuesta inmunológica en un modelo de ligación parcial de carótida.

Tanto CST como VIP son capaces de regular la respuesta inmunitaria en una ECV como es la miocarditis autoinmune. Quisimos estudiar si en un modelo de aterosclerosis agudo estos péptidos tenían un efecto similar. Para ello determinamos la producción de mediadores inflamatorios a nivel local (carótida) y a nivel de los ganglios linfáticos que drenan la región cercana a la carótida. A nivel de ganglios linfáticos estudiamos también la proliferación celular y la composición de células T CD4⁺ presentes en dichos ganglios. En primer lugar, tras cultivar la carótida *ex-vivo*, vimos que hay un aumento en la producción de IL17 (**Figura 37A**), IFN- γ (**Figura 37B**), IL2 (**Figura 37C**) y TNF- α (**Figura 37D**) en la carótida ligada de ratones control con respecto a la carótida contralateral no ligada. En segundo lugar, comprobamos que el tratamiento con CST y con VIP inhibe la producción de IL17 (**Figura 37A**) y de IFN- γ (**Figura 37B**) en las carótidas ligadas de los ratones tratados con respecto a las del grupo control. En el caso de la acción sobre la producción de IL-2 (**Figura 37C**) y TNF- α (**Figura 37D**) se puede observar un descenso en la producción de estas citoquinas, aunque dicho descenso no llega a tener diferencias estadísticamente significativas. De estos resultados deducimos que el tratamiento con cortistatina o con VIP en ratones con aterosclerosis aguda reduce la respuesta inflamatoria a nivel de lesión. Este descenso puede ser consecuencia de una menor infiltración de células inmunológicas y/o a un cambio en el perfil inflamatorio de las células infiltradas.

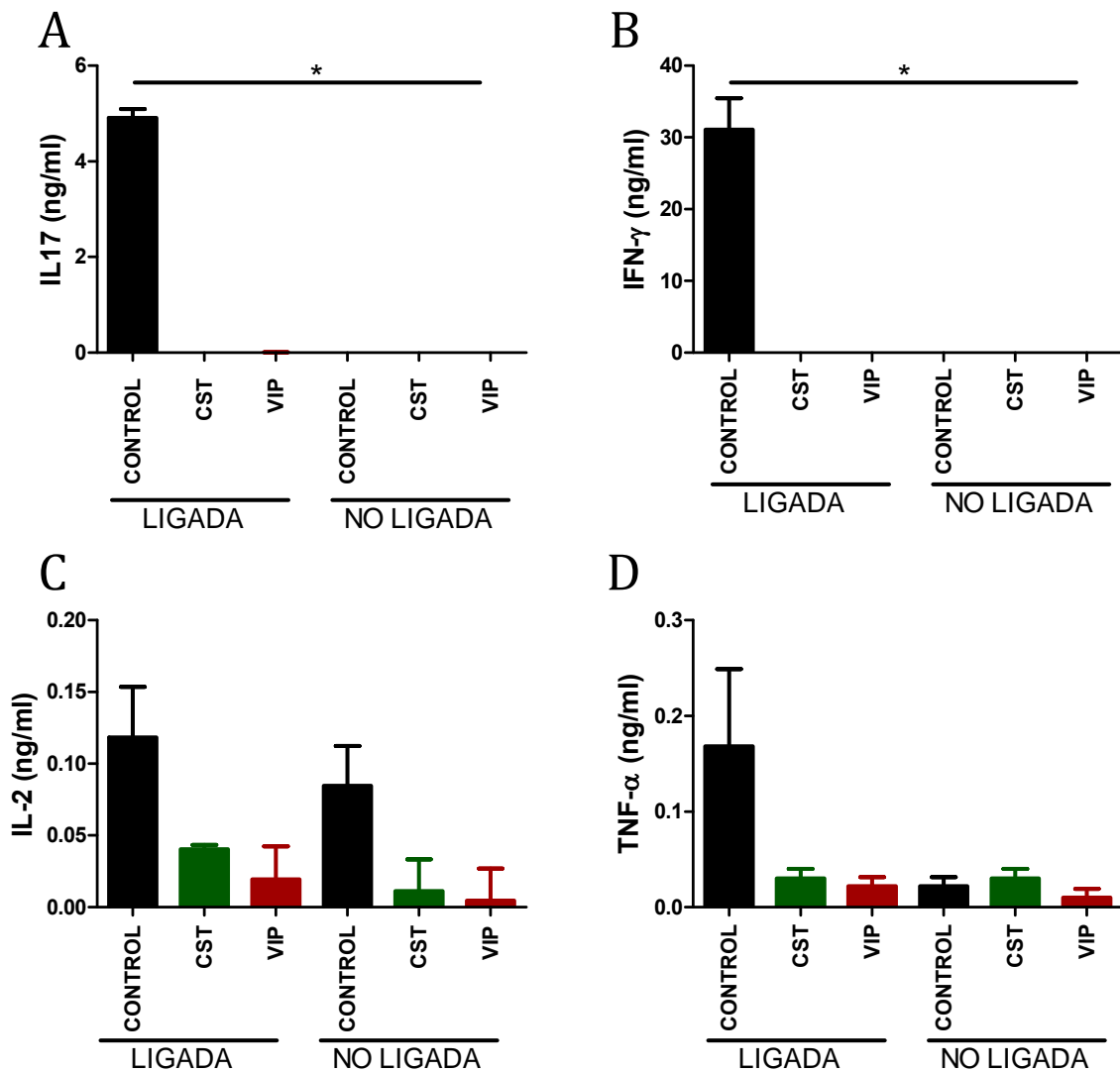


Figura 37. Cortistatina y VIP inhiben la respuesta inflamatoria en la carótida de ratones con aterosclerosis aguda. Análisis de la producción de citoquinas inflamatorias mediante ELISA, en explantos de carótidas ligadas y no ligadas aisladas de ratones con aterosclerosis aguda tratados con PBS (control), CST o VIP. Medida de la producción de IL17 (A), IFN-γ (B), IL-2 (C) y TNF-α (D). N=5. * p<0,05. CST=Cortistatina.

Tras ver el efecto a nivel local pasamos a estudiar el efecto de cortistatina y VIP en el perfil de las células inmunitarias a nivel de los ganglios linfáticos que drenan la zona de lesión. Lo primero que observamos fue que en los ratones tratados con CST o VIP hay una reducción significativa en el número de células presentes en los ganglios en comparación con el mostrado en los ganglios de los ratones del grupo control (**Figura 38**). Este dato nos indica que en los ganglios de los ratones tratados el índice de proliferación es menor, lo cual puede ser el

resultado de una menor expansión clonal de las células T presentes en los mismos, indicando una menor respuesta inmunológica a este nivel.

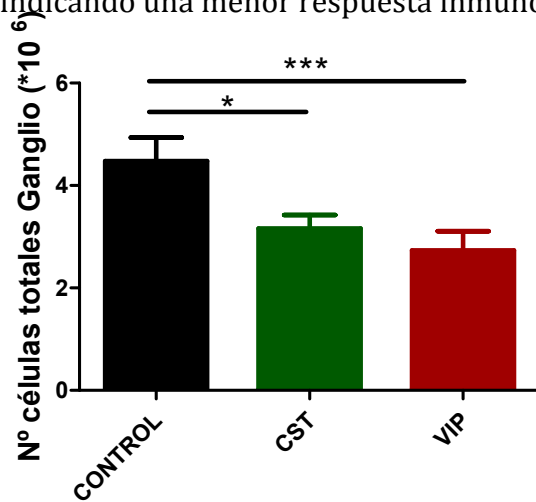


Figura 38. Cortistatina y VIP reducen el número de células en ganglios linfáticos en un modelo de aterosclerosis aguda. El modelo se realizó según el procedimiento expuesto en la figura 12. Se cuantificó el número de células en los ganglios linfáticos de los distintos grupos experimentales. N=9-13 ratones por grupo. *P<0,05; ***p<0,001. CST=Cortistatina.

A continuación estudiamos qué tipo de células T componen estos ganglios linfáticos. Para ello hicimos un marcaje intracelular para IL17 e IFN- γ . Analizamos la proporción de células CD4⁺ que expresan estas citoquinas mediante citometría de flujo. Comprobamos que el tratamiento de los ratones con cortistatina o con VIP disminuye el porcentaje de células Th1 (**Figura 39A**) y células Th17 (**Figura 39B**) en los ganglios linfáticos, en relación al porcentaje encontrado en los ganglios de los ratones del grupo control. Por tanto, parte del efecto en la inhibición de la respuesta inflamatoria por cortistatina y VIP puede deberse al efecto inhibitor que presentan cortistatina y VIP sobre estas poblaciones celulares.

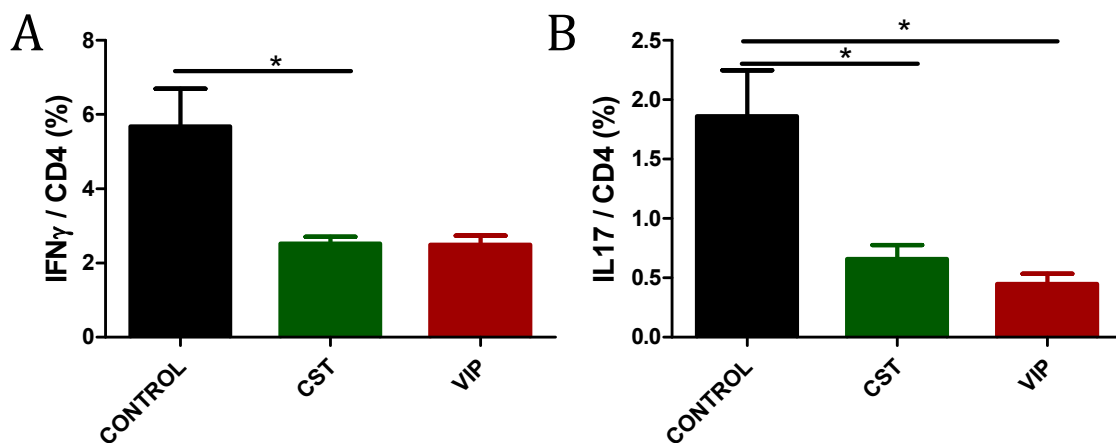


Figura 39. Efecto del tratamiento con cortistatina o VIP en el porcentaje de células Th1 y Th17 en los ganglios linfáticos que drenan la carótida. Marcaje mediante citometría de flujo de células CD4⁺ productoras de IFN- γ (A), e IL17 (B), en los distintos grupos experimentales en un modelo de aterosclerosis aguda. N=10. * p<0,05. CST=Cortistatina.

Una vez que sabemos que el número de células de los ganglios es menor en los ratones tratados con CST o VIP, y que además, el porcentaje de células Th1 y

Th17 disminuye con ambos tratamientos, nos preguntamos si el tratamiento afectaría al porcentaje de células Treg en los ganglios linfáticos. Comprobamos que el tratamiento con CST o con VIP no produce un cambio significativo en el porcentaje de células FoxP3+ dentro de la población CD4 (**Figura 40**).

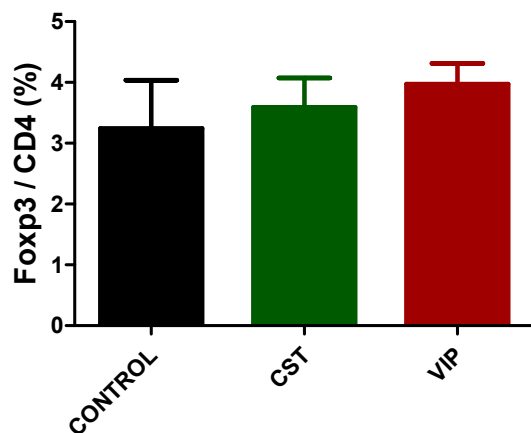


Figura 40. Efecto de CST y VIP en el porcentaje de células Treg en ganglios linfáticos en un modelo aterosclerosis aguda. El número de células se determinó mediante marcaje intracelular de Foxp3 y citometría de flujo. Se expresa como porcentaje de Foxp3+ dentro de la población de células CD4+. N=5. CST=Cortistatina.

De los resultados obtenidos en las **figuras 39 y 40** podemos deducir que el tratamiento con los péptidos favorece el balance entre respuesta autoreactiva Th1/Th17 y tolerogénica Treg a favor de esta última, controlando así la respuesta inflamatoria a lo largo del tratamiento.

Analizado el porcentaje de células Th1, Th17 y Treg presentes en los ganglios linfáticos que drenan la zona de lesión, pasamos a estudiar si hay un cambio en el perfil de citoquinas producidas en los mismos. Para ello estimulamos las células de los ganglios con ConA y analizamos mediante ELISA la liberación de citoquinas y quimioquinas al medio. Con excepción de IL17 (**Figura 41B**), el tratamiento con cortistatina o VIP no produce cambios significativos en la producción de IFN- γ (**Figura 41A**), MCP-1 (**Figura 41C**), o IP10 (**Figura 41D**) en respuesta a un estímulo policlonal inespecífico, lo que indica que el sistema de defensa del animal no se encuentra comprometido en caso de necesitar responder ante una situación de infección o daño.

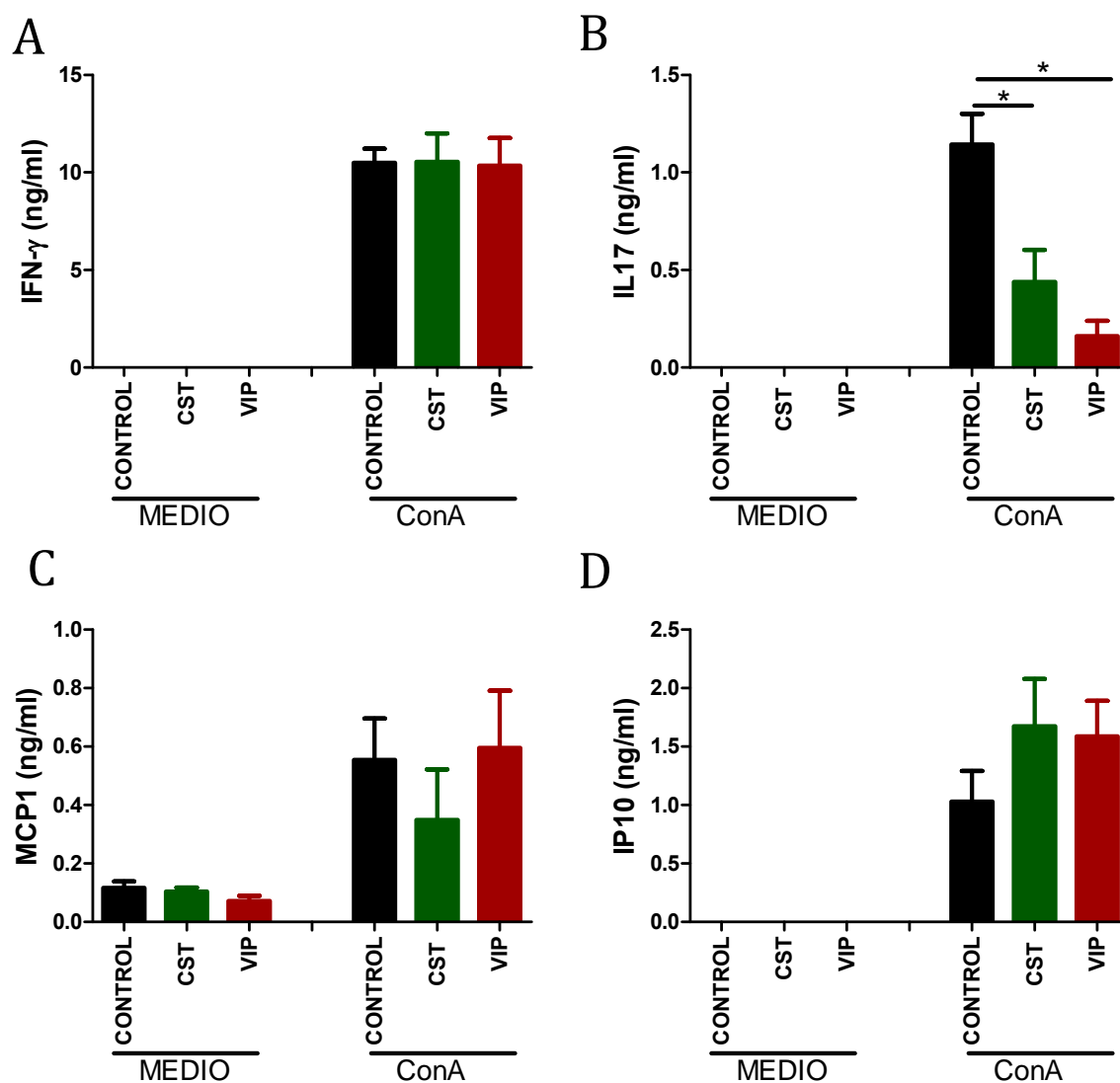


Figura 41. Efecto del tratamiento con cortistatina o VIP en la producción de citoquinas y quimioquinas en ganglios linfáticos en un modelo de aterosclerosis aguda. Las células de los ganglios linfáticos que drenan la carótida se aislaron de ratones a los que se les produjo una ligación parcial de la misma. Tras la incubación en ausencia (medio) o presencia de un estímulo inespecífico (ConA) durante 48 horas, se midió la producción de IFN- γ (A), IL17 (B), MCP-1 (C) e IP10 (D). N=5. ** $p < 0,01$. CST=Cortistatina.

Por último, comprobamos si el tratamiento con CST o VIP estaba afectando a la capacidad proliferativa de las células de los ganglios. Para ello medimos la incorporación de timidina tritiada en células de los ganglios que drenan la carótida de los distintos grupos experimentales, en presencia o ausencia de ConA. La **figura 42** muestra que el tratamiento con CST o VIP inhibe la capacidad proliferativa de estas células en respuesta a un estímulo policlonal, con respecto a la proliferación de las células procedentes de ratones del grupo control. Este resultado concuerda con el observado en la figura 15, donde se muestra que el número de células en los ganglios procedentes de los ratones tratados con CST o VIP era menor que el

*Uso de neuropéptidos anti-inflamatorios en enfermedades cardiovasculares:
Aterosclerosis y miocarditis autoinmune.*

número de células en los ganglios del grupo control. Un descenso en la proliferación es indicativo de una menor activación de la respuesta inmunitaria. Puesto que el tipo de células que disminuyen son las células Th1 y Th17, esto podría indicar que los péptidos inhiben la respuesta pro-inflamatoria en los ganglios linfáticos durante la fase aguda del desarrollo de aterosclerosis.

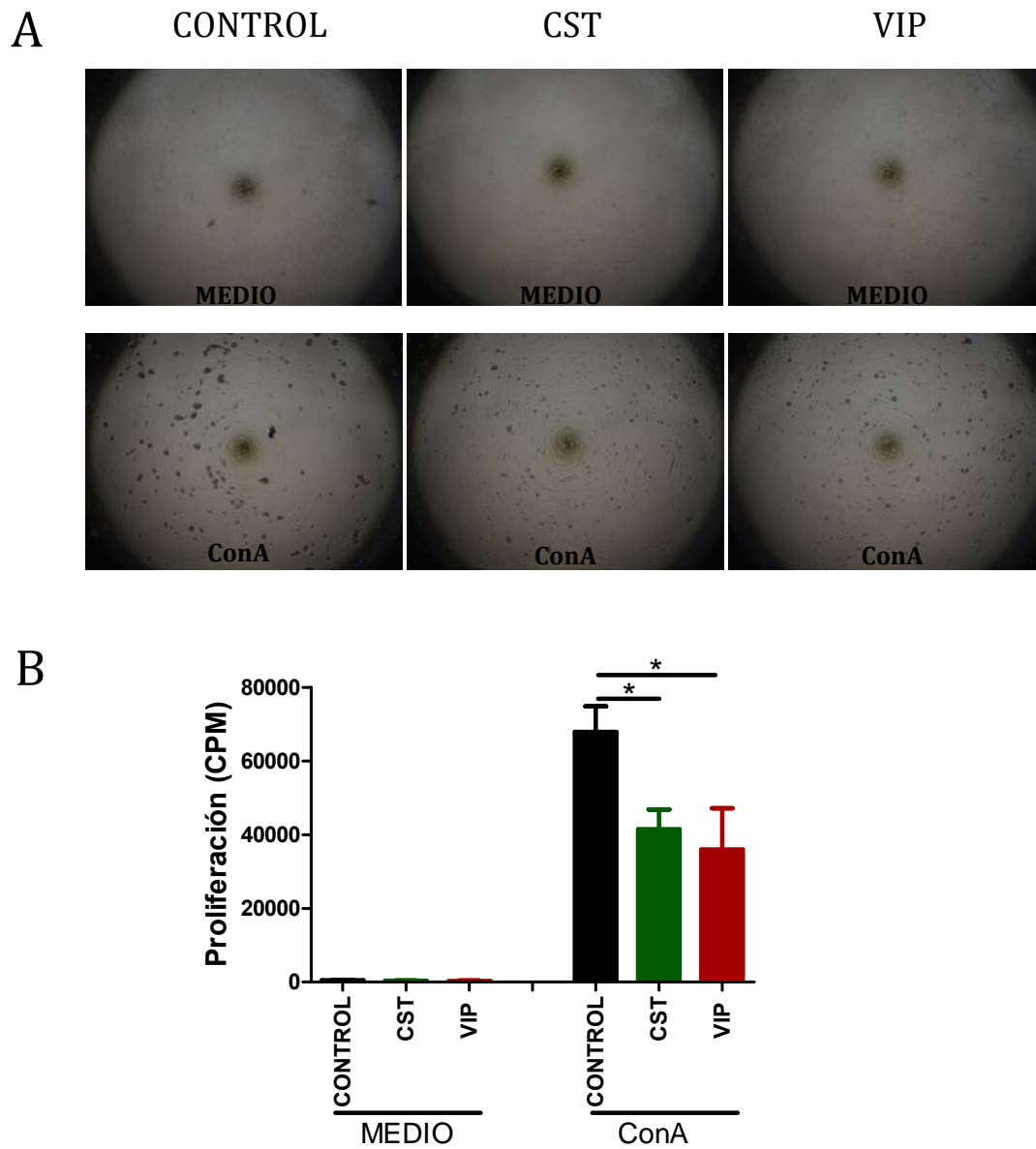


Figura 42. Cortistatina y VIP inhiben de forma inespecífica la proliferación celular en los ganglios linfáticos que drenan la carótida en un modelo de aterosclerosis aguda. Estudio de la formación de núcleos de proliferación (A), e incorporación de timidina tritiada (B), tras 72 horas de estímulo, en células procedentes de ganglios linfáticos que drenan la carótida de los distintos grupos de estudio en un modelo agudo de aterosclerosis. La incorporación de timidina tritiada se indica como cuentas por minuto (CPM). N=5. *p<0,05. CST=Cortistatina.

Resumen

El tratamiento con cortistatina o VIP de ratones ApoE^{-/-} aterogénicos en un modelo de ligación parcial de la carótida inhibe la formación de placas ateroscleróticas (**Figura 35**). Este efecto puede ser consecuencia directa de una inhibición en la respuesta inflamatoria de estos ratones tanto en la zona de la lesión (**Figura 37**), como en los ganglios linfoides que drenan la zona (**Figura 38-41**).

6.2.2 Análisis del papel de CST y VIP en un modelo de aterosclerosis crónica.

Tras ver el efecto de cortistatina y VIP en un modelo agudo de aterosclerosis nos preguntamos si el tratamiento con los péptidos tendría un efecto similar en un modelo de aterosclerosis crónica, que mimetiza lo ocurrido en pacientes con esta enfermedad. Este modelo se basa en un aumento crónico de colesterol en sangre, de modo que usamos ratones C57BL/6 ApoE^{-/-}, que no catabolizan correctamente el colesterol administrado en la dieta, y a los que alimentamos con una dieta hiperlipidémica con un 0,15% de colesterol durante 16 semanas.

6.2.2.1 El tratamiento con cortistatina o VIP inhibe la formación de placas ateroscleróticas en un modelo de aterosclerosis crónica.

Para analizar el efecto del tratamiento con cortistatina o VIP en la formación de placas ateroscleróticas en un modelo de aterosclerosis crónica analizamos la presencia de las mismas a nivel de aorta descendente, arco aórtico y seno aórtico.

Las aortas descendentes se tiñeron con Sudan IV. Observamos que en los ratones tratados con cortistatina o con VIP el número de lesiones es menor al encontrado en las aortas de ratones del grupo control (tratado con PBS) (**Figura 43A**). La cuantificación de las lesiones muestra que, mientras que el 100% de los ratones del grupo control desarrollaron placas ateroscleróticas en la aorta descendente, el 44% y el 25% de los animales tratados con CST y VIP respectivamente, no mostraron ninguna placa (**Figura 43B**). Además, en aquellos ratones que aún siendo tratados desarrollaron lesiones, estas lesiones fueron de menor tamaño. En este sentido podemos destacar que mientras que 9/16 ratones del grupo control tienen más de un 5% de la superficie de la aorta ocupada por las lesiones, esta proporción se reduce a 3/16 en los grupos de ratones tratados con CST o con VIP.

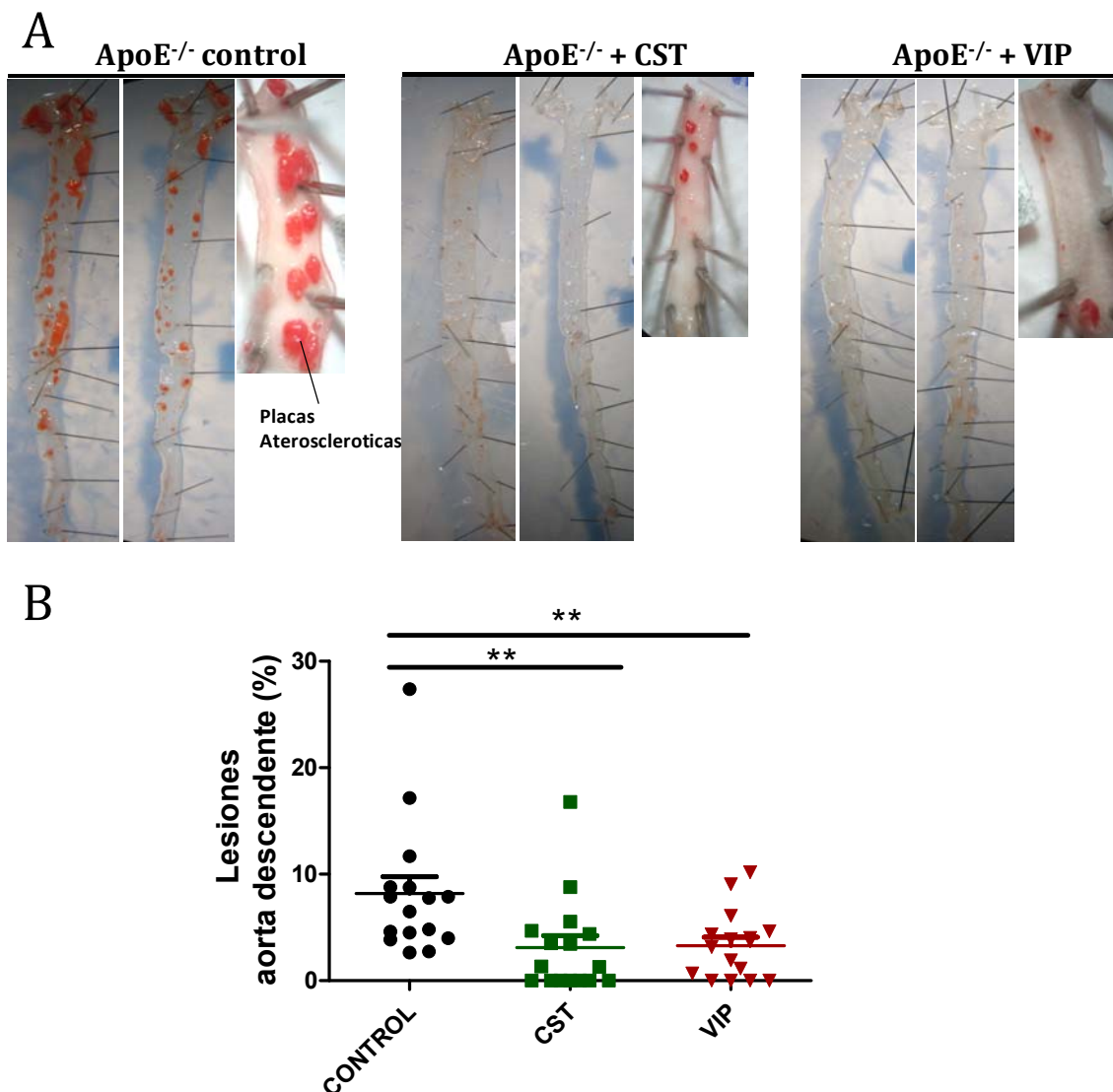
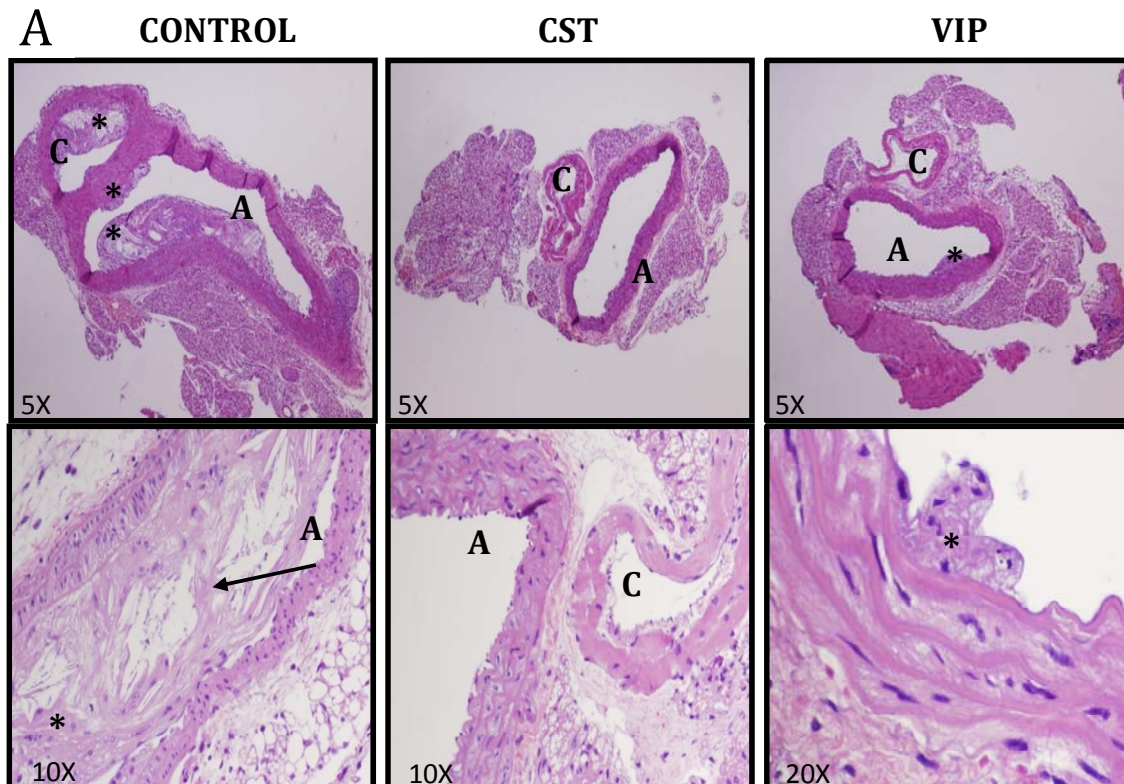


Figura 43. Cortistatina y VIP reducen la formación de placas ateroscleróticas en aorta descendente. Caracterización de la formación de placas ateroscleróticas en aorta descendente en un modelo de aterosclerosis crónica mediante tinción con Sudan IV. **A.** Imágenes de aorta descendente de ratones de los distintos grupos. **B.** Cuantificación de las lesiones representada como porcentaje de superficie con placas ateroscleróticas respecto a la superficie total de la aorta. N= 16 **p<0,01. CST=Cortistatina.

Para la cuantificación de las lesiones en el arco aórtico de los distintos grupos de estudio hicimos cortes seriados perpendiculares a luz del vaso y los teñimos con H-E. Al hacer los cortes transversales, se puede observar tanto la cavidad de la aorta como la cavidad de la carótida, pudiendo determinar así la formación de placas ateroscleróticas en distintas arterias (**Figura 44A**). Observamos que el tratamiento de los ratones con cortistatina o VIP reduce la formación de placas ateroscleróticas a nivel de arco aórtico, en comparación con el grupo de ratones control (**Figura 44B**). Además, las lesiones formadas en los ratones del grupo control adquieren un grado de complejidad mayor, tal y como indica la presencia de cristales de colesterol en las placas, señalados con una flecha en la **figura 44A**.



B

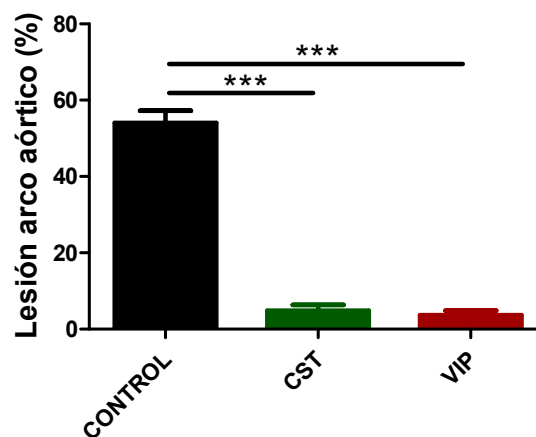


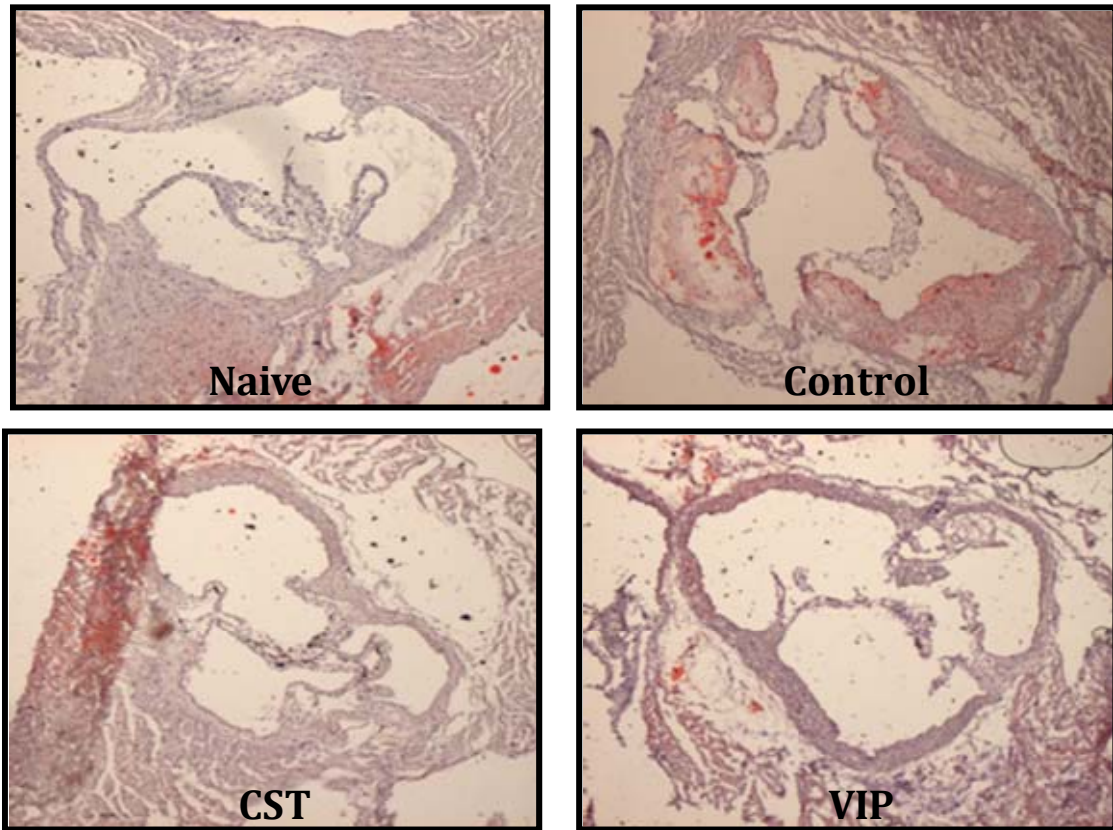
Figura 44. Cortistatina y VIP reducen la formación de placas ateroscleróticas en arco aórtico. Tinción con H-E de cortes seriados del arco aórtico de ratones ApoE^{-/-} en un modelo crónico de aterosclerosis. **A.** Las imágenes muestran la formación de placas en el arco aórtico de ratones del grupo control o tratados con CST o VIP. C: arteria carótida; A: aorta. →Cristales de colesterol. *: Placas ateroscleróticas. **B.** Cuantificación de las lesiones representadas como porcentaje de superficie con placas ateroscleróticas de la superficie total. N=13 ***p<0,001. CST=Cortistatina.

Para el estudio del efecto de cortistatina y VIP sobre la formación de placas ateroscleróticas a nivel de seno aórtico hicimos cortes seriados del mismo y teñimos con el colorante de lípidos Oil Red O. Puesto que las placas van a estar mayoritariamente compuestas de células espumosas, las cuales están cargadas de lípidos, esta tinción nos va a permitir delimitar la presencia de placas. De este modo comprobamos que el tratamiento con cortistatina o VIP en un modelo

Uso de neuropéptidos anti-inflamatorios en enfermedades cardiovasculares: Aterosclerosis y miocarditis autoinmune.

crónico de aterosclerosis inhibe la formación de placas a este nivel, presentando un aspecto muy similar al encontrado en el grupo naive (ratones C57BL/6 con dieta normal) (**Figura 45**).

A



B

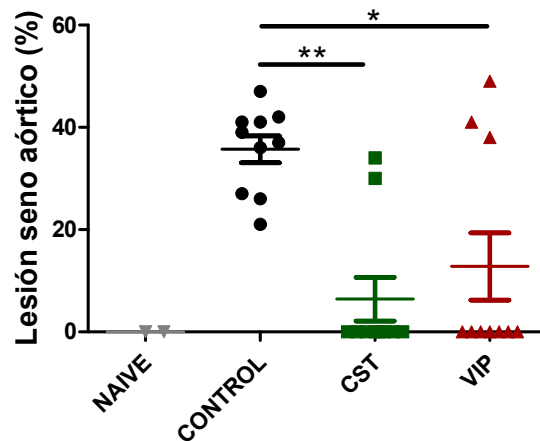


Figura 45. Cortistatina y VIP reducen la formación de placas ateroscleróticas en seno aórtico. Tinción con Oil Red O de secciones de seno aórtico de los distintos grupos de estudio en un modelo de aterosclerosis crónica. **A.** Imágenes del seno aórtico. **B.** Cuantificación de las lesiones representada como porcentaje de superficie con placas ateroscleróticas de la superficie total del seno. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. CST=Cortistatina.

Finalmente, quisimos analizar la composición en CD68 de las placas ateroscleróticas en los distintos grupos de estudio cuando éstas llegan a formarse. Vimos que las placas que aparecen en los ratones tratados con CST o VIP sigue habiendo expresión de CD68 (**Figura 46**).

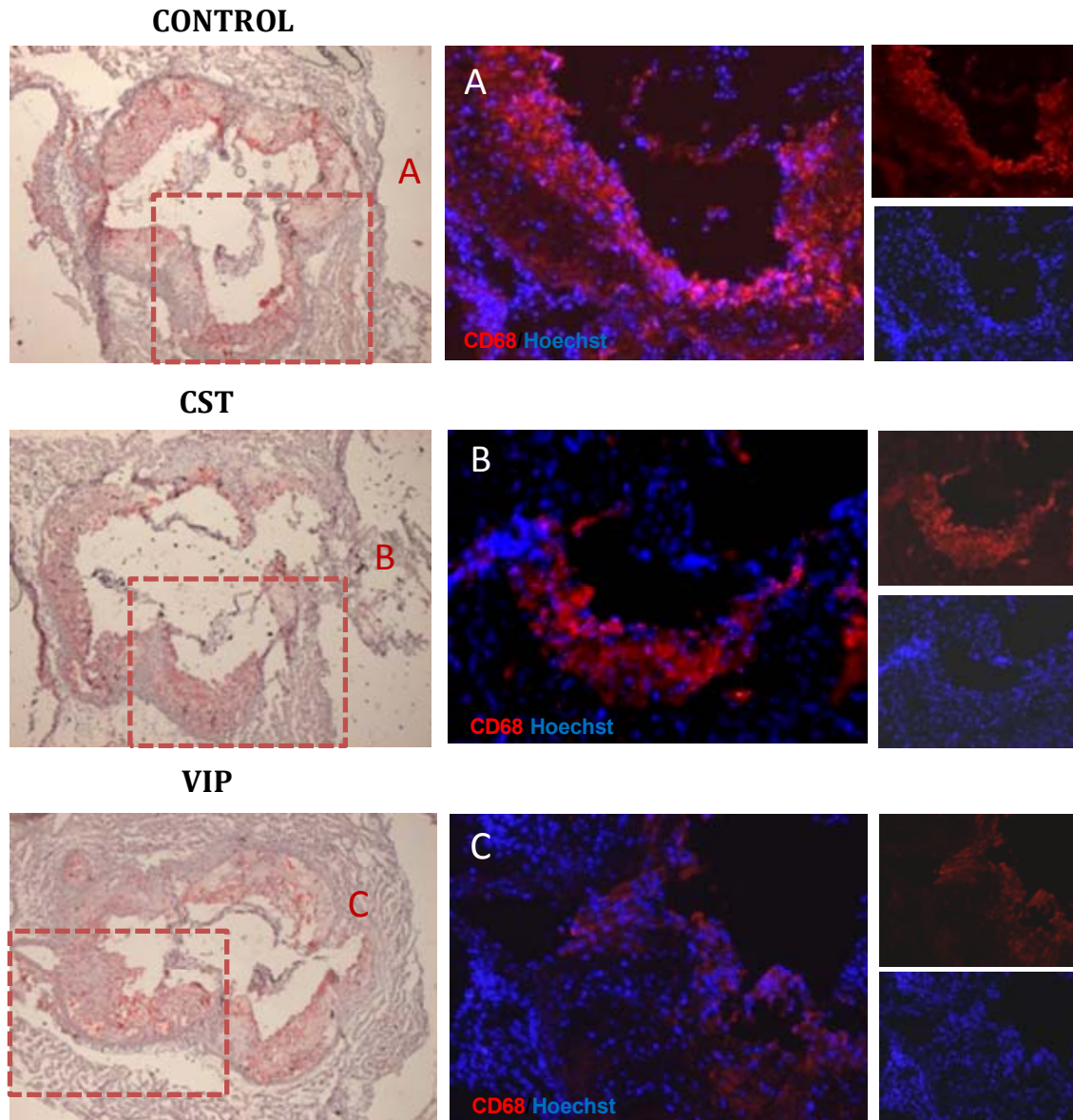


Figura 46. Caracterización de las lesiones ateroscleróticas en un modelo de aterosclerosis crónica. Secciones del seno aórtico teñidas con Oil Red O y hematoxilina (A) o con CD68 y Hoechst (B), de los distintos grupos de estudio en el modelo de aterosclerosis crónica. CST=Cortistatina.

6.2.2.2 Estudio del efecto de cortistatina y VIP en la respuesta inmunológica en un modelo de aterosclerosis crónica.

En los apartados anteriores hemos demostrado que tanto cortistatina como VIP tienen un efecto en la regulación de la respuesta inmunitaria durante la fase efectora de la aterosclerosis. Ahora, en un modelo crónico de aterosclerosis, vamos a ver si dichos neuropéptidos regulan la respuesta inmunitaria a nivel de los

ganglios linfáticos lumbares. Para ello analizaremos si el tratamiento con cortistatina o VIP afecta al número de células de los mismos así como a la composición en células Th1, Th17 y Treg.

En primer lugar observamos que el tratamiento con VIP o cortistatina reduce el número de células presentes en los ganglios, en comparación al número de células encontrado en los ganglios de los ratones del grupo control (**Figura 47**). Este dato es indicativo de un descenso en la proliferación celular en los ganglios procedentes de los ratones tratados, lo cual, es señal de que la actividad inmunológica es menor, pudiendo significar una menor respuesta inflamatoria.

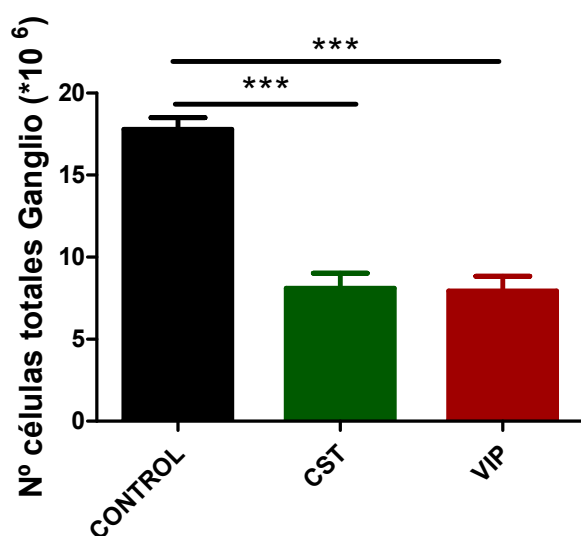


Figura 47. Cortistatina y VIP reducen el número de células en ganglios linfáticos lumbares en un modelo de aterosclerosis crónica. Cuantificación del número de células en los ganglios lumbares de los distintos grupos de estudio en un modelo de aterosclerosis crónica. N=10. ***p<0,001. CST=Cortistatina.

Tras cuantificar el número de células de los ganglios analizamos si el tratamiento con cortistatina o VIP altera la proporción de células Th1 y Th17 en los mismos. Para ello marcamos intracelularmente la producción de IFN- γ (**Figura 48A**) e IL-17 (**Figura 48B**) en células CD4⁺ y lo analizamos por citometría de flujo. Observamos que el tratamiento con CST o con VIP reduce el porcentaje de células Th1 y Th17 a este nivel, en comparación con el porcentaje obtenido en el grupo control. Esta disminución en el porcentaje de células T proinflamatorias en los ganglios linfáticos en los ratones tratados con cortistatina o VIP, es indicativo del papel anti-inflamatorio de estos neuropéptidos en esta enfermedad.

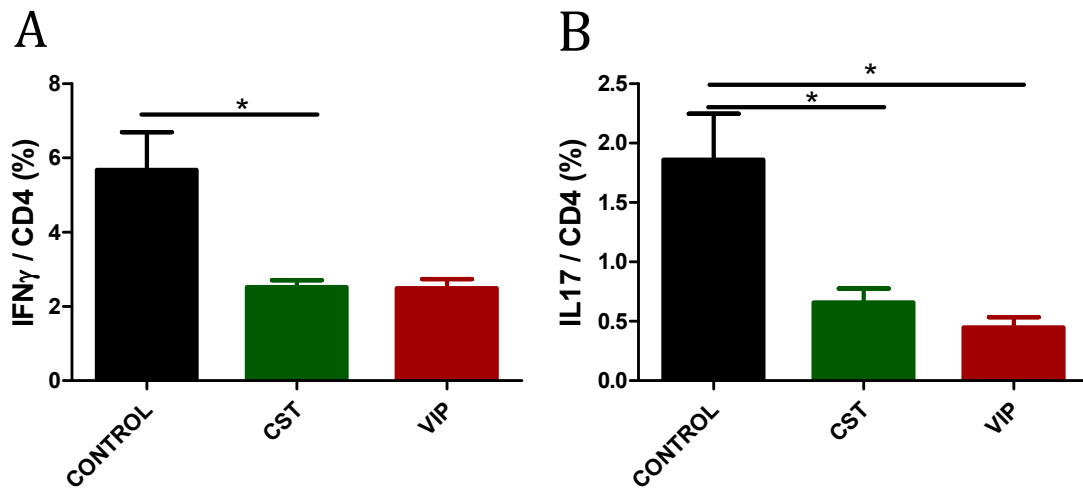


Figura 48. Cortistatina y VIP reducen el porcentaje de células Th1 y Th17 en los ganglios linfáticos lumbares en un modelo de aterosclerosis crónica. Marcaje de las células de los ganglios linfáticos lumbares de ratones tratados con PBS (control), CST, o VIP, en un modelo de aterosclerosis crónica, con CD4-IFN γ (A) y CD4-IL17 (B) tras estimulación con PMA/ionomicina/monensina durante 12 horas. El análisis se realizó por citometría de flujo. N=6-11 ratones grupo. ** p<0,01. ***p<0,001. CST=Cortistatina

Al estudiar la población de células Treg en los ganglios linfáticos observamos que, en los ratones tratados con cortistatina o con VIP el porcentaje de células Treg es menor, en comparación con el porcentaje de células Treg encontrado en los ganglios de los ratones del grupo control (Figura 49).

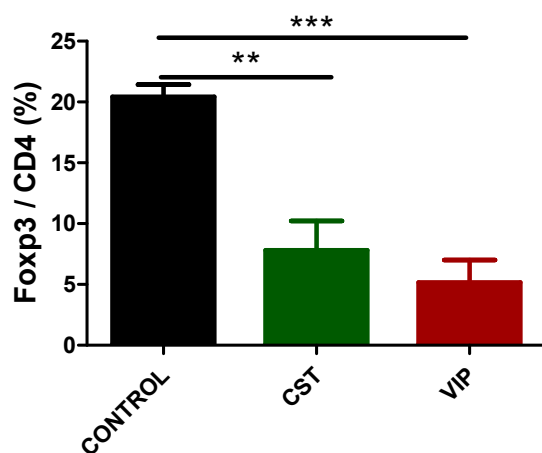


Figura 49. Cortistatina y VIP reducen el porcentaje de células Treg en ganglios linfáticos lumbares en un modelo de aterosclerosis crónica. Marcaje para CD4 y Foxp3 de las células de los ganglios linfáticos lumbares en un modelo de aterosclerosis crónica. El análisis se realizó por citometría de flujo. N=10 ***p<0,001. CST=Cortistatina.

Hasta ahora hemos visto que nuestro tratamiento reduce de un modo significativo la formación de lesiones ateroscleróticas en aorta descendente, arco y seno aórtico en un modelo de aterosclerosis crónica. Además, esta reducción puede deberse a una disminución en la respuesta inflamatoria causada por el tratamiento con cortistatina o VIP de estos ratones.

6.2.2.3 Estudio del efecto de cortistatina y VIP a tiempos cortos y cuando la enfermedad está establecida en un modelo de aterosclerosis crónica.

Quisimos estudiar qué ocurre a tiempos cortos de tratamiento en un modelo de aterosclerosis crónica. Para ello analizamos la formación de placas en los distintos grupos de estudio (Control (tratado con PBS), CST (tratado con cortistatina), y VIP (tratado con VIP) tras 8 semanas de dieta, 7 de las cuales con tratamiento.

En una segunda aproximación analizamos qué ocurre si se comienza a tratar la enfermedad, con cortistatina o VIP, una vez que las lesiones están establecidas, tras 8 semanas de dieta, durante 8 semanas más.

Al analizar la formación de lesiones ateroscleróticas en aorta descendente en los distintos grupos de estudio observamos que, con 8 semanas de administración de dieta, no hay manifestaciones patentes en la formación de lesiones en ninguno de los grupos (**Figura 50**). No obstante hay que destacar que, aunque la tinción con Sudán IV no tiñe lípidos en estas aortas, indicativo de una baja presencia de células espumosas, si se observan pequeñas protuberancias en la superficie de las mismas, indicando futuras zonas de lesión. Por lo tanto, a este tiempo ya se ha establecido la respuesta necesaria para que se formen las lesiones ateroscleróticas.

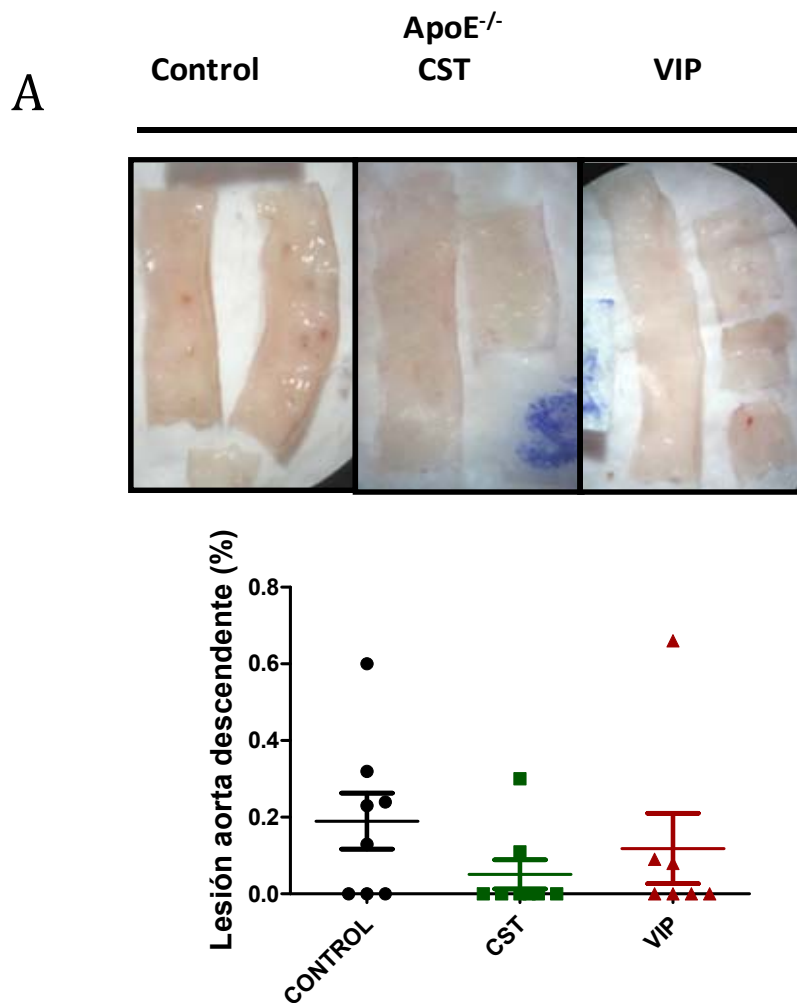


Figura 50. Formación de placas ateroscleróticas en aorta descendente a tiempos cortos en un modelo de aterosclerosis crónica. Ratones ApoE^{-/-}, alimentados con una dieta tipo occidental durante 8 semanas en un modelo crónico de aterosclerosis, tratados con PBS (CONTROL), CST o VIP. Las aortas se aislaron y tiñeron con SudanIV. **A** Imágenes de las aortas descendentes teñidas. **B** Cuantificación de las lesiones como porcentaje de área ocupada por lesiones con respecto al total. N=7 u 8. CST=Cortistatina.

Por su parte, al estudiar la formación de lesiones en ratones tratados una vez establecida la enfermedad, observamos que el tratamiento con CST cortistatina o VIP no reduce el porcentaje de las lesiones con respecto al grupo control (**Figura 51**).

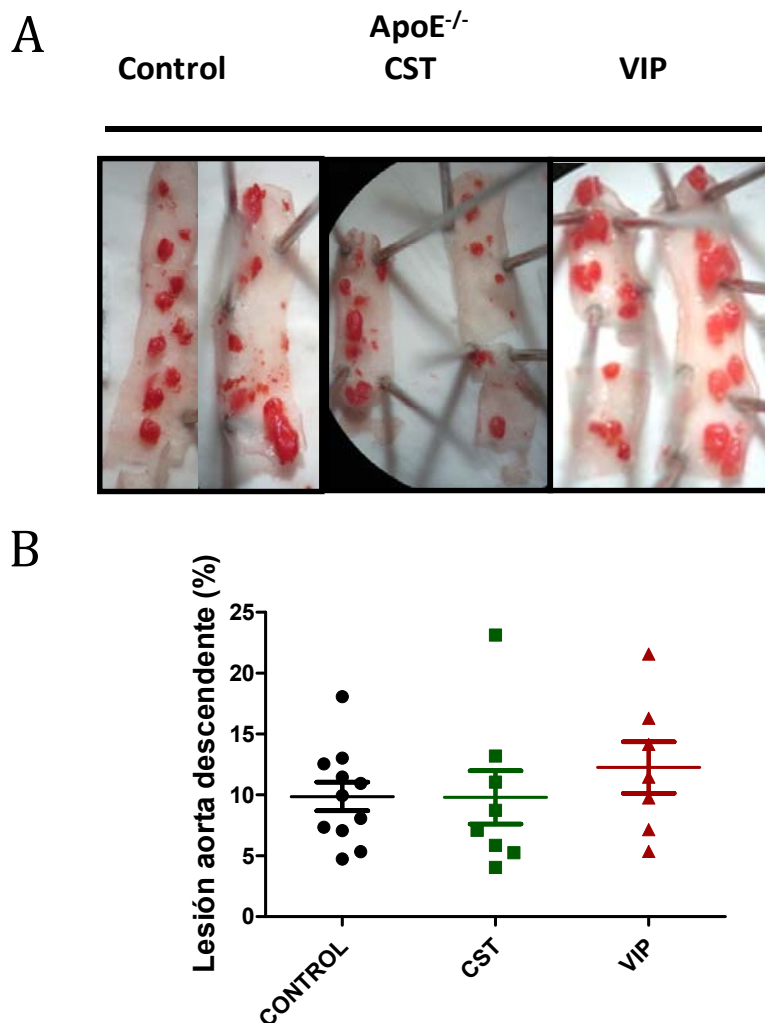


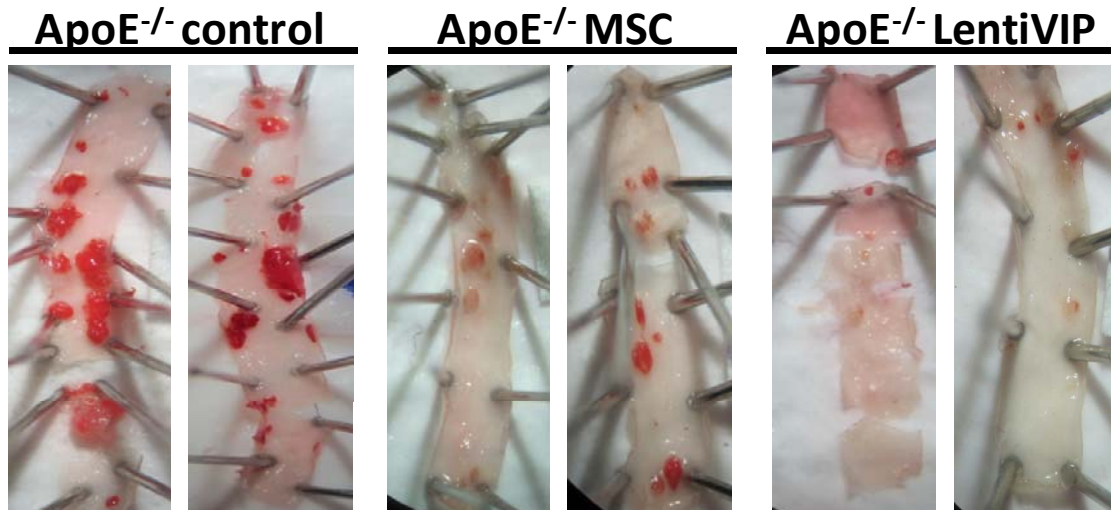
Figura 51. Formación de placas ateroscleróticas en aorta una vez establecida la enfermedad en un modelo de aterosclerosis crónica. Ratones ApoE^{-/-} alimentados con una dieta tipo occidental durante 16 semanas, tratados con PBS (CONTROL), CST o VIP durante las 8 últimas semanas. Las aortas se aislaron y tiñeron con Sudan IV. **A** Imágenes de las aortas descendentes de los distintos grupos. **B** Cuantificación de las lesiones como porcentaje de área ocupada por lesiones con respecto al total. N=7 u 11. CST=Cortistatina.

6.2.2.4 Estudio del tratamiento con células MSC, o de MSC transducidas con vectores lentivirales que expresan VIP (lentiVIP), en un modelo de aterosclerosis crónica.

Con la idea de buscar estrategias que nos permitan evitar la administración constante del péptido, aumentar su protección, y mejorar su liberación en la placa, tratamos los ratones en un modelo de aterosclerosis crónica con MSC transducidas con lentiVIP. Observamos que en los ratones tratados con MSC-lentiVIP, o con MSC solas, la formación de lesiones ateroscleróticas a nivel de aorta descendente era menor, en comparación con los ratones del grupo control tratados con PBS (**Figura 52**). Además, mientras que el 60% de los ratones del grupo control tenían lesiones en más del 5% del área de la aorta descendente, esta proporción es del 30% en los

ratones tratados con MSC y del 0% en los ratones tratados con MSC-lentiVIP (Figura 52).

A



B

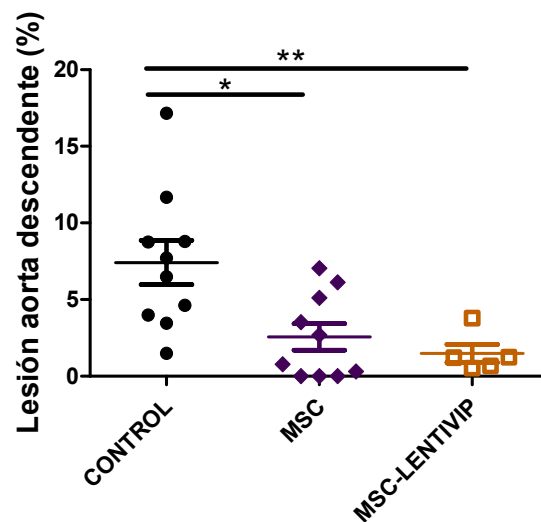


Figura 52. MSC y MSC-lentiVIP inhiben la formación de placas ateroscleróticas en un modelo de aterosclerosis crónica. Aortas de ratones C57BL/6 ApoE^{-/-}, alimentados durante 16 semanas con una dieta tipo *occidental*, tratados o no con MSC o MSC-LentiVIP se tiñeron con Sudan IV. (A) Imágenes de la aorta descendente (B) Cuantificación de las lesiones como porcentaje del área de la aorta ocupada con lesiones con respecto a la superficie total. * $p < 0,05$ N=10 o 5 ratones por grupo.

Esta reducción en la formación de lesiones ateroscleróticas queda también reflejada a nivel de arco aórtico, observándose además una reducción en la formación de lesiones en los ratones tratados con MSC-lentiVIP con respecto a los tratados con MSC (Figura 53).

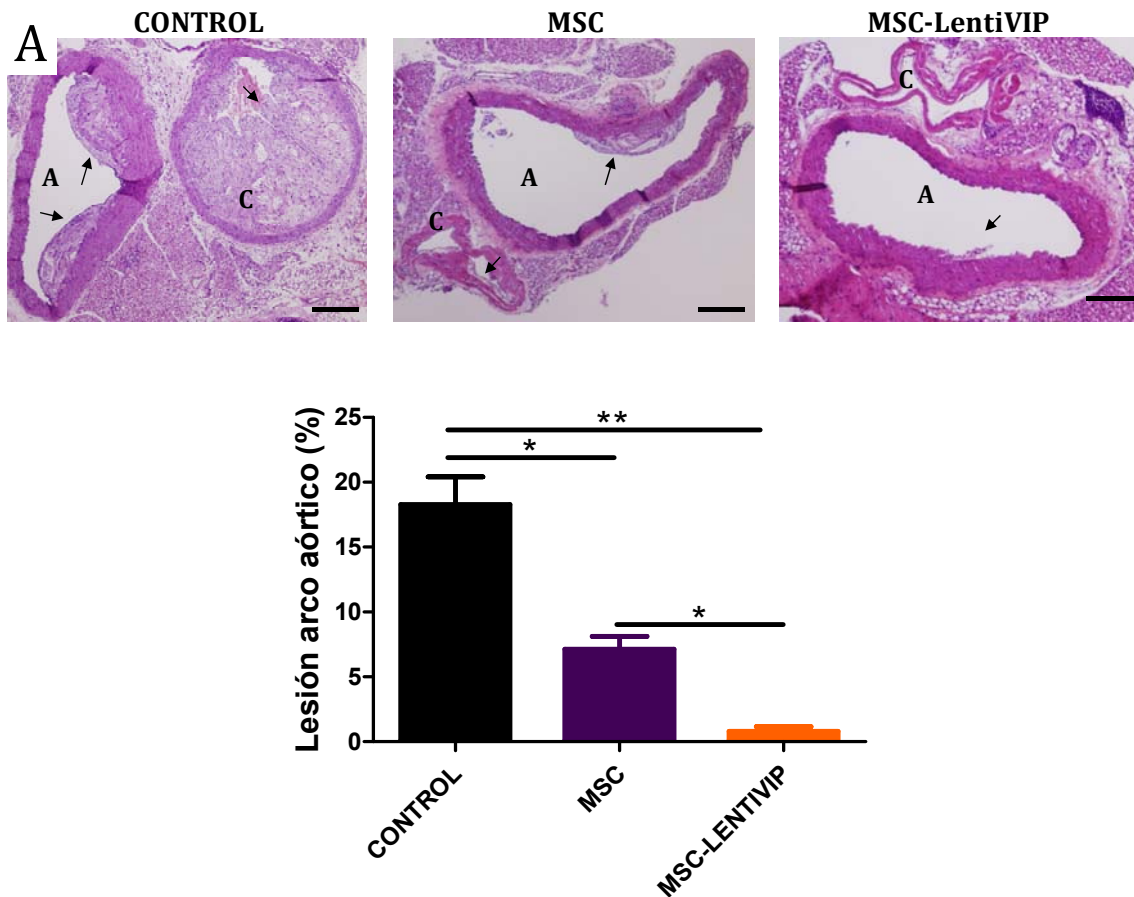


Figura 53. MSC y MSC-lentiVIP inhiben la formación de placas ateroscleróticas en arco aórtico. Arco aórtico de ratones tratados con MSC, MSC-lentiVIP o PBS (CONTROL) teñido con H-E. (A) Imágenes del arco aórtico. A: Aorta; C: Carótida. Las flechas señalan las placas ateroscleróticas. La barra de escala representa 250 μ m. (B) Cuantificación de las lesiones como porcentaje de la luz del arco aórtico ocupado con lesiones con respecto a la luz total del vaso. N=5 o 10 ratones/grupo. *p<0,05; **<0,01.

Resumen

Los resultados obtenidos del uso de un modelo de aterosclerosis crónica muestran que el tratamiento, tanto con cortistatina como con VIP, tiene un efecto inhibitor en la formación de placas ateroscleróticas (**Figuras 43-45**). Dicho efecto se debe, al menos en parte, a que cortistatina y VIP son capaces de controlar la respuesta inflamatoria a nivel de los ganglios linfáticos lumbares (**Figuras 47-49**). De hecho, cuando se comienza el tratamiento una vez desarrollada la respuesta inmunitaria de la enfermedad, el tratamiento con cortistatina o VIP no reduce la formación de lesiones (**Figuras 50-51**).

6.2.3 Mecanismos implicados en la reducción de la formación de placas ateroscleróticas.

Una vez visto que cortistatina y VIP tienen un efecto inhibitorio en la formación de placas ateroscleróticas, tanto en un modelo de aterosclerosis aguda como en un modelo crónica, nos planteamos si, además del papel de estos péptidos en la regulación de la respuesta inflamatoria en esta enfermedad, pudiesen estar afectando a la formación de las lesiones a otro nivel. Para ello estudiamos cómo afecta el tratamiento con estos neuropéptidos a los niveles de colesterol en sangre, las células endoteliales, la adhesión y trans migración de las células Th1, las células espumosas y las células de músculo liso.

6.2.3.1 *El tratamiento con VIP disminuye los niveles de colesterol en sangre de ratones ApoE^{-/-} en un modelo de aterosclerosis crónica.*

La presencia de colesterol elevada en sangre es la principal causante de la aterosclerosis en la sociedad. Quisimos estudiar si el tratamiento con cortistatina o con VIP afecta a la concentración de colesterol en sangre en un modelo de aterosclerosis crónica. En la **figura 54** observamos que los niveles de colesterol en sangre se triplican en las cuatro primeras semana como consecuencia de la dieta, y el tratamiento con VIP favorece un descenso en la concentración de colesterol en sangre con respecto al grupo control, en la semana 4 de tratamiento y a tiempo final. En el caso de los ratones tratados con cortistatina no se han visto diferencias significativas en la concentración de colesterol en sangre con respecto a la concentración encontrada en el grupo control (**Figura 54**).

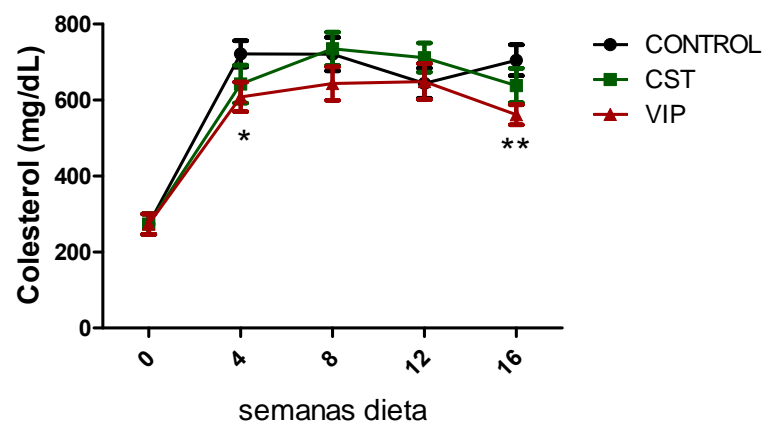


Figura 54. VIP reduce la concentración de colesterol en sangre en un modelo de aterosclerosis crónica. Medida de colesterol en sangre en ratones de los distintos grupos de estudio en un modelo de aterosclerosis crónica. N=5-15 ratones/grupo. *p<0,05, **p<0,01

6.2.3.2 Efecto de cortistatina sobre la adhesión de monocitos a células endoteliales.

Las células endoteliales constituyen la primera barrera en la formación de placas ateroscleróticas. Delimitan la luz del vaso y regulan la trans migración de células inmunitarias a la capa íntima de la arteria, al mediar la expresión de moléculas de adhesión. El oxLDL favorece la expresión de moléculas de adhesión por parte de las células endoteliales. Quisimos estudiar si el tratamiento con cortistatina de las células endoteliales influye en la adhesión de monocitos a dichas células. Para ello utilizamos como célula endotelial la línea de células primarias endoteliales humanas derivadas de la vena umbilical (HUVEC), y como monocitos a la línea monocítica humana THP-1. El hecho de que el estudio se realice únicamente con cortistatina y no con VIP se debe a que VIP no tiene receptores en las células endoteliales (191).

En la **figura 55** observamos que el tratamiento de las células endoteliales con oxLDL aumenta la unión de monocitos a las mismas con respecto a las células sin tratar (control). Por su parte, el tratamiento con cortistatina disminuye el porcentaje de células THP-1 unidas a las HUVEC cuando éstas son estimuladas con oxLDL. Este efecto inhibitorio sobre la adhesión celular es dependiente de la concentración de cortistatina (**Figura 55**).

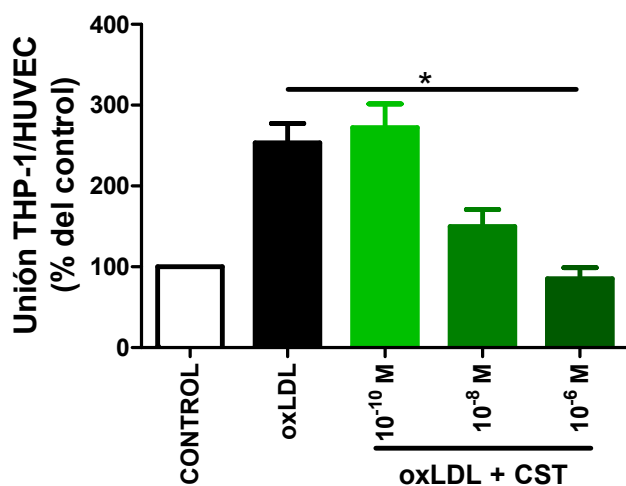


Figura 55. Cortistatina reduce la adhesión de las células THP-1 a las HUVEC. HUVEC tratadas con o sin oxLDL ± CST se pusieron en contacto con células THP1 cargadas con de calceína. La unión se midió por inmunofluorescencia. Control: HUVEC sin estimular. oxLDL: HUVEC estimuladas con oxLDL. N=4 *p<0,05; CST=Cortistatina.

A continuación nos preguntamos si el modo por el cual cortistatina lleva a cabo este efecto es mediante la modificación de la expresión de algunas moléculas de adhesión en las células endoteliales. Para ello medimos, mediante PCR a tiempo real, la expresión génica de *e-selectina*, *p-selectina*, *icam* y *vcam* (**Figura 56**). Comprobamos que el tratamiento con oxLDL aumenta el porcentaje de expresión génica de todas estas moléculas de adhesión con respecto al control sin estimular, a excepción de la expresión de la *e-selectina*. El tratamiento con cortistatina tiene un efecto inhibitorio en la expresión génica de *p-selectina* (**Figura 56**).

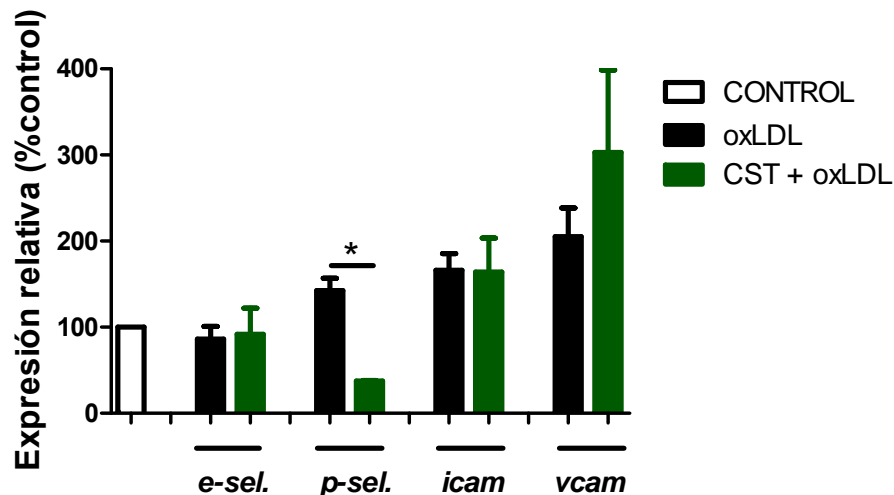


Figura 56. Cortistatina reduce la expresión de *p-selectina* en células HUVEC tratadas con oxLDL. ARN de células HUVEC estimuladas con oxLDL en presencia o ausencia de CST. EL grupo CONTROL se corresponde a células sin estimular. La expresión génica se representa como porcentaje de expresión de los genes de interés con respecto al control no tratado. Como gen de referencia utilizamos el 18S. N=4 * $p < 0,05$. *sel.* = *selectina* CST=Cortistatina.

Por lo tanto, podemos deducir de los resultados expuestos en la **figura 55 y 56**, que la bajada en la expresión de *p-selectina*, consecuencia del tratamiento de las HUVEC con cortistatina, va a significar un descenso en la unión de la línea celular monocítica THP-1 a la línea de células endoteliales HUVEC.

6.2.3.3 Estudio del efecto de cortistatina y VIP sobre la adhesión y trans migración de células Th1 al endotelio aórtico.

Otro componente celular importante en el inicio y progresión de las lesiones ateroscleróticas son las células Th1. En los modelos de aterosclerosis, tanto en el agudo como en el crónico, vimos que el tratamiento con cortistatina o con VIP reduce el número de células Th1 en los ganglios drenantes. A continuación nos planteamos si cortistatina y VIP podrían afectar a la capacidad de las Th1 para unirse al endotelio vascular y transmigrar a través del mismo. Para ello diferenciamos las células Th1 *in vitro* en presencia o ausencia de cortistatina o VIP e hicimos diferentes ensayos de adhesión y trans migración.

En primer lugar analizamos la unión de estas células Th1 a quimeras inmovilizadas de p-selectina y e-selectina bajo flujo de 1 dyn/cm², flujo similar al encontrado en los grandes vasos como la aorta. Comprobamos que el tratamiento con VIP disminuye la capacidad de adhesión de las mismas a quimeras de e-selectina (**Figura 57A**), no afectando a la capacidad de unión a quimeras de p-selectina (**Figura 57B**). Por su parte, el tratamiento con cortistatina no afecta a la capacidad de unión a quimeras de p o e-selectina, en comparación con las células del grupo control (células Th1 diferenciadas en ausencia de cortistatina o VIP) (**Figura 57**).

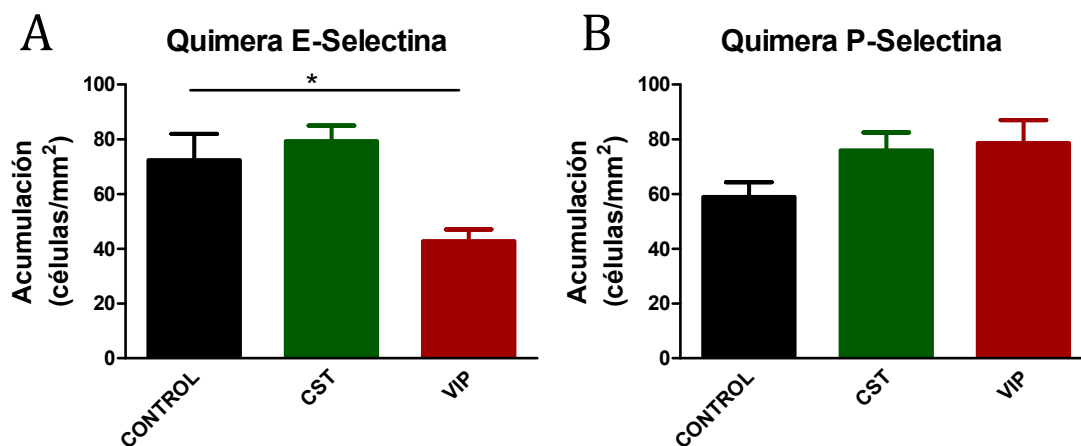


Figura 57. Unión de células Th1 a quimeras de E-Selectina y P-Selectina. Adhesión de células Th1 diferenciadas en presencia o ausencia de CST o VIP a quimeras de e-selectina (A) y p-selectina (B) bajo flujo de 1dyn/cm². Se representa la acumulación como número de células por mm². N=3 experimentos con 10 puntos/experimento. *p<0,05. CST=Cortistatina.

A continuación nos preguntamos si el tratamiento con cortistatina o VIP durante la diferenciación de las células Th1 afecta a la capacidad de trans migración de estas células a través de una monocapa de MHEC. Observamos que, si bien la diferencia no es estadísticamente significativa, el tratamiento con cortistatina tiende a disminuir el porcentaje de células Th1 que trans migran a través de las MHEC, en comparación al número de células Th1 del grupo control que van a trans migrar (**Figura 58**). El tratamiento con VIP no afecta a la capacidad de trans migrar de las células Th1 a través de las MHEC.

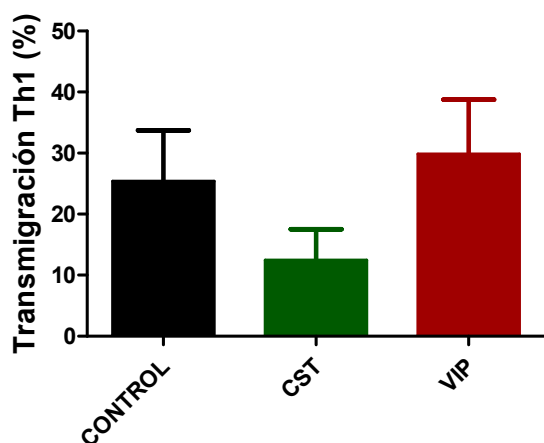


Figura 58. Trans migración de células Th1 a través de MHEC. Trans migración de células Th1, diferenciadas en presencia o ausencia de CST o VIP, a través de MHEC. La trans migración se representa como porcentaje de células que trans migran con respecto a las unidas. N=3. CST=Cortistatina.

Una vez estudiada la capacidad de las Th1 de unirse a quimeras de p y e-selectina, así como de trans migrar a través de MHEC, estudiamos *ex-vivo* la unión y trans migración de estas células a través del endotelio aórtico. También analizamos el efecto sobre la unión y trans migración de células Th1 del grupo control al endotelio aórtico tratado con cortistatina. Observamos que, si bien la diferencia no es estadísticamente significativa, el tratamiento con VIP durante la diferenciación de las células Th1 provoca una disminución en el número de las mismas que se

unen y transmigran a través del endotelio aórtico, mientras que el tratamiento con cortistatina no afecta a la capacidad de las mismas de unirse y transmigrar a través de la superficie aórtica, en comparación con células Th1 del grupo control (**Figura 59**).

Por otro lado, cuando la aorta es tratada *ex-vivo* con cortistatina hay una disminución en el número de células Th1 del grupo control que se unen y transmigran a través de la misma en comparación a la unión y trans migración de estas células Th1 a aortas no tratadas (**Figura 59**).

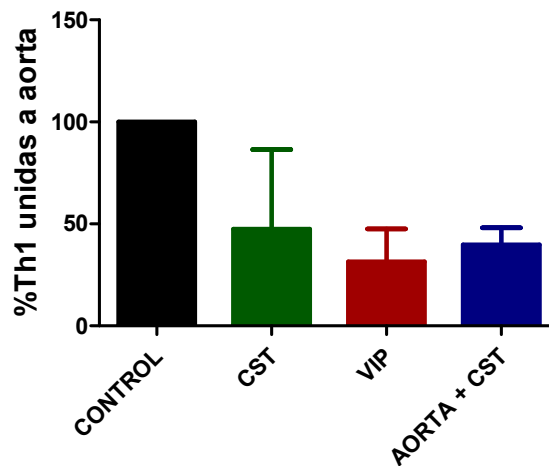


Figura 59. Ensayo de unión de células Th1 a la superficie de la aorta. Análisis de la unión y trans migración de células Th1, teñidas con Hoechst, a través de la superficie de aortas. CONTROL: células Th1. CST: Th1 diferenciadas en presencia de CST. VIP: Th1 diferenciadas en presencia de VIP. AORTA + CST= Estimulación de la aorta con CST. N=3. CST=Cortistatina.

6.2.3.4 Cortistatina y VIP reducen la formación de células espumosas.

Las células espumosas constituyen otro de los pilares en el inicio y progresión de las placas ateroscleróticas. Quisimos estudiar si cortistatina o VIP ejercen algún efecto en este tipo celular. Cultivamos macrófagos diferenciados de médula ósea en presencia de oxLDL, para la obtención de células espumosas, y los tratamos con cortistatina o VIP. Tras esto teñimos las células de los grupos control (células sin estimular), oxLDL (células estimuladas con oxLDL), CST (células estimuladas con oxLDL + CST) y VIP (células estimuladas con oxLDL + VIP) con Oil Red O para ver la formación de gotas lipídicas. Observamos que el tratamiento con oxLDL aumenta el porcentaje de todos los tipos celulares que presentan acúmulos lipídicos, según la clasificación descrita en materiales y métodos (**Figura 60**). Además, el tratamiento con cortistatina o con VIP muestra una tendencia a reducir la formación de células de tipo 2 (**Figura 60B**), 3 (**Figura 60C**) y 4 (**Figura 60D**) en comparación con los macrófagos tratados únicamente con oxLDL. Esta diferencia es estadísticamente significativa al analizar la formación de células tipo 4 en los macrófagos tratados con VIP.

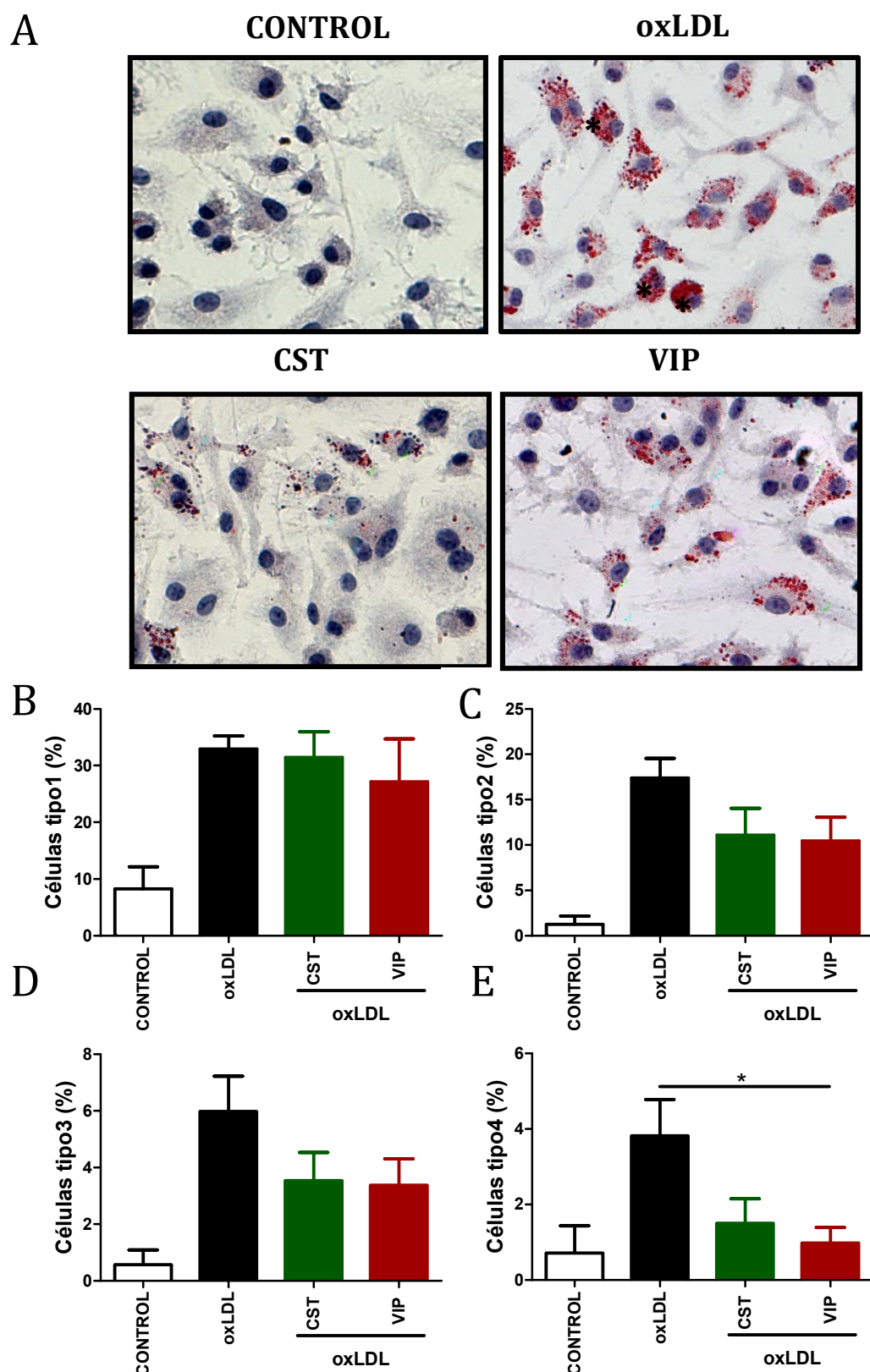


Figura 60. Cortistatina y VIP reducen la formación de células espumosas. BMMØ tratados con oxLDL ± CST o VIP teñidos con Oil Red O. (A) Imágenes de la formación de células espumosas en los distintos grupos de estudio. *: células espumosas. Porcentaje de células de tipo 1 (B), 2(C), 3(D) y 4(E) con respecto al total de cada grupo de estudio. N=4 o 5. *p<0,05; **p<0,01. CST=Cortistatina.

Para ver si este descenso en la formación de células espumosas se debe a que los neuropéptidos cortistatina y VIP están favoreciendo la salida de colesterol del macrófago hicimos un ensayo de eflujo de colesterol. Como control positivo utilizamos forskolina, inductor de la adenilato cilcasa. En la **figura 61** observamos que tanto cortistatina como VIP aumentan el porcentaje de colesterol liberado al medio por parte de las células espumosas, con respecto al eflujo observado en las células tratadas únicamente con oxLDL (grupo Colesterol), si bien esta diferencia no es estadísticamente significativa. Este dato apoya el resultado visto en la figura 37 de inhibición de la formación de células espumosas como resultado del tratamiento con cortistatina o VIP.

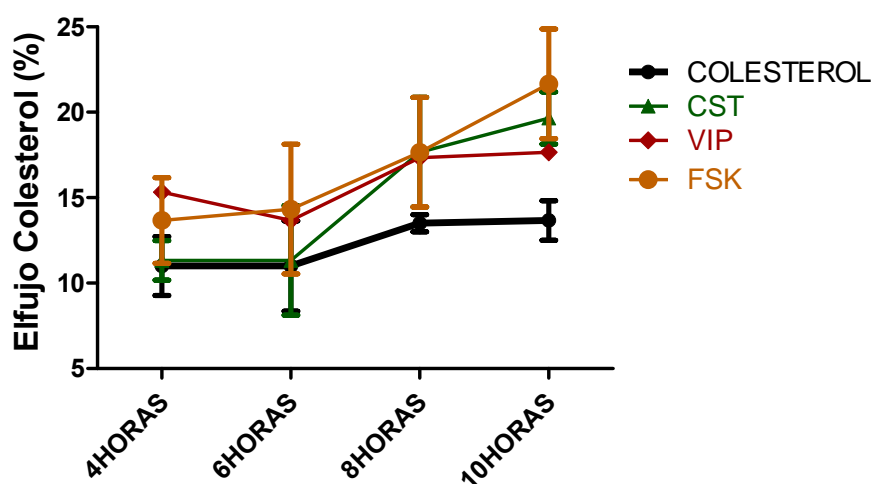


Figura 61. Cortistatina y VIP aumentan la salida de colesterol de células espumosas. Ensayo de eflujo de colesterol en BMMØ tratados con colesterol tritado y oxLDL \pm CST o VIP, inducido por apoA-1. El resultado se expresa como porcentaje de colesterol liberado al medio con respecto al total de la célula. N=3. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. CST=Cortistatina.

El hecho de que el eflujo de colesterol sea dependiente de la presencia en el medio de la apoA-1 es indicativo de que dicho eflujo está mediado por ABCA-1. Por lo tanto, quisimos analizar si el tratamiento con cortistatina o VIP durante la formación de células espumosas afecta a la expresión de distintos mediadores involucrados en el metabolismo del colesterol. Para ello medimos la expresión de ABCA-1, CD36 y PPAR- γ mediante western blot, en los distintos grupos de estudio. Observamos que tanto cortistatina como VIP producen un aumento en la expresión de ABCA-1 respecto al grupo control tratado con oxLDL (**Figura 62**). Además, este aumento en la expresión de ABCA-1 está precedido por un aumento en la expresión de PPAR- γ , factor de transcripción que media en la expresión de ABCA-1. A su vez, podemos observar que el tratamiento con VIP favorece un descenso en la expresión de CD36 con respecto al grupo control, que es un receptor de membrana que media la entrada de colesterol en el interior del macrófago (**Figura 62**).

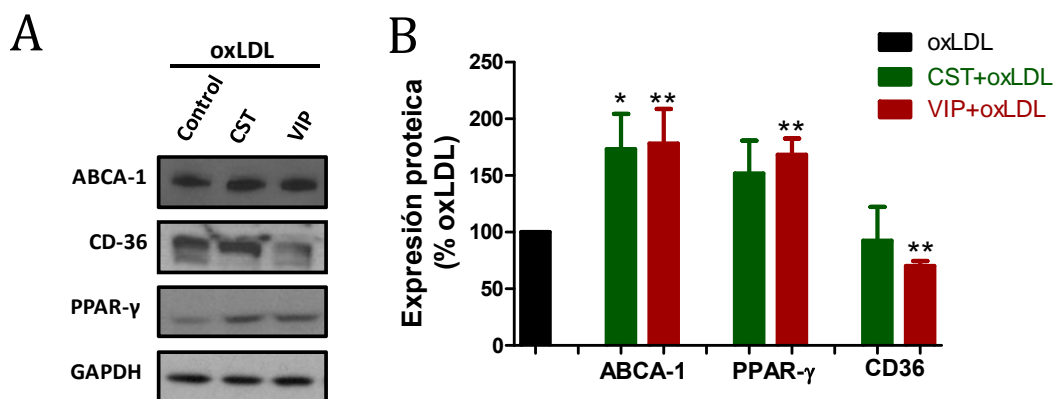


Figura 62. Efecto de CST y VIP en la expresión de mediadores del flujo de colesterol en macrófagos. Expresión de ABCA-1, CD36, PPAR-γ y GAPDH en los distintos grupos de estudio analizada por western blot. (A) Bandas de expresión de ABCA-1, CD-36, PPAR-γ y GAPDH. (B). Densitometría de las bandas proteicas graficada como porcentaje de expresión con respecto al control tratado con oxLDL. N=5-7. *p<0,05; ***p<0,001. CST=Cortistatina.

En este apartado hemos visto que cortistatina y VIP reducen la formación de células espumosas, y que este descenso se debe, al menos en parte, a que el tratamiento con los péptidos favorece la salida de colesterol del macrófago. Esta salida está inducida por un aumento en la expresión del factor de transcripción PPAR-γ, que activa a su vez la expresión del transportador de membrana ABCA-1. Además, en el caso de VIP, el tratamiento de los macrófagos con el mismo inhibe la expresión del transportador de membrana CD36.

6.2.3.5 Cortistatina y VIP reducen la proliferación y migración de células musculares de aorta humana.

La última población de células involucradas en la formación de las placas ateroscleróticas que vamos a estudiar son las SMC. Estas células van a proliferar y migrar desde la lámina media a la íntima arterial, en respuesta a altas concentraciones de PDGF. Puesto que este tipo celular posee receptores para cortistatina y para VIP nos preguntamos si estarían influyendo de alguna manera en la migración o proliferación de estas células musculares. Para ello estudiamos *in vitro* el efecto que tienen cortistatina o VIP sobre la migración y proliferación de células musculares de aorta humanas, e hicimos un modelo de ligación completa de la carótida, modelo utilizado para el estudio de la proliferación de la lámina íntima *in vivo*.

En los ensayos *in vitro* observamos que el tratamiento con cortistatina o con VIP reduce la proliferación de las células musculares en respuesta a PDGF, obteniendo un efecto máximo inhibitorio a concentración de 10^{-8} M de ambos péptidos (Figura 63).

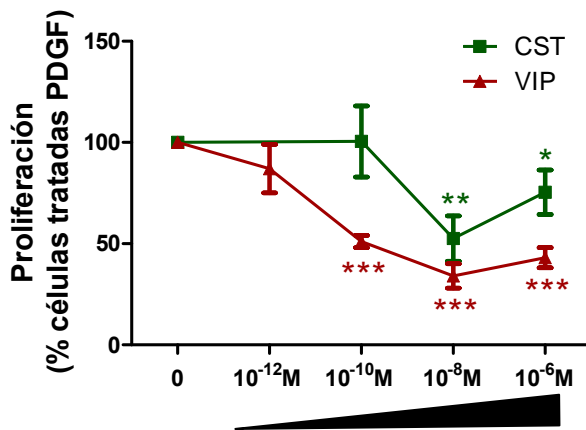


Figura 63. Cortistatina y VIP inhiben la proliferación de las hAoSMC. Ensayo de proliferación de hAoSMC en respuesta a PDGF de los distintos grupos de estudio. La proliferación se expresa como porcentaje de proliferación con respecto al control tratado con PDGF. N=3. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. CST=Cortistatina.

De modo similar, al incubar las células con cortistatina o VIP hay una inhibición en la migración de las mismas en respuesta a PDGF (**Figura 64**).

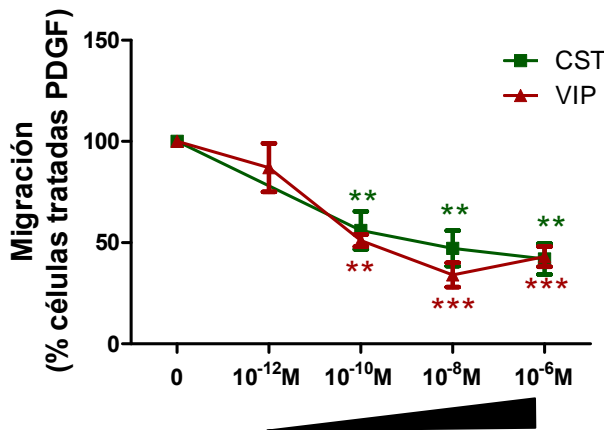


Figura 64. Cortistatina y VIP inhiben la migración de las hAoSMC. Estudio de la migración de hAoSMC en respuesta a PDGF en presencia o ausencia de CST o VIP. El resultado se muestra como porcentaje de células migradas respecto al control sin tratamiento con CST o VIP. N=3. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. CST=Cortistatina.

Una vez analizado el efecto *in vitro* de cortistatina y VIP sobre la proliferación y migración de las células de músculo liso nos preguntamos si *in vivo* el tratamiento con los péptidos tendrían un efecto similar. Para ello llevamos a cabo un modelo de ligación completa de la carótida, en el cual se puede ver cómo a partir del punto de la ligación, se va a producir un aumento en la capa íntima de las arterias, consecuencia de un aumento en la proliferación de las células musculares. En la **figura 65A** observamos que en los ratones del grupo control (tratados con PBS) hay un aumento en el área de la lámina íntima en la carótida ligada con respecto a la no ligada. El tratamiento de los ratones con cortistatina o con VIP reduce de forma significativa el área de la lámina íntima (**Figura 65B**) y la relación lámina íntima/lámina media (**Figura 65C**) en relación a los valores observados en los ratones del grupo control.

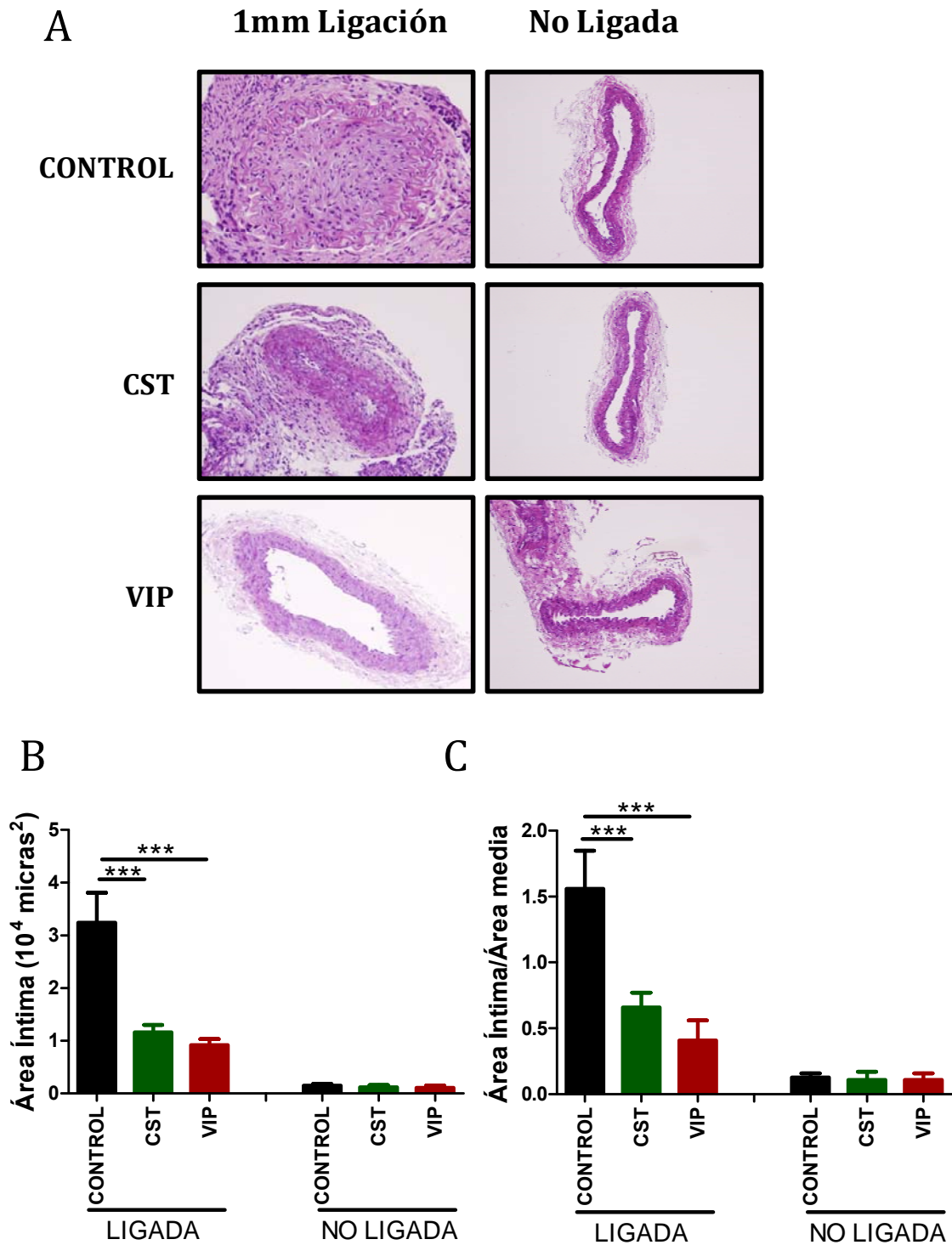


Figura 65. Cortistatina y VIP inhiben la proliferación de las células musculares en un modelo de ligación completa de la carótida. Tinción con H-E de cortes seriados de la carótida ligada y sin ligar de ratones FVB/NJ a los que se les ha practicado una ligación completa de la carótida izquierda, tratados o no con CST o VIP. (A) Imágenes de la carótida ligada y no ligada de los distintos grupos teñidas con H-E. (B) Área de la lámina íntima. (B) Relación área lámina íntima/lámina media. N=10 ratones/grupo. ***p<0,001. CST=Cortistatina.

Resumen

En esta última parte de los resultados hemos visto distintos mecanismos por los cuales tanto cortistatina como VIP podrían ejercer su efecto en la formación de placas ateroscleróticas. Por un lado, VIP reduce los niveles de colesterol en sangre en un modelo de aterosclerosis crónica (**Figura 54**). Por otro lado, el tratamiento con cortistatina o VIP afecta a cada una de las principales poblaciones celulares involucradas en la formación de lesiones ateroscleróticas. Así, el tratamiento de las células endoteliales con cortistatina reduce la unión de monocitos a las mismas y la trans migración de las células Th1 a través del endotelio aórtico. (**Figura 55 y 59**). De modo similar, el tratamiento con VIP de las células Th1 reduce la unión y trans migración de estas células a la aorta (**Figura 59**). Ambos neuropéptidos, cortistatina y VIP, actúan también sobre la formación de células espumosas, reduciendo el número de las mismas, consecuencia de un aumento en el eflujo de colesterol mediado por ABCA-1 (**Figuras 60-62**). Por último, ambos neuropéptidos ejercen un efecto inhibitorio sobre la proliferación y migración de SMC y en la formación de la lesión neoíntima (**Figuras 63-65**).

Por lo tanto, si ponemos en conjunto todos estos resultados, vemos que cortistatina y VIP influyen en cada población involucrada en la formación de placas ateroscleróticas, de modo que el efecto sinérgico de estas acciones, junto con el papel regulador de la respuesta inmunitaria, provoca el descenso en la formación de placas ateroscleróticas.

7 DISCUSIÓN

Según la OMS, las ECV constituyen la principal causa de muerte de todo el mundo. En 2008, representaban el 30% de las muertes registradas, y este porcentaje seguirá aumentando en las próximas décadas. Los tratamientos actuales van encaminados fundamentalmente a disminuir la principal causa de las mismas, que es la hipertensión, y en el caso de la aterosclerosis, también los altos niveles de colesterol en sangre y la formación de trombos. Así, son de primera elección el uso de diuréticos, de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, bloqueantes beta-adrenérgicos, anti-inflamatorios no esteroideos o inhibidores de la HMGCoA-reductasa (estatinas). Sin embargo estos tratamientos no palian completamente el problema cardiovascular, por lo que cada vez son más los estudios dedicados a la búsqueda de sustancias que frenen el componente inflamatorio de estas enfermedades.

CST y VIP son dos neuropéptidos que poseen una clara actividad anti-inflamatoria e inmunomoduladora (169), y cuyo papel protector se ha demostrado con anterioridad en otras enfermedades inflamatorias y autoinmunes como la artritis reumatoide (177, 211), EAE (214, 222) o enfermedad inflamatoria intestinal (178, 213). Durante el desarrollo de esta tesis doctoral hemos demostrado el efecto terapéutico de VIP y cortistatina en ECV que cursan con un componente inflamatorio y/o autoinmune, como MAE y la aterosclerosis.

7.1 Efecto terapéutico de cortistatina y VIP en MAE a través de la regulación de la respuesta inflamatoria y autoinmune

Muchas ECV están marcadas por la presencia de una respuesta autoinmune e inflamatoria, y esta respuesta contribuye al fallo cardiaco. En este sentido, la miocarditis se caracteriza por una infiltración de linfocitos y células mononucleares en el corazón, así como una producción de mediadores inflamatorios y autoanticuerpos circulantes. MAE es un modelo de miocarditis que mimetiza en roedores lo ocurrido en humanos durante la fase aguda de una miocarditis fulminante y durante la fase crónica de una cardiomiopatía prolongada. Es el uso de este modelo animal el que permite estudiar la patogénesis de la enfermedad así como el uso de posibles tratamientos.

La base molecular de MAE es la inmunización con un fragmento de la miosina cardiaca en ratones genéticamente susceptibles. Se genera una respuesta autoinmune frente a la miosina cardiaca en una fase más temprana, seguida de una respuesta inflamatoria en una fase más tardía. Se trata de una enfermedad mediada fundamentalmente por células T CD4⁺. Esta población va a jugar un papel central en la patogénesis de las enfermedades cardiacas, bien sea por un aumento de la citotoxicidad al aumentar las funciones inflamatorias de otros componentes celulares, o bien ayudando a la producción de auto-anticuerpos por medio de las células B. Se ha visto que la transferencia de células T CD4⁺ de ratones con

miocarditis activa, a ratones SCID, es capaz de transmitir la enfermedad, mientras que la depleción de células T CD4⁺ reduce la MAE (49).

Las células T CD4⁺, que van a ser inicialmente activadas en la periferia, se dirigen al corazón, donde desencadenan la respuesta autoinmune e inflamatoria. Esta respuesta se refleja en un aumento en la cantidad de infiltrados inmunitarios en el corazón, con un pico 21 días tras la primera inoculación del antígeno en un modelo de MAE. Como consecuencia de esta infiltración el corazón aumenta su tamaño, ya que la inflamación del mismo va a suponer una degeneración de los cardiomiocitos y el ventrículo izquierdo responde aumentando su tamaño para mantener la función sistólica. En este sentido hemos podido ver que en ratones tratados con CST o con VIP hay una menor relación entre el peso del corazón y el corporal con respecto a los ratones controles, lo cual es indicativo de un menor tamaño del corazón. El menor tamaño del corazón de los ratones tratados con CST o VIP es debido a que el número de infiltrados inmunitarios en el corazón es significativamente menor, presentando por tanto una mejora en la severidad de la patología.

Dentro de las subpoblaciones de células CD4⁺ involucradas en el desarrollo de la miocarditis, se les dio originariamente una especial importancia a las células Th1. De hecho, el tratamiento con IL-12 en ratas inoculadas con el péptido de la miosina cardiaca aumenta la miocarditis, lo que se correlaciona con un aumento en células Th1 (240). De modo similar, existe un pico en la población de células Th1 en la fase efectora de la enfermedad (50). Sin embargo, cada vez son más los trabajos que le confieren un mayor peso en el desarrollo de la patología a la población de células Th17. En este sentido, ratones deficientes en el factor de transcripción ROR- γ t, necesario para la diferenciación del linaje de células Th17, son resistentes a padecer la enfermedad (241). Sin embargo, ratones deficientes en en IFN- γ , en el receptor de IFN- γ o en el factor de transcripción T-bet, necesario para la diferenciación del linaje de células Th1, presentan un fenotipo más severo de MAE (242) (243, 244). Esto se puede deber a que la inhibición en la producción de IFN- γ conlleva un aumento en la producción de IL-17 y de otras citoquinas pro-inflamatorias (242). Independientemente de la importancia relativa de cada una de estas dos subpoblaciones de células Th1 y Th17, se ha visto que tratamientos, como estatinas o MSCs, que disminuyen la severidad de MAE reducen la generación de ambas poblaciones (245) (246).

En nuestro trabajo observamos que, de modo similar a lo descrito previamente en otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (177, 211), EAE (214, 222) o enfermedad inflamatoria intestinal (178, 213), CST y VIP actúan controlando la respuesta autoinmune e inflamatoria. Al estudiar la respuesta inmunitaria en los ganglios linfáticos que drenan el corazón, vemos que en los ratones tratados tanto con CST como con VIP, hay una reducción en el

porcentaje de células Th17, por lo que ambos péptidos podrían inhibir la diferenciación de este tipo celular. Además, hay evidencias indirectas que nos muestran que CST y VIP afectan a la proporción de otros subtipos de células T helper, como son las Th1 o las Th2.

En primer lugar, observamos que en los animales tratados con los péptidos hay una reducción en la producción de auto-anticuerpos IgG frente al fragmento de la miosina cardiaca. Encontramos que los niveles tanto de IgG1 como de IgG2a son menores en los ratones tratados, lo cual es una evidencia indirecta de la desactivación de células autorreactivas Th2 (IgG1) y Th1 (IgG2a). Aunque en otros sistemas y modelos, VIP induce la diferenciación y supervivencia de las células Th2 (172), el hecho de que los niveles de IgG1 en los ratones tratados con VIP disminuyan es indicativo de buen pronóstico en la enfermedad. La presencia de auto-anticuerpos frente a la miosina cardiaca es indicativa de daño al corazón. Es frecuente encontrar algún tipo de auto-anticuerpo frente a antígenos cardiacos en pacientes con cardiopatías (20), y, en el caso de ratones con MAE, existe una correlación entre la presencia de autoanticuerpos IgG para la miosina cardiaca y la severidad de la enfermedad (27). Por lo tanto, que el tratamiento con CST o con VIP disminuya los niveles de auto-anticuerpos en sangre es otro aspecto que contribuye al efecto terapéutico de los mismos en MAE.

En segundo lugar, encontramos que el tratamiento con CST o VIP es capaz de inhibir la producción de citoquinas tipo Th1 y Th17 por parte de células T CD4⁺ estimuladas con el antígeno de la miosina, tanto *in vivo*, en células provenientes de ratones tratados con CST o VIP, como *in vitro*, en células provenientes de ratones del grupo control estimulados *in vitro* con CST o VIP. Así vemos una disminución en las citoquinas tipo Th1, como IL2 o IFN- γ ; en las tipo Th17, como IL17; y en IP10, quimioquina secretada en respuesta a IFN- γ y que atrae a monocitos/macrófagos, células T, NK y DC. Por otro lado, estos péptidos inhiben la proliferación de las células T auto-reactiva, tanto *in vivo* como *in vitro*.

La disminución en la respuesta Th1 y Th17 por parte de CST y VIP es antígeno-específica, no generando una inmunosupresión general tras el tratamiento, permitiendo responder en caso de infección o daño. Así podemos observar que el número de células que hay en los ganglios linfáticos no varía en los ratones tratados con respecto a los controles, y que tras una estimulación policlonal todos los grupos de ratones van a ser capaces de responder produciendo citoquinas y proliferando. Queda por determinar si en este caso el efecto que vemos es directo sobre la población de células T, afectando a su activación, expansión clonal o diferenciación, o si por el contrario es un efecto indirecto, modulando a las células presentadoras de antígenos.

La generación de una respuesta antígeno-específica por parte de CST y de VIP en otras enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias (177, 211, 213, 214, 222) está mediada por la inducción de células Treg. CST y VIP generan Treg bien actuando directamente sobre células T o bien mediante la generación de tolDC (212). Puesto que el corazón es un órgano relativamente más resistente a la respuesta mediada por células T que otros órganos, cabe esperar que este tipo celular desarrolle su función en el mismo. Así, por ejemplo, el trabajo de Chen y colaboradores muestra como dos cepas de ratones con idéntico complejo mayor de histocompatibilidad presentan distinta susceptibilidad a padecer MAE, de modo que son más susceptibles aquellas que tienen un mayor porcentaje de células Th17 y un menor porcentaje de células Treg (247). Tratamientos encaminados a aumentar la tolerancia inmunológica frente a antígenos cardiacos protegen de padecer MAE. Por ejemplo, Frisancho-Kiss y colaboradores muestran cómo, al inocular antígeno de miosina junto con adyuvante incompleto de Freund en ratas, se genera resistencia a MAE debido a la producción de células T productoras de IL-10. Además, dicha protección es similar a la ocurrida cuando se transfieren DC provenientes de ratas en las que se ha creado tolerancia en ratas *naive* (248). Sin embargo, aún son pocos los trabajos encaminados a estudiar la intervención de este tipo celular en miocarditis, quedando todavía un amplio campo de investigación abierto. Es más, tratamientos que en otras enfermedades autoinmunes e inflamatorias son beneficiosos, al aumentar la producción de células Treg, no son capaces de tener el mismo efecto en MAE. Así por ejemplo, González y colaboradores muestran como MSCs derivadas de tejido adiposo protegen en un modelo de inflamación crónica intestinal a través de la inhibición de células Th1 y la activación de células Treg (249). El trabajo de Ohshima y colaboradores muestra que el tratamiento con MSCs en MAE es beneficioso, debido más a una inhibición de las células Th1 y Th17 que a un aumento en células Treg (246). Este hecho podría indicarnos, que en ECV existen mecanismos de regulación inmunitaria que no necesariamente cursan con un aumento en la población de células Treg.

En nuestro trabajo vemos que el tratamiento con CST o VIP de los ratones con MAE no aumenta la proporción de células Treg. Sin embargo, al haber una reducción en las respuestas Th1 y Th17, el balance final Treg/Th1-Th17 nos lleva a una situación de homeostasis inmunológica, donde las poblaciones celulares estarían en una proporción similar a las encontradas en un ratón *naive*. No obstante, no podemos descartar que en fases anteriores de la enfermedad, cuando se desencadena la respuesta inmunitaria, no exista un aumento en la diferenciación de las mismas.

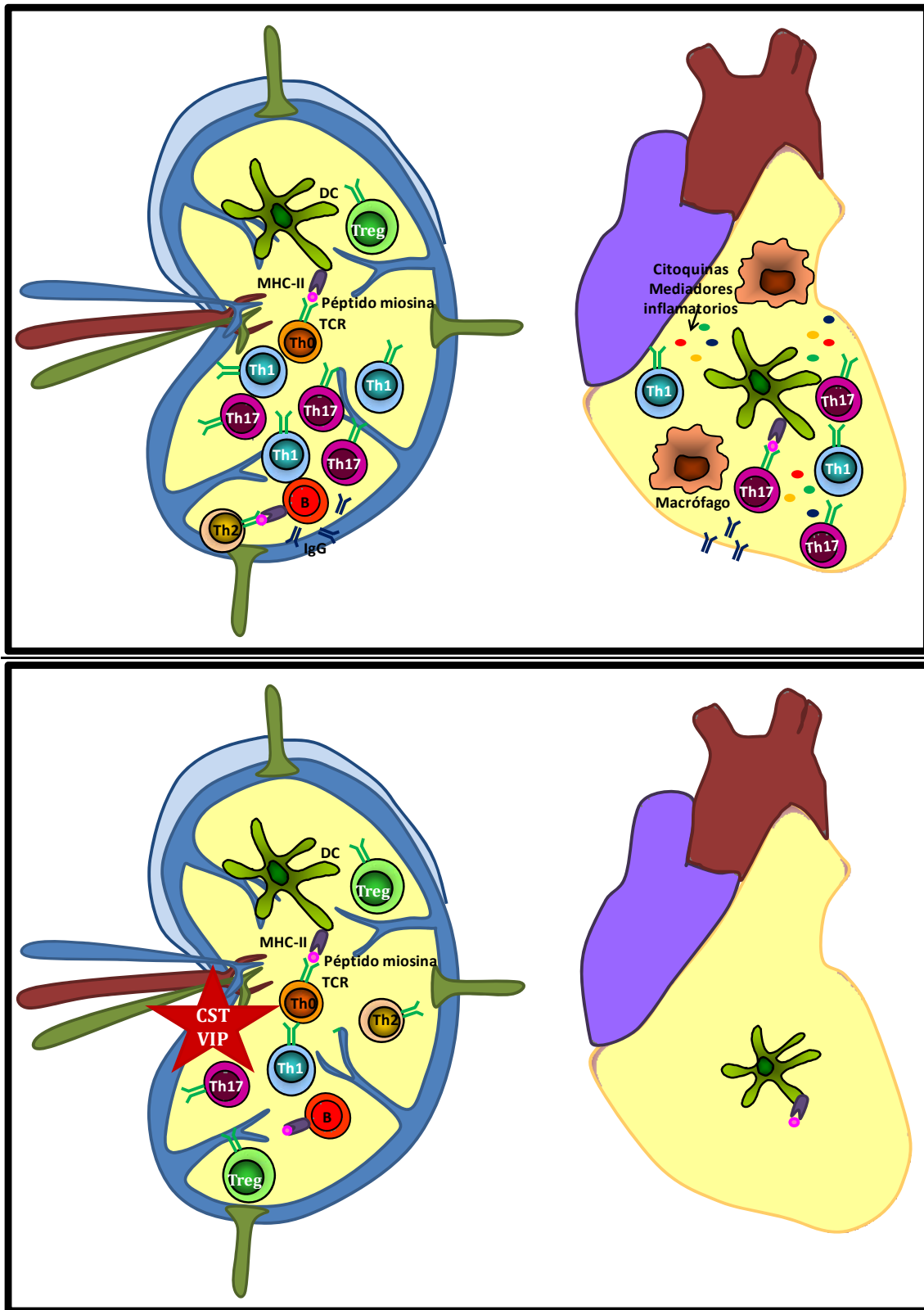


Figura 66. Efecto terapéutico de cortistatina y VIP en Miocarditis Experimental Autoinmune. A. La inmunización con el péptido de la miosina cardiaca provoca una activación de las DC en los ganglios linfáticos, las cuales van a presentar el antígeno de la miosina unido a MHC-II a las células Th naive, favoreciendo su diferenciación hacia células Th1 y Th17, fundamentalmente. Estas células van a migrar hasta el corazón, donde

reconocerán al antígeno de la miosina, se activarán, y liberarán citoquinas y mediadores inflamatorios. Este ambiente favorece además la infiltración en el miocardio de otras células inmunitarias, fundamentalmente macrófagos. También hay una activación de las células B que van a producir anticuerpos IgG frente a la miosina cardiaca. **B.** El tratamiento con cortistatina (CST) o con VIP va a inhibir la respuesta inflamatoria en los ganglios linfáticos mediante un descenso en la población de células Th17 y Th1 cardiomiogénicas, a la vez que mantiene el número de células Treg, generando una situación de tolerancia inmunológica. También inhiben la producción de auto-anticuerpos frente a la miosina cardiaca. Como consecuencia de estos procesos va a disminuir la infiltración de células inmunitarias en el corazón y el daño del mismo.

7.2 Efecto terapéutico de VIP y cortistatina en aterosclerosis a través de regulación de la fase efectora de la respuesta inmunitaria

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por la formación de placas ateroscleróticas en las arterias. Son varios los factores implicados en la formación de las placas, entre los cuales destaca la elevada concentración de colesterol en sangre. Los distintos modelos animales utilizados para el estudio de esta enfermedad se basan en la potenciación de los distintos factores. Nosotros utilizamos dos modelos, uno más crónico y lipogénico, basado en la formación de placas debido a una elevada concentración de colesterol en sangre; y otro más agudo, de ligación parcial de la carótida donde, además de la elevada concentración de colesterol en sangre, se crea un flujo irregular y oscilante en una zona concreta que favorece la formación de placas en dicha zona.

Usando estos modelos hemos podido comprobar que tanto CST como VIP tienen un papel terapéutico en aterosclerosis, el cual se manifiesta con un descenso en la formación de placas ateroscleróticas, tanto en un modelo de aterosclerosis agudo, como en un modelo de aterosclerosis crónico.

Sabemos que la respuesta inflamatoria juega un papel decisivo en el desarrollo de esta enfermedad, y que un buen tratamiento de la misma pasa por frenar esta respuesta (146). En nuestro trabajo hemos visto, al medir la producción de citoquinas y quimioquinas en la carótida tras su ligación, que el tratamiento con CST o VIP inhibe la producción de mediadores inflamatorios a nivel local. El descenso en la producción de IFN γ , IL-17, MCP-1 o IP-10 puede deberse a que el tratamiento con los péptidos inhibe la formación de placas, reduciéndose la infiltración de células inmunitarias en la pared arterial. Además, al estudiar la respuesta inmunitaria en los ganglios linfáticos que drenan la zona de lesión, comprobamos que tanto CST como VIP reducen el número total de células que forman los ganglios, así como la proporción de las células con perfil pro-inflamatorio Th1 y Th17 en los mismos, tanto en el modelo agudo de aterosclerosis como en el crónico.

Las células T CD4⁺ están presentes en todas las fases de la aterosclerosis, y la mayoría de estas células son células Th1 productoras de IFN γ (250). Son varios los trabajos que muestran como una reducción en la población de células Th1 es beneficiosa para frenar el desarrollo de la enfermedad. Un ejemplo de ello es el trabajo presentado por Laurat y colaboradores donde muestran que, inhibiendo la diferenciación hacia Th1 con pentoxifilina, se disminuye la formación de placas ateroscleróticas (251). De igual modo, Buono y colaboradores muestran como ratones deficientes en el factor de transcripción T-bet poseen lesiones ateroscleróticas menores que los ratones salvajes (127). A la hora de estudiar el papel de las células Th17 en esta enfermedad descubrimos que éste no queda exento de controversia. Por un lado hay trabajos como el de Taleb y colaboradores que muestran un papel ateroprotector para IL17, de modo que la inhibición de SOCS3, que provoca un aumento en la producción de IL-17, o el uso de IL-17 recombinante en ratones, producen un descenso en el tamaño de las lesiones (91). Por otro lado, hay trabajos como el de Erbel y colaboradores, o como el de Smith y colaboradores, que muestran como la inhibición de IL-17 atenúa la formación de lesiones ateroscleróticas (135, 231). Nosotros hemos comprobado que en nuestro caso, el papel ateroprotector de CST y VIP se debe en parte a la inhibición de la población de células Th1 y Th17.

Al igual que en otras enfermedades inflamatorias y autoinmunes, también en aterosclerosis las células Treg juegan un papel fundamental, de modo que la inducción de las mismas es ateroprotectora (252), mientras que la depleción o inhibición de estas células conlleva un aumento en la formación de placas ateroscleróticas (253). Maganto-García y colaboradores demostraron que la alimentación de los ratones con una dieta hipercolesterolémica favorece un aumento en el número de células Treg a nivel de órganos linfoides secundarios, con respecto a una alimentación con una dieta normal (138). En nuestro estudio, los ratones tratados con CST o con VIP en un modelo agudo de aterosclerosis mantienen la proporción de células Treg a nivel de ganglios linfáticos con respecto a los ratones del grupo control. Puesto que en tratamiento con los neuropéptidos disminuyen la generación de células Th1 y Th17, el hecho de que el porcentaje de células Treg se mantenga invariable nos está indicando que el balance entre estas poblaciones celulares resulta positivo a favor de las Treg, mostrando una situación de tolerancia inmunológica. A nivel del modelo crónico de aterosclerosis lo que tenemos es una situación de normalización, en la que el tratamiento con los péptidos va a provocar una situación en la que ni las células T inflamatorias (Th1/Th17), ni las Treg, están aumentadas. Este efecto se debe a que el tratamiento con los péptidos ha actuado sobre la respuesta inmunitaria en la fase efectora de la enfermedad, reduciendo la respuesta inflamatoria en estos ratones, tal y como se demuestra en el modelo agudo de la misma. En aterosclerosis, los auto-antígenos fundamentales son oxLDL y HSP60. Sin embargo, la inoculación de estos antígenos no es suficiente para desarrollar la enfermedad en un modelo

animal. Tampoco la estimulación *in vitro* con estos antígenos desencadena una activación de las células T detectable, lo cual dificulta la posibilidad de estudiar la especificidad de la respuesta antigénica en aterosclerosis y por tanto un cambio a nivel de la producción de células Treg antígeno-específicas. La actuación de CST y VIP sobre el control de la respuesta inmunitaria en el desarrollo de aterosclerosis es fundamental, ya que si retrasamos el tratamiento a un punto posterior a la fase efectora de la enfermedad, no somos capaces de reducir la severidad de la misma.

7.3 ¿Cómo regulan VIP y cortistatina la respuesta inmunitaria en MAE y aterosclerosis?

Tanto CST como VIP ejercen su acción por unión a receptores, y ambos poseen receptores en varias células del sistema inmunitario como son células T, monocitos, macrófagos, DC o células polimorfonucleares. Las principales células del sistema inmunitario que van a mediar la respuesta inflamatoria en ambas enfermedades son las células T y los macrófagos.

Nosotros hemos visto que, tanto en el modelo de MAE como en los de aterosclerosis, CST y VIP van a disminuir la respuesta inflamatoria mediada por células Th1 y Th17. Si bien el efecto que ejercen CST y VIP sobre las células Th1 está bien estudiado, el efecto sobre las células Th17 es menos conocido. Sabemos que ambos neuropéptidos son capaces de inhibir la expansión clonal de linfocitos T al influir en la expresión de moléculas coestimuladoras en las células presentadoras de antígenos, así como de inhibir la producción de IFN- γ e IL-2 por las células Th1 (184). Un trabajo publicado por Su Z. y colaboradores muestra como una disminución en la producción de células Th17 consecuencia de la inhibición de HMGB-1, un mediador tardío de la inflamación secretado por macrófagos, monocitos y DC, es capaz de mejorar MAE (254). VIP inhibe la expresión de HMGB-1 en un modelo de sepsis y artritis reumatoide (255), por lo que éste podría ser uno de los mecanismos por los que VIP estaría actuando en la desactivación de la población de células Th17.

Los macrófagos, la otra gran población de células inmunitarias presentes en estas enfermedades, constituyen el 40% de los infiltrados cardiacos a día 21 en el modelo de MAE, y son los leucocitos mayoritarios en todos los estados de la aterosclerosis. La acción anti-inflamatorias de CST y VIP sobre los macrófagos en el contexto de estas enfermedades no ha sido determinada en el transcurso de esta tesis doctoral. Sin embargo, se conoce que tanto CST como VIP poseen receptores en esta población celular y actúan sobre ellos disminuyendo la infiltración leucocitaria, la expresión de moléculas coestimuladoras y la respuesta inflamatoria (184). Por tanto, el hecho de que CST y VIP pudieran estar desactivando la respuesta inflamatoria a este nivel contribuye al efecto anti-inflamatorio de ambos neuropéptidos.

La principal ruta por la cual ejercen su acción anti-inflamatoria es mediante un aumento en la producción de cAMP intracelular, el cual se desencadena tras la unión de VIP a VPAC1, VPAC2 o PAC1, así como la unión de CST al receptor de la grelina GHSR. Por su parte, la unión de CST a los receptores de SST también promueve una acción anti-inflamatoria por una ruta independiente de AMPc (184). El principal receptor de SST encontrado en las placas ateroscleróticas colocalizando con los macrófagos infiltrados es el SSTR-2 (256), por lo que debe ser este receptor, junto con el GHSR, sobre el que CST ejerza su acción en los macrófagos presentes en la placa aterosclerótica.

En el caso de VIP se ha visto que un aumento en la concentración de cAMP conlleva, entre otras cosas, la inactivación del factor de transcripción NF- κ B, esencial para la expresión de mediadores inflamatorios como las citoquinas y quimioquinas (212). El papel de este factor de transcripción es fundamental para el desarrollo tanto de MAE como de la aterosclerosis. Existe una correlación directa entre la expresión de NF- κ B y la incidencia de miocarditis y el proceso inflamatorio en pacientes (257). Además, hay trabajos que muestran una disminución de la severidad de MAE como consecuencia de una inhibición en la expresión o activación de NF- κ B, como es el caso del tratamiento con fluvastatina (258). También en aterosclerosis, una inhibición en la activación de NF- κ B provoca un descenso en las lesiones, las cuales van a tener además un fenotipo más estable (259).

Son varios los agentes que buscan inhibir la respuesta inflamatoria. Así, en el caso de MAE, se ha visto que el bloqueo de TNF- α o de IL-1 β disminuye la evolución si el tratamiento se establece en el inicio de la enfermedad (39). También se ha visto que un bloqueo de ciertas quimioquinas, como MCP-1 o MIP-1 α , con anticuerpos monoclonales reduce la severidad de la enfermedad, efecto similar al encontrado en ratones deficientes en los genes que codifican para sus receptores CCR2 y CCR5 (260). En aterosclerosis también se están usando agentes anti-inflamatorios como tratamiento, que van desde el uso de bloqueantes de citoquinas como TNF- α (161) o IL-1 β (162), o de receptores de quimioquinas como CCR2 (261), hasta el uso de estatinas con función anti-inflamatoria (160). El hecho de que CST y VIP inhiban la expresión de quimioquinas y sus receptores podría significar una menor migración de las células inflamatorias a los puntos de actuación, como son en nuestro caso el corazón o la lámina íntima de las arterias en los puntos de formación de placas. Además, el tratamiento con CST o con VIP sería ventajoso con respecto a tratamientos que buscan inhibir un factor inflamatorio concreto, ya que CST y VIP son capaces de modular varios factores a la vez y, además, de un modo específico de antígeno.

Para el desarrollo de las placas ateroscleróticas es necesaria la infiltración de células inmunitarias a la capa íntima de las arterias, fundamentalmente células Th1

y monocitos (85). También en el modelo de miocarditis es fundamental la infiltración de estas dos poblaciones celulares. Hemos podido comprobar que el tratamiento con CST y con VIP provoca una disminución en la unión de estos tipos celulares al endotelio vascular. Así, cuando se tratan las células endoteliales con CST vemos que éstas disminuyen la expresión de P-selectina, lo cual favorece un descenso en la unión de monocitos *in vitro*. El papel proaterogénico de P-selectina ha sido descrito en varias ocasiones. Ratones deficientes en P-selectina presentan una menor adhesión y rodamiento de los leucocitos en la pared arterial y desarrollan lesiones de menor tamaño (262, 263). Tratamientos que producen un descenso en la expresión de P-selectina están relacionados con una mejora en la patología de la aterosclerosis, tal y como muestra el trabajo de Phillips y colaboradores, donde bloqueando tanto P-selectina como su ligando PSGL-1, reducen la formación de lesiones (264). Actualmente existen dos ensayos clínicos que buscan estudiar el efecto de la inhibición de P-selectina en pacientes (NCT01245634) y la correlación del volumen de las placas ateroscleróticas con la presencia de P-selectina soluble (NCT01895725). También se ha visto el papel de P-selectina en los procesos inflamatorios del corazón (265). Por lo tanto, un descenso en la expresión de esta molécula de adhesión va a resultar beneficioso tanto en aterosclerosis como en MAE. Además del descenso en la unión de monocitos al tratar las células endoteliales, hemos visto que el tratamiento de las aortas con CST, en un ensayo *ex-vivo*, también favorece un descenso en la unión de células Th1. Por lo tanto, el tratamiento con CST favorece un descenso en la infiltración de dos de las principales poblaciones celulares involucradas en la aterosclerosis y en MAE, especialmente a través de la regulación de la funcionalidad de las células endoteliales que expresan receptores para cortistatina (266). Aunque VIP parece no regular el tráfico celular en las arterias a nivel endotelial, por la ausencia de receptores específicos para VIP en las mismas (191), este péptido es capaz de modificar la capacidad de unión y trans migración endotelial en células Th1. Este efecto de VIP podría estar mediado a nivel periférico durante el proceso de diferenciación/generación de células Th1 en ganglios linfáticos. El mecanismo de acción, probablemente regulación de la expresión de los receptores de moléculas de adhesión en células Th1, está aún por determinar, así como si VIP afecta de igual forma a células Th17.

7.4 VIP y cortistatina regulan otros procesos claves en el desarrollo de la aterosclerosis

Nuestro trabajo de investigación muestra que, además de modular la respuesta inmunológica efectora en aterosclerosis, VIP y cortistatina regulan tres procesos claves en el desarrollo de esta patología, como son los niveles circulantes de colesterol, la formación de células espumosas y la proliferación y migración de SMCs en la lámina íntima arterial.

Los niveles elevados de colesterol en sangre son la principal causa de formación de lesiones ateroscleróticas. En nuestro trabajo observamos que, en el caso de VIP, éste es capaz de reducir los niveles de colesterol en sangre en los ratones tratados (**Figura 29**). Este dato concuerda con el trabajo de Yu,RJ y colaboradores, el cual muestra como el uso de agonistas del receptor de VPAC1 en ratones obesos NIH disminuye los niveles de colesterol en sangre (267). Ellos relacionan esta disminución con un descenso en la ingesta de alimentos, algo que no hemos observado en nuestro estudio (datos no mostrados). Los mecanismos por los cuales favorece un descenso en la concentración de colesterol en sangre de los ratones tratados están por determinar, si bien, VIP es un neuropéptido que interviene en el metabolismo celular, activando glucogenolisis o lipolisis (268, 269).

Otros de los grandes componentes en la formación de placas ateroscleróticas son las células espumosas, fundamentales en el inicio y desarrollo de las lesiones (85). Nosotros comprobamos que tanto VIP como CST son capaces de reducir la formación de células espumosas. En la formación de células espumosas están involucrados distintos transportadores de membrana y factores de transcripción, que crean un flujo de colesterol, el cual entra en forma de oxLDL y sale en forma de HDL, que será captado por el hígado para su excreción como sales biliares. No obstante, este flujo de colesterol no es igual en ambas direcciones, acumulándose el mismo en el interior del macrófago, dando lugar a la formación de células espumosas. Para que haya una reducción en el número de células espumosas deben darse alguno de los siguientes requisitos: que disminuya la entrada de oxLDL al macrófago y/o que aumente la salida de colesterol del macrófago; o bien, que haya un cambio en el metabolismo del mismo dentro del macrófago, es decir, en las encimas encargadas en su esterificación (Acil-CoA Colesterol Aciltransferasa) y en la formación de colesterol libre (Citocromo P450 oxidasa). En este estudio hemos visto que el tratamiento con los péptidos favorece una salida de colesterol por parte del macrófago mediada por la acción de la apoA1. El hecho de que el receptor de colesterol sea la apoA-1 nos indica que la salida del mismo está mediada por ABCA-1 (270). En este sentido, observamos que el tratamiento con CST o VIP producía un aumento en la expresión de este transportador de membrana. Además, en el caso de VIP también hay una reducción en la expresión de CD36, receptor involucrado en la entrada de colesterol al macrófago.

La expresión de ABCA-1 depende del factor de transcripción PPAR γ , que activa a su vez al factor de transcripción LXR α , y esta activación conlleva a un aumento en la expresión de ABCA-1 y del eflujo de colesterol del interior celular (271). Nosotros hemos comprobado que el aumento de ABCA1 mediado por CST y VIP se correlaciona con un aumento en la expresión de PPAR γ . Sin embargo, el modo mediante el cual los neuropéptidos aumentan la producción de PPAR γ está por determinar porque, si bien en adipocitos se ve que PKA, la cual es activada por CST y VIP, aumenta la expresión de PPAR γ (272), no se ha visto un efecto similar

en macrófagos. No obstante se sabe que la expresión de ABCA-1 está mediada por un aumento en la cantidad de AMPc (273), y que una deficiencia en este transportador de membrana produce un aumento en la formación de las lesiones ateroscleróticas en un modelo animal de ratón (274). Por lo tanto, un aumento en el eflujo de colesterol, tal y como vemos cuando tratamos los macrófagos con CST o VIP, va a favorecer una reducción en el tamaño de las lesiones ateroscleróticas. Este es otro punto que contribuye al efecto anti-aterogénico presentado por CST y por VIP. Interesantemente, se ha observado que ghrelina inhibe la formación de células espumosas mediante una disminución en la expresión de la enzima ACAT-1 y un aumento en la expresión de ABCA-1, mediada por un aumento en la expresión de PPAR γ (275). Puesto que ghrelina y cortistatina comparten el receptor GHSR, este estudio podría ser una confirmación del dato que obtenemos *in vitro* al usar CST en la formación de células espumosas.

La última gran población celular involucrada en la formación de placas ateroscleróticas son las células musculares. Durante la formación de la placa aterosclerótica, las SMCs van a proliferar y migrar desde la capa media hacia la íntima donde van a formar la capa fibrosa que delimita la placa aterosclerótica (85). Su papel en la estabilización de la placa presenta ciertas controversias, aunque son varios los autores que proponen el control de la proliferación y migración de las células de músculo lisa como una estrategia para limitar la progresión de la enfermedad. Así, un descenso en la proliferación y migración de las células musculares en la lámina íntima arterial, mediado por la inhibición de la β -arrestina 2, disminuye la formación de lesiones ateroscleróticas y la hiperplasia de la lámina íntima en un modelo de ligación de carótida (193).

Las SMCs expresan receptores para VIP, siendo VPAC1 el más representado (191, 276), y para CST (277), tanto receptores de somatostatina, mayoritariamente SST2 (277), como el receptor de grelina GHSR (278). Además, VIP es capaz de inhibir la proliferación de SMCs humanas a través de un aumento en la producción de AMPc (279). Nuestro estudio muestra que VIP y CST inhiben la proliferación y la migración de SMCs tanto *in vitro* como *in vivo*, otro modo mediante el cual ambos neuropéptidos están controlando la formación de placas ateroscleróticas. Se ha descrito que la inhibición de la proliferación por parte de estos neuropéptidos está mediada por un aumento en la cantidad de AMPc en el interior celular (278, 279). Por su parte, la migración de SMCs estimulada por PDGF está mediada por un aumento en la concentración intracelular de Ca²⁺ (280). En el caso de CST sabemos que esta inhibición en la migración la ejerce mediante una disminución en la concentración de Ca²⁺ intracelular, la cual es dependiente del receptor GHSR (278). Por el contrario, no hay hasta la fecha publicaciones que muestren que VIP es capaz de inhibir la migración de este tipo celular. Sin embargo, hay trabajos que muestran que el efecto vasodilatador de VIP en algunas especies está relacionado con la hiperpolarización de la membrana celular de SMCs, lo cual reduce la entrada de

calcio y su concentración intracelular (281), siendo este mecanismo por el cual VIP está inhibiendo también la migración de las hAoSMC.

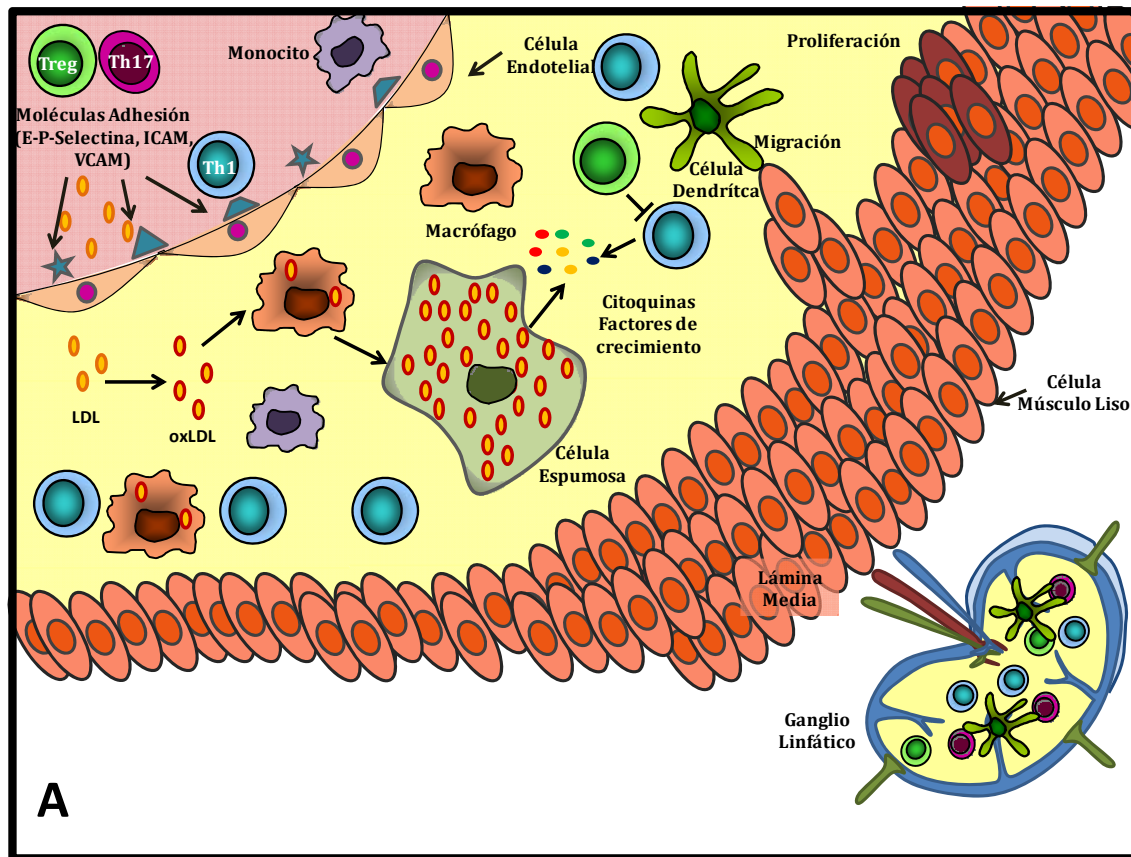


Figura 67. Efecto terapéutico de cortistatina y VIP en aterosclerosis. A. El estrés causado por el flujo sanguíneo sobre las células endoteliales va a aumentar la permeabilidad de las mismas, permitiendo que el LDL se extravase desde el torrente sanguíneo a la capa íntima arterial, donde va a ser oxidado. El oxLDL estimula la producción de moléculas de adhesión por las células endoteliales, favoreciendo la infiltración de células inmunitarias, fundamentalmente células Th1 y monocitos, que se diferencian a macrófagos. Los macrófagos van a fagocitar al oxLDL convirtiéndose en células espumosas. Las distintas células infiltradas van a producir mediadores inflamatorios que van a favorecer la proliferación de las células de músculo liso y su migración a la lámina íntima. Las células dendríticas presentes en la placa van a captar los autoantígenos generados de novo en la placa (fundamentalmente oxLDL y HSP60) y van a migrar a los ganglios linfáticos donde activarán a linfocitos T favoreciendo una respuesta inflamatoria.

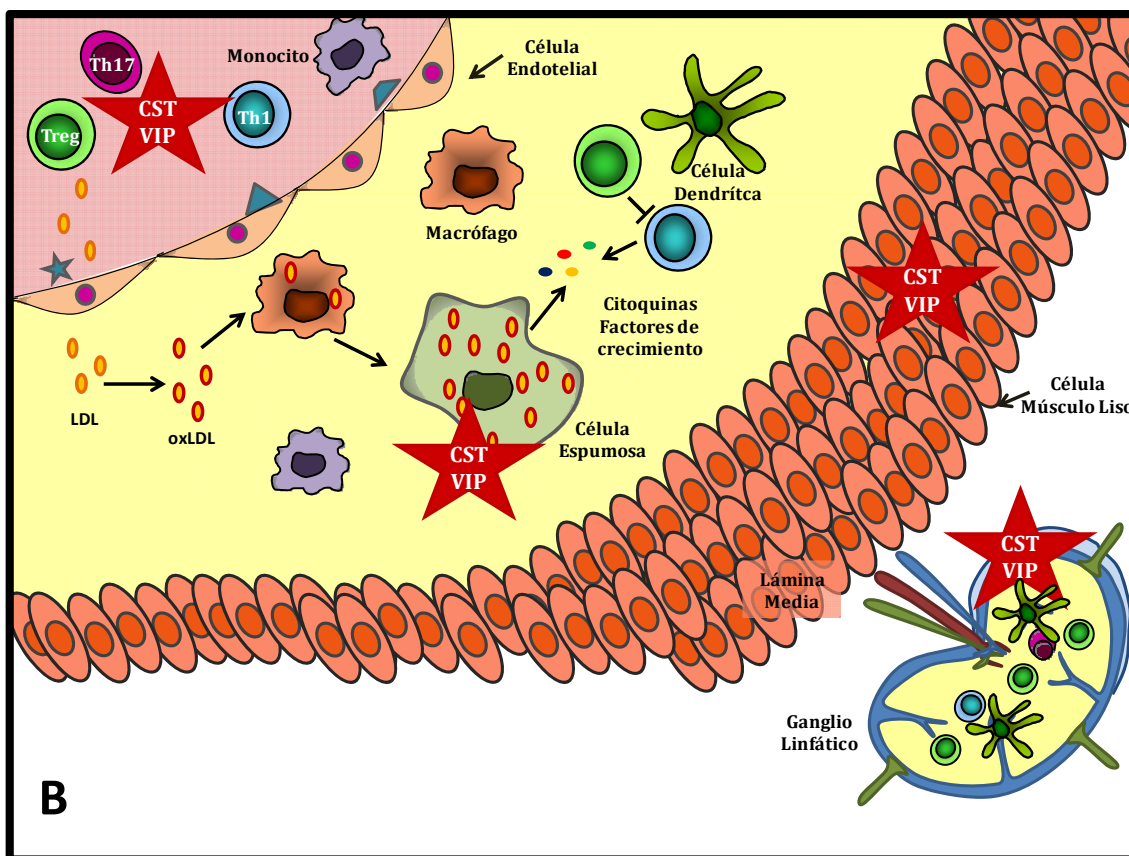


Figura 2. Efecto terapéutico de cortistatina y VIP en aterosclerosis. B. El tratamiento con cortistatina (CST) o con VIP reduce la formación de la placa a distintos niveles. En primer lugar, inhiben la generación/activación de células Th1 y Th17 a nivel de ganglios linfáticos, disminuyendo la respuesta inflamatoria. En segundo lugar, inhiben la adhesión de células inmunitarias a las células endoteliales y su consiguiente trans migración. En tercer lugar, disminuyen la formación de células espumosas. En cuarto lugar, inhiben la proliferación y migración de células de músculo liso desde la lámina media hacia la íntima. Por su parte VIP también favorece una bajada en los niveles de colesterol en sangre.

7.5 Receptores implicados en el efecto de cortistatina y VIP en MAE y Aterosclerosis

Aunque el estudio de los receptores implicados en los efectos de VIP y cortistatina en MAE y aterosclerosis no ha abordado en esta tesis, existen evidencias indirectas que apoyarían la participación múltiple de varios de sus receptores. Dentro de la misma familia, hay otros miembros que comparten receptores con estos neuropéptidos, como son somatostatina y ghrelina con CST, o PACAP con VIP. Todos estos neuropéptidos son anti-inflamatorios y todos ellos ejercen una función en el sistema cardiovascular, como por ejemplo, mejorar la función cardíaca (282, 283). Si bien el efecto de los mismos no se ha estudiado en miocarditis, si se han hecho diversas aproximaciones para estudiar el efecto de estos péptidos en aterosclerosis, afectando a distintos componentes de la enfermedad. Así, PACAP podría afectar en el desarrollo de esta enfermedad al

inhibir *in vitro* la proliferación de las SMC, así como el daño morfológico causado por una alta concentración de lípidos en células endoteliales y SMCs. Sin embargo, no se han realizado estudios posteriores que ahonden en el efecto de PACAP en aterosclerosis. Interesantemente, un trabajo anterior reportado por Sheikine y colaboradores describía que mientras el tratamiento con VIP de ratones ApoE^{-/-} en ausencia de una dieta hiperlipidémica únicamente en la primera fase de la enfermedad no afectaba a la formación de placas ateroscleróticas (284) (similar a nuestros resultados), la administración de un agonista del receptor VPAC1 aumentaba la formación de lesiones a nivel de arco aórtico pero no a nivel de aorta descendente. En este mismo estudio, se describe que VPAC2 es el receptor mayoritario de VIP en la aorta durante el desarrollo de la aterosclerosis, por lo que el efecto de VIP podría estar mediado fundamentalmente por la activación de este receptor. Por lo tanto, el uso de un agonista específico para uno de los receptores podría resultar en efectos contrarios a los generados por el péptido natural que actúa a través de los distintos receptores.

En el caso de somatostatina, se ha visto que existe una relación inversa entre la concentración de somatostatina en plasma y el índice de aterosclerosis medido como concentración de lípidos en sangre (285). También se ha visto que somatostatina inhibe la proliferación, pero no la migración, de SMC (278). Los estudios con ghrelina son más numerosos y abordan distintos aspectos de la enfermedad. Por ejemplo, se ha descrito que ghrelina inhibe la contracción, proliferación y migración de SMC aórticas (278, 286), disminuyen la adhesión de monocitos al endotelio vascular en presencia del estímulo inflamatorio (287), y la formación de células espumosas (82, 275). En modelos animales de aterosclerosis se ha visto que hexarrelina, un análogo sintético de ghrelina, es capaz de inhibir la formación de lesiones ateroscleróticas en ratas a las que se les induce la enfermedad con una dieta hiperlipidémica (288). Sin embargo, la vacunación con ghrelina de ratones LDLR^{-/-} no provoca ningún cambio en la formación de lesiones ateroscleróticas (289), así como la deficiencia en GHSR en ratones LDLR^{-/-} tampoco afecta a la formación de las lesiones (290).

7.6 Papel endógeno de CST y VIP en Miocarditis Autoinmune y Aterosclerosis.

El papel endógeno de CST y VIP en miocarditis autoinmune y en aterosclerosis está por determinar, aunque la presencia de los mismos, así como sus receptores, en el sistema cardiovascular hace pensar que pudiesen afectar a ambas patologías.

En el caso de VIP, éste se libera por terminaciones nerviosas en el corazón así como en vasos coronarios (282), y hay presencia de VPAC1, VPAC2 y PAC1 en los cardiomiocitos, en fibroblastos cardiacos, en terminaciones nerviosas del corazón, y en las células de músculo liso de los vasos sanguíneos (282). Además de actuar como vasodilatador, VIP regula el flujo sanguíneo coronario e induce relajación en

la aorta (282). Por otro lado, hay trabajos que muestran una asociación entre niveles bajos de VIP en sangre con la presencia de fibrosis cardiaca (291), cardiomiopatía diabética (292) y fallo cardiaco de peor pronóstico (293). Además, se ha visto que la deficiencia de VIP provoca hipertensión pulmonar idiopática en ratones (294) y en humanos (295), además de un aumento en la proliferación de las SMC y en el remodelamiento de la pared vascular (295). El estudio de la deficiencia de VIP en otras enfermedades autoinmunes e inflamatorias ha mostrado un resultado paradójico, ya que ratones VIP^{-/-} son más resistentes a padecer EAE, a pesar de que tienen una respuesta autorreactiva Th1 y Th17 más exacerbada, aunque tienen una menor capacidad de infiltrarse en el SNC (296). También son más resistentes a padecer endotoxemia, a pesar que en pulmón tienen grados mayores de inflamación (297). Este efecto podría deberse a que estos ratones poseen un defecto intrínseco en la expresión de NF-κB, así como a un posible efecto compensatorio en la producción de otros neuropéptidos o mediadores anti-inflamatorios.

En el caso de CST, ésta tiene receptores tanto en el corazón como en las arterias. En este sentido se ha visto que en el corazón se expresan 4 de los 5 receptores de SST, concretamente SST-1, -2, -4 y -5 en fibroblastos cardiacos y SSTR-1 y-2 en cardiomiocitos (298). La expresión de GHSR está restringida a las células endoteliales que forman las válvulas del corazón y a las fibras nerviosas presentes en los ganglios cardiacos (299). Por otro lado, SSTR-2 se expresa en células endoteliales de arterias coronarias humanas (266), en los macrófagos de las placas ateroscleróticas (256), y en SMCs, células en las cuales también se ha detectado la expresión de GHSR1 (278). Dentro de las placas ateroscleróticas humanas se ha detectado la expresión de CST (278), evidencia directa de que dicho neuropéptido ejerce una función en esta enfermedad. Por otro lado, la deficiencia en CST produce un aumento en la formación de capa neointima arterial en ratones (278). También se ha visto que en pacientes con enfermedades coronarias hay un aumento de la concentración de CST en sangre (300), lo cual se entiende más como una consecuencia que como una causa de la enfermedad. Por último, la deficiencia en cortistatina ha generado de nuevo un efecto paradójico, ya que ratones CST^{-/-} son más resistentes a sufrir enfermedades inflamatorias y autoinmunes de afección no local, como EAE, artritis reumatoide, colitis y sepsis, a pesar de tener respuestas auto-reactivas y respuestas inflamatorias locales más exacerbadas (214). En este caso, los datos indican que este efecto se debe a un estado crónico de estrés en estos animales y consecuentemente, una elevación de los niveles circulantes de glucocorticoides por la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (214).

Por lo tanto, podríamos decir que ambos péptidos podrían estar regulando endógenamente el desarrollo de estas enfermedades, y el defecto de los mismos conlleva una serie de cambios en el ratón que nos da una idea del complejo sistema

de comunicación molecular que se dan en los organismos para conseguir la homeostasis corporal. Sin embargo, se necesitan estudios de inducción de aterosclerosis y MAE en ratones deficientes en VIP y cortistatina.

7.7 Estrategias para el uso de CST y VIP en clínica.

Una de las posibles desventajas de CST o de VIP en la aplicación futura en clínica en ECV es su alta sensibilidad a las peptidasas del suero. Sin embargo, son varias las estrategias llevadas a cabo para aumentar la vida media de los mismos. Algunas de estas estrategias consisten en la administración de inhibidores de endopeptidasas, o la sustitución de algunos aminoácidos para aumentar la estabilidad del péptido (301). Otra estrategia utilizada con VIP se basa en la formulación de nanopartículas de VIP protegidas con plata (302). También se está utilizando terapia génica para mejorar la llegada de los péptidos a los tejidos diana. Así, por ejemplo, se han usado vectores lentivirales que expresan VIP para el tratamiento de un modelo de artritis autoinmune (303). Por último, también se han usado terapias combinadas en las que los vectores que contienen los neuropéptidos se integran *ex-vivo* antes de la inoculación. Un ejemplo de esto es la utilización de DC trasducidas con lenti-VIP para el tratamiento de EAE (304), o el uso de células madre mesenquimales que expresan VIP propuesto en el desarrollo de esta tesis doctoral. En este sentido, hemos observado que la administración de MSC derivadas de tejido adiposo reduce la formación de placas ateroscleróticas, tanto a nivel de aorta descendente como a nivel de arco aórtico. Adulter-Leber y colaboradores ya intuían el papel anti-aterogénico de este tipo celular al ver cómo MSCs derivadas de tejido adiposo cardiaco favorece la diferenciación de macrófagos tipo M2, destacando un posible papel inmunorregulador en aterosclerosis (305). Además se sabe que el uso de estas células tiene un papel beneficioso en la estabilización de las placas ateroscleróticas (306). En nuestro caso vemos que si estas MSCs se trasducen con vectores lentivirales que expresan VIP, hay un mayor descenso en la formación de placas ateroscleróticas. Además, el uso de MSCs como “Caballos de Troya” del tratamiento con VIP nos permite retrasar significativamente el momento en el que comenzamos el tratamiento con respecto al tratamiento con VIP, lo que permitiría una ventana terapéutica más amplia. De forma similar, Cobo y colaboradores mostraron que MSCs que expresan VIP tenían un potente efecto terapéutico en un modelo crónico establecido de EAE (237). Por lo tanto, podríamos decir que el uso de MSC trasducidas con lentiVIP va a permitir una mejora en la pauta de administración clínica de VIP en el tratamiento de la aterosclerosis, ya que se produce un efecto sinérgico de la capacidad inmunomoduladora de MSCs y de VIP, así como una liberación controlada de VIP en el sitio inflamatorio, en este caso la placa aterosclerótica, y en órganos linfoides, por el tropismo preferente que tienen las MSCs por los mismos.

*Uso de neuropéptidos anti-inflamatorios en enfermedades cardiovasculares:
Aterosclerosis y miocarditis autoinmune.*

En cualquier caso, es importante destacar el hecho que ambos péptidos se han usado en clínica con seguridad y eficiencia, y que a pesar de su baja estabilidad señalizan rápido y de forma potente en aquellas células que expresan sus receptores. Así, en el caso de VIP, éste se está usando actualmente en clínica con éxito para el tratamiento de la disfunción eréctil, la hipertensión pulmonar y la sarcoidosis (195-197). En el caso de CST, hay un trabajo publicado por Giordano y colaboradores en el que describen el tratamiento con CST, en un rango de dosis similar al que nosotros usamos en esta tesis, a pacientes con síndrome de Cushing (215). Por lo tanto, estos trabajos hacen más cercana la idea de trasladar a clínica el uso de CST y VIP para estas enfermedades.

8 CONCLUSIONS

8.1 Conclusions

1. The treatment with cortistatin and VIP has a therapeutic effect in experimental autoimmune myocarditis (EAM). The systemic injection of VIP or cortistatin reduces the clinical and histopathological signs of the disease by downregulating the two deleterious components of the disease, named inflammatory and autoimmune responses, at both local and peripheral levels.
2. At the local level, cortistatin and VIP decrease the inflammatory infiltration in the heart during the acute phase of EAM. At the peripheral level, the treatment with VIP or cortistatin impairs the generation of cardiomyogenic responses driven by Th1 and Th17 cells in draining lymph nodes. As a consequence of their effect on self-reactive T-cell responses, both neuropeptides reduce the levels of circulating auto-antibodies specific of the cardiac myosin.
3. Cortistatin and VIP decrease the number and size of atherosclerotic lesions in two models of acute and chronic atherosclerosis.
4. The therapeutic effect of cortistatin and VIP is exerted during the acute effector phase of the disease by reducing the infiltration of macrophages and T cells into the atherosclerotic plaque and by impairing Th1 and Th17 responses in draining lymph nodes.
5. Moreover, VIP and cortistatin regulate critical events involved in the development of atherosclerosis: 1) VIP decreases the cholesterol levels in blood in atherogenic mice fed with a high-cholesterol diet. 2) VIP and cortistatin decrease the binding and transmigration of Th1 cells through the aortic endothelium. 3) Cortistatin regulates the expression of adhesion molecules in endothelial cells and the binding of monocytes to the endothelium. 4) Cortistatin and VIP decrease the formation of foam cells by favoring the cholesterol efflux from lipid-loaded macrophages through a mechanism that involves the upregulation of ABCA1 expression. 5) Cortistatin and VIP inhibit the migration and proliferation of smooth muscle cells and the formation of neointimal lesions.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Abul K. Abbas, A. H. L., Shiv Pillai. 2012. *Cellular and Molecular Immunology*. ELSEVIER Saunders.
2. Tabas, I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol* 10:36-46.
3. González, J. R. R. 2009. *Inmunología. Biología y patología del sistema inmunitario*. Editorial Medica Panamericana.
4. Lichtman, A. H., C. J. Binder, S. Tsimikas, and J. L. Witztum. Adaptive immunity in atherogenesis: new insights and therapeutic approaches. *J Clin Invest* 123:27-36.
5. Lahoute, C., O. Herbin, Z. Mallat, and A. Tedgui. Adaptive immunity in atherosclerosis: mechanisms and future therapeutic targets. *Nat Rev Cardiol* 8:348-358.
6. Blasi, C. 2008. The autoimmune origin of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 201:17-32.
7. Cooper, G. S., and B. C. Stroehla. 2003. The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2:119-125.
8. Silverthorn. 2008. *Fisiología Humana*. Panamericana.
9. <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/noncommunicable-diseases/cardiovascular-diseases/definition>.
10. www.heart.org/HEARTORG/Caregiver/Resources/WhatisCardiovascularDisease/What-is-Cardiovascular-Disease_UCM_301852_Article.jsp.
11. Cannon, B. Cardiovascular disease: Biochemistry to behaviour. *Nature* 493:S2-3.
12. Richardson, P., W. McKenna, M. Bristow, B. Maisch, B. Mautner, J. O'Connell, E. Olsen, G. Thiene, J. Goodwin, I. Gyarfás, I. Martin, and P. Nordet. 1996. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93:841-842.
13. Taqueti, V. R., R. N. Mitchell, and A. H. Lichtman. 2006. Protecting the pump: controlling myocardial inflammatory responses. *Annu Rev Physiol* 68:67-95.
14. Magnani, J. W., and G. W. Dec. 2006. Myocarditis: current trends in diagnosis and treatment. *Circulation* 113:876-890.
15. Feldman, A. M., and D. McNamara. 2000. Myocarditis. *N Engl J Med* 343:1388-1398.
16. Caforio, A. L., R. Marcolongo, R. Jahns, M. Fu, S. B. Felix, and S. Iliceto. Immune-mediated and autoimmune myocarditis: clinical presentation, diagnosis and management. *Heart Fail Rev*.
17. Yajima, T., and K. U. Knowlton. 2009. Viral myocarditis: from the perspective of the virus. *Circulation* 119:2615-2624.
18. Karkkainen, S., and K. Peuhkurinen. 2007. Genetics of dilated cardiomyopathy. *Ann Med* 39:91-107.
19. Marchant, D. J., J. H. Boyd, D. C. Lin, D. J. Granville, F. S. Garmaroudi, and B. M. McManus. Inflammation in myocardial diseases. *Circ Res* 110:126-144.
20. Neumann, D. A., C. L. Burek, K. L. Baughman, N. R. Rose, and A. Herskowitz. 1990. Circulating heart-reactive antibodies in patients with myocarditis or cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 16:839-846.
21. Caforio, A. L., M. Grazzini, J. M. Mann, P. J. Keeling, G. F. Bottazzo, W. J. McKenna, and S. Schiaffino. 1992. Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 85:1734-1742.
22. Cooper, L. T., Jr., G. J. Berry, and R. Shabetai. 1997. Idiopathic giant-cell myocarditis--natural history and treatment. Multicenter Giant Cell Myocarditis Study Group Investigators. *N Engl J Med* 336:1860-1866.
23. Leuschner, F., H. A. Katus, and Z. Kaya. 2009. Autoimmune myocarditis: past, present and future. *J Autoimmun* 33:282-289.
24. Okazaki, T., Y. Tanaka, R. Nishio, T. Mitsuiye, A. Mizoguchi, J. Wang, M. Ishida, H. Hiai, A. Matsumori, N. Minato, and T. Honjo. 2003. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nat Med* 9:1477-1483.

*Uso de neuropéptidos anti-inflamatorios en enfermedades cardiovasculares:
Aterosclerosis y miocarditis autoinmune.*

25. Rose, N. R., and S. L. Hill. 1996. Autoimmune myocarditis. *Int J Cardiol* 54:171-175.
26. Neu, N., N. R. Rose, K. W. Beisel, A. Herskowitz, G. Gurri-Glass, and S. W. Craig. 1987. Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. *J Immunol* 139:3630-3636.
27. Afanasyeva, M., Y. Wang, Z. Kaya, S. Park, M. J. Zilliox, B. H. Schofield, S. L. Hill, and N. R. Rose. 2001. Experimental autoimmune myocarditis in A/J mice is an interleukin-4-dependent disease with a Th2 phenotype. *Am J Pathol* 159:193-203.
28. Afanasyeva, M., D. Georgakopoulos, D. F. Belardi, D. Bedja, D. Fairweather, Y. Wang, Z. Kaya, K. L. Gabrielson, E. R. Rodriguez, P. Caturegli, D. A. Kass, and N. R. Rose. 2005. Impaired up-regulation of CD25 on CD4+ T cells in IFN-gamma knockout mice is associated with progression of myocarditis to heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:180-185.
29. Afanasyeva, M., D. Georgakopoulos, D. F. Belardi, A. C. Ramsundar, J. G. Barin, D. A. Kass, and N. R. Rose. 2004. Quantitative analysis of myocardial inflammation by flow cytometry in murine autoimmune myocarditis: correlation with cardiac function. *Am J Pathol* 164:807-815.
30. Wang, Z., Y. Liao, J. Dong, S. Li, J. Wang, and M. L. Fu. 2003. Clinical significance and pathogenic role of anti-cardiac myosin autoantibody in dilated cardiomyopathy. *Chin Med J (Engl)* 116:499-502.
31. Liu, P. P., and J. W. Mason. 2001. Advances in the understanding of myocarditis. *Circulation* 104:1076-1082.
32. Kindermann, I., C. Barth, F. Mahfoud, C. Ukena, M. Lenski, A. Yilmaz, K. Klingel, R. Kandolf, U. Sechtem, L. T. Cooper, and M. Bohm. Update on myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 59:779-792.
33. Zhang, H., Y. Li, T. Peng, M. Aasa, L. Zhang, Y. Yang, and L. C. Archard. 2000. Localization of enteroviral antigen in myocardium and other tissues from patients with heart muscle disease by an improved immunohistochemical technique. *J Histochem Cytochem* 48:579-584.
34. Zarembek, K. A., and P. J. Godowski. 2002. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168:554-561.
35. Godeny, E. K., and C. J. Gauntt. 1987. Murine natural killer cells limit coxsackievirus B3 replication. *J Immunol* 139:913-918.
36. Rose, Z. K. a. N. R. 2005. *Molecular Autoimmunity*.
37. Huang, C. H., J. G. Vallejo, G. Kollias, and D. L. Mann. 2009. Role of the innate immune system in acute viral myocarditis. *Basic Res Cardiol* 104:228-237.
38. Brower, G. L., A. L. Chancey, S. Thanigaraj, B. B. Matsubara, and J. S. Janicki. 2002. Cause and effect relationship between myocardial mast cell number and matrix metalloproteinase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H518-525.
39. Cihakova, D., and N. R. Rose. 2008. Pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Adv Immunol* 99:95-114.
40. Goser, S., R. Ottl, A. Brodner, T. J. Dengler, J. Torzewski, K. Egashira, N. R. Rose, H. A. Katus, and Z. Kaya. 2005. Critical role for monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1alpha in induction of experimental autoimmune myocarditis and effective anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy. *Circulation* 112:3400-3407.
41. Cihakova, D., J. G. Barin, M. Afanasyeva, M. Kimura, D. Fairweather, M. Berg, M. V. Talor, G. C. Baldeviano, S. Frisancho, K. Gabrielson, D. Bedja, and N. R. Rose. 2008. Interleukin-13 protects against experimental autoimmune myocarditis by regulating macrophage differentiation. *Am J Pathol* 172:1195-1208.

42. Li, K., W. Xu, Q. Guo, Z. Jiang, P. Wang, Y. Yue, and S. Xiong. 2009. Differential macrophage polarization in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus B3 defines susceptibility to viral myocarditis. *Circ Res* 105:353-364.
43. Martinez, N. E., F. Sato, E. Kawai, S. Omura, R. P. Chervenak, and I. Tsunoda. Regulatory T cells and Th17 cells in viral infections: implications for multiple sclerosis and myocarditis. *Future Virol* 7:593-608.
44. Smith, S. C., and P. M. Allen. 1992. Expression of myosin-class II major histocompatibility complexes in the normal myocardium occurs before induction of autoimmune myocarditis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9131-9135.
45. Eriksson, U., R. Ricci, L. Hunziker, M. O. Kurrer, G. Y. Oudit, T. H. Watts, I. Sonderegger, K. Bachmaier, M. Kopf, and J. M. Penninger. 2003. Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity. *Nat Med* 9:1484-1490.
46. Bachmaier, K., C. Pummerer, I. Kozieradzki, K. Pfeffer, T. W. Mak, N. Neu, and J. M. Penninger. 1997. Low-molecular-weight tumor necrosis factor receptor p55 controls induction of autoimmune heart disease. *Circulation* 95:655-661.
47. Eriksson, U., M. O. Kurrer, N. Schmitz, S. C. Marsch, A. Fontana, H. P. Eugster, and M. Kopf. 2003. Interleukin-6-deficient mice resist development of autoimmune myocarditis associated with impaired upregulation of complement C3. *Circulation* 107:320-325.
48. Omerovic, E., E. Bollano, B. Andersson, V. Kujacic, W. Schulze, A. Hjalmarson, F. Waagstein, and M. Fu. 2000. Induction of cardiomyopathy in severe combined immunodeficiency mice by transfer of lymphocytes from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Autoimmunity* 32:271-280.
49. Smith, S. C., and P. M. Allen. 1991. Myosin-induced acute myocarditis is a T cell-mediated disease. *J Immunol* 147:2141-2147.
50. Fuse, K., M. Kodama, M. Ito, Y. Okura, K. Kato, H. Hanawa, S. Aoki, and Y. Aizawa. 2003. Polarity of helper T cell subsets represents disease nature and clinical course of experimental autoimmune myocarditis in rats. *Clin Exp Immunol* 134:403-408.
51. Murphy, C. A., C. L. Langrish, Y. Chen, W. Blumenschein, T. McClanahan, R. A. Kastelein, J. D. Sedgwick, and D. J. Cua. 2003. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 198:1951-1957.
52. Huber, S. A., A. M. Feldman, and D. Sartini. 2006. Coxsackievirus B3 induces T regulatory cells, which inhibit cardiomyopathy in tumor necrosis factor-alpha transgenic mice. *Circ Res* 99:1109-1116.
53. Myers, J., L. Cooper, E. Shevach, M. Cunningham, and C. Cox. TRANSLATION OF THE TREG/TH17 IMMUNOPHENOTYPE IN HUMAN AUTOIMMUNE MYOCARDITIS. *Journal of the American College of Cardiology* 59:E1576.
54. Eck, M., A. Greiner, R. Kandolf, B. Schmausser, A. Marx, and H. K. Muller-Hermelink. 1997. Active fulminant myocarditis characterized by T-lymphocytes expressing the gamma-delta T-cell receptor: a new disease entity? *Am J Surg Pathol* 21:1109-1112.
55. Liao, L., R. Sindhvani, M. Rojkind, S. Factor, L. Leinwand, and B. Diamond. 1995. Antibody-mediated autoimmune myocarditis depends on genetically determined target organ sensitivity. *J Exp Med* 181:1123-1131.
56. Malkiel, S., S. Factor, and B. Diamond. 1999. Autoimmune myocarditis does not require B cells for antigen presentation. *J Immunol* 163:5265-5268.
57. Caforio, A. L., N. J. Mahon, F. Tona, and W. J. McKenna. 2002. Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *Eur J Heart Fail* 4:411-417.
58. Libby, P. 2006. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr* 83:456S-460S.

*Uso de neuropéptidos anti-inflamatorios en enfermedades cardiovasculares:
Aterosclerosis y miocarditis autoinmune.*

59. Hansson, G. K., and P. Libby. 2006. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 6:508-519.
60. Sherer, Y., and Y. Shoenfeld. 2006. Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2:99-106.
61. Toth, P. P. Insulin Resistance, Small LDL Particles, and Risk for Atherosclerotic Disease. *Curr Vasc Pharmacol*.
62. Rader, D. J. 2006. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest* 116:3090-3100.
63. LaRosa, J. C., D. Hunninghake, D. Bush, M. H. Criqui, G. S. Getz, A. M. Gotto, Jr., S. M. Grundy, L. Rakita, R. M. Robertson, M. L. Weisfeldt, and et al. 1990. The cholesterol facts. A summary of the evidence relating dietary fats, serum cholesterol, and coronary heart disease. A joint statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung, and Blood Institute. The Task Force on Cholesterol Issues, American Heart Association. *Circulation* 81:1721-1733.
64. Lusis, A. J. 2000. Atherosclerosis. *Nature* 407:233-241.
65. Rashid, S., D. E. Curtis, R. Garuti, N. N. Anderson, Y. Bashmakov, Y. K. Ho, R. E. Hammer, Y. A. Moon, and J. D. Horton. 2005. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5374-5379.
66. Libby, P., P. M. Ridker, and G. K. Hansson. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473:317-325.
67. Libby, P., M. Aikawa, and M. K. Jain. 2006. Vascular endothelium and atherosclerosis. *Handb Exp Pharmacol*:285-306.
68. Gimbrone, M. A., Jr. 1999. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol* 155:1-5.
69. Zhu, J., A. A. Quyyumi, D. Rott, G. Csako, H. Wu, J. Halcox, and S. E. Epstein. 2001. Antibodies to human heat-shock protein 60 are associated with the presence and severity of coronary artery disease: evidence for an autoimmune component of atherogenesis. *Circulation* 103:1071-1075.
70. Boren, J., K. Olin, I. Lee, A. Chait, T. N. Wight, and T. L. Innerarity. 1998. Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest* 101:2658-2664.
71. Packard, R. R., A. H. Lichtman, and P. Libby. 2009. Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. *Semin Immunopathol* 31:5-22.
72. Watson, A. D., N. Leitinger, M. Navab, K. F. Faull, S. Horkko, J. L. Witztum, W. Palinski, D. Schwenke, R. G. Salomon, W. Sha, G. Subbanagounder, A. M. Fogelman, and J. A. Berliner. 1997. Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *J Biol Chem* 272:13597-13607.
73. Knowles, J. W., R. L. Reddick, J. C. Jennette, E. G. Shesely, O. Smithies, and N. Maeda. 2000. Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)ApoE(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J Clin Invest* 105:451-458.
74. Ma, Y. Q., E. F. Plow, and J. G. Geng. 2004. P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1 induces an intermediate state of alphaMbeta2 activation and acts cooperatively with extracellular stimuli to support maximal adhesion of human neutrophils. *Blood* 104:2549-2556.
75. Luo, B. H., C. V. Carman, and T. A. Springer. 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* 25:619-647.

76. Mestas, J., and K. Ley. 2008. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 18:228-232.
77. Swirski, F. K., P. Libby, E. Aikawa, P. Alcaide, F. W. Luscinskas, R. Weissleder, and M. J. Pittet. 2007. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytoysis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest* 117:195-205.
78. Tontonoz, P., L. Nagy, J. G. Alvarez, V. A. Thomazy, and R. M. Evans. 1998. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93:241-252.
79. Varga, T., and L. Nagy. 2008. Nuclear receptors, transcription factors linking lipid metabolism and immunity: the case of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Eur J Clin Invest* 38:695-707.
80. von Eckardstein, A., M. Hersberger, and L. Rohrer. 2005. Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8:147-152.
81. Cavelier, C., I. Lorenzi, L. Rohrer, and A. von Eckardstein. 2006. Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim Biophys Acta* 1761:655-666.
82. Demers, A., A. Rodrigue-Way, and A. Tremblay. 2008. Hexarelin Signaling to PPARgamma in Metabolic Diseases. *PPAR Res* 2008:364784.
83. Doran, A. C., N. Meller, and C. A. McNamara. 2008. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:812-819.
84. Lundberg, A. M., and G. K. Hansson. Innate immune signals in atherosclerosis. *Clin Immunol* 134:5-24.
85. Hansson, G. K., and A. Hermansson. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 12:204-212.
86. Weis, M., C. L. Schlichting, E. G. Engleman, and J. P. Cooke. 2002. Endothelial determinants of dendritic cell adhesion and migration: new implications for vascular diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1817-1823.
87. Packard, R. R., E. Maganto-Garcia, I. Gotsman, I. Tabas, P. Libby, and A. H. Lichtman. 2008. CD11c(+) dendritic cells maintain antigen processing, presentation capabilities, and CD4(+) T-cell priming efficacy under hypercholesterolemic conditions associated with atherosclerosis. *Circ Res* 103:965-973.
88. Jonasson, L., J. Holm, O. Skalli, G. Bondjers, and G. K. Hansson. 1986. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 6:131-138.
89. Stemme, S., B. Faber, J. Holm, O. Wiklund, J. L. Witztum, and G. K. Hansson. 1995. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3893-3897.
90. Engelbertsen, D., L. Andersson, I. Ljungcrantz, M. Wigren, B. Hedblad, J. Nilsson, and H. Bjorkbacka. T-helper 2 immunity is associated with reduced risk of myocardial infarction and stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33:637-644.
91. Taleb, S., M. Romain, B. Ramkhalawon, C. Uyttenhove, G. Pasterkamp, O. Herbin, B. Esposito, N. Perez, H. Yasukawa, J. Van Snick, A. Yoshimura, A. Tedgui, and Z. Mallat. 2009. Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis. *J Exp Med* 206:2067-2077.
92. Erbel, C., T. J. Dengler, S. Wangler, F. Lasitschka, F. Bea, N. Wambsganss, M. Hakimi, D. Bockler, H. A. Katus, and C. A. Gleissner. Expression of IL-17A in human atherosclerotic lesions is associated with increased inflammation and plaque vulnerability. *Basic Res Cardiol* 106:125-134.
93. van der Wal, A. C., P. K. Das, D. Bentz van de Berg, C. M. van der Loos, and A. E. Becker. 1989. Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Lab Invest* 61:166-170.

*Uso de neuropéptidos anti-inflamatorios en enfermedades cardiovasculares:
Aterosclerosis y miocarditis autoinmune.*

94. Ravandi, A., S. M. Boekholdt, Z. Mallat, P. J. Talmud, J. J. Kastelein, N. J. Wareham, E. R. Miller, J. Benessiano, A. Tedgui, J. L. Witztum, K. T. Khaw, and S. Tsimikas. Relationship of IgG and IgM autoantibodies and immune complexes to oxidized LDL with markers of oxidation and inflammation and cardiovascular events: results from the EPIC-Norfolk Study. *J Lipid Res* 52:1829-1836.
95. Binder, C. J., M. K. Chang, P. X. Shaw, Y. I. Miller, K. Hartvigsen, A. Dewan, and J. L. Witztum. 2002. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med* 8:1218-1226.
96. Strong, J. P., G. T. Malcom, M. C. Oalman, and R. W. Wissler. 1997. The PDAY Study: natural history, risk factors, and pathobiology. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth. *Ann N Y Acad Sci* 811:226-235; discussion 235-227.
97. Tabas, I., K. J. Williams, and J. Boren. 2007. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation* 116:1832-1844.
98. Tedgui, A., and Z. Mallat. 2006. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 86:515-581.
99. Raines, E. W. 2004. PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:237-254.
100. Ross, R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126.
101. Tabas, I. 2004. Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol. *Cell Death Differ* 11 Suppl 1:S12-16.
102. Martinet, W., and M. M. Kockx. 2001. Apoptosis in atherosclerosis: focus on oxidized lipids and inflammation. *Curr Opin Lipidol* 12:535-541.
103. Gui, T., A. Shimokado, Y. Sun, T. Akasaka, and Y. Muragaki. Diverse roles of macrophages in atherosclerosis: from inflammatory biology to biomarker discovery. *Mediators Inflamm* 2012:693083.
104. Fadok, V. A., D. L. Bratton, A. Konowal, P. W. Freed, J. Y. Westcott, and P. M. Henson. 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101:890-898.
105. Tabas, I. 2005. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2255-2264.
106. Schrijvers, D. M., G. R. De Meyer, A. G. Herman, and W. Martinet. 2007. Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovasc Res* 73:470-480.
107. Llodra, J., V. Angeli, J. Liu, E. Trogan, E. A. Fisher, and G. J. Randolph. 2004. Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11779-11784.
108. Galis, Z. S., G. K. Sukhova, M. W. Lark, and P. Libby. 1994. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 94:2493-2503.
109. Reddy, S. M., K. H. Hsiao, V. E. Abernethy, H. Fan, A. Longacre, W. Lieberthal, J. Rauch, J. S. Koh, and J. S. Levine. 2002. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages induces novel signaling events leading to cytokine-independent survival and inhibition of proliferation: activation of Akt and inhibition of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J Immunol* 169:702-713.
110. Moulton, K. S., K. Vakili, D. Zurakowski, M. Soliman, C. Butterfield, E. Sylvain, K. M. Lo, S. Gillies, K. Javaherian, and J. Folkman. 2003. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4736-4741.

111. Angeli, V., J. Llodra, J. X. Rong, K. Satoh, S. Ishii, T. Shimizu, E. A. Fisher, and G. J. Randolph. 2004. Dyslipidemia associated with atherosclerotic disease systemically alters dendritic cell mobilization. *Immunity* 21:561-574.
112. Trogan, E., J. E. Feig, S. Dogan, G. H. Rothblat, V. Angeli, F. Tacke, G. J. Randolph, and E. A. Fisher. 2006. Gene expression changes in foam cells and the role of chemokine receptor CCR7 during atherosclerosis regression in ApoE-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3781-3786.
113. Rader, D. J., and A. Daugherty. 2008. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* 451:904-913.
114. Amento, E. P., N. Ehsani, H. Palmer, and P. Libby. 1991. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 11:1223-1230.
115. Wissler, R. W. 1952. The production of atheromatous lesions in the albino rat. *Proc Inst Med Chic* 19:79-80.
116. Thomas, W. A., and W. S. Hartroft. 1959. Myocardial infarction in rats fed diets containing high fat, cholesterol, thiouracil, and sodium cholate. *Circulation* 19:65-72.
117. Thompson, J. S. 1969. Atheromata in an inbred strain of mice. *J Atheroscler Res* 10:113-122.
118. Paigen, B., A. Morrow, C. Brandon, D. Mitchell, and P. Holmes. 1985. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis* 57:65-73.
119. Hui, D. Y., T. L. Innerarity, and R. W. Mahley. 1981. Lipoprotein binding to canine hepatic membranes. Metabolically distinct apo-E and apo-B,E receptors. *J Biol Chem* 256:5646-5655.
120. Mahley, R. W., and B. Angelin. 1984. Type III hyperlipoproteinemia: recent insights into the genetic defect of familial dysbetalipoproteinemia. *Adv Intern Med* 29:385-411.
121. Plump, A. S., J. D. Smith, T. Hayek, K. Aalto-Setälä, A. Walsh, J. G. Verstuyft, E. M. Rubin, and J. L. Breslow. 1992. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71:343-353.
122. Ishibashi, S., M. S. Brown, J. L. Goldstein, R. D. Gerard, R. E. Hammer, and J. Herz. 1993. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 92:883-893.
123. Nam, D., C. W. Ni, A. Rezvan, J. Suo, K. Budzyn, A. Llanos, D. Harrison, D. Giddens, and H. Jo. 2009. Partial carotid ligation is a model of acutely induced disturbed flow, leading to rapid endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297:H1535-1543.
124. Zhou, X., A. Nicoletti, R. Elhage, and G. K. Hansson. 2000. Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* 102:2919-2922.
125. Daugherty, A., E. Pure, D. Delfel-Butteiger, S. Chen, J. Leferovich, S. E. Roselaar, and D. J. Rader. 1997. The effects of total lymphocyte deficiency on the extent of atherosclerosis in apolipoprotein E^{-/-} mice. *J Clin Invest* 100:1575-1580.
126. Mach, F., U. Schonbeck, G. K. Sukhova, E. Atkinson, and P. Libby. 1998. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* 394:200-203.
127. Buono, C., C. J. Binder, G. Stavrakis, J. L. Witztum, L. H. Glimcher, and A. H. Lichtman. 2005. T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1596-1601.
128. Elhage, R., J. Jawien, M. Rudling, H. G. Ljunggren, K. Takeda, S. Akira, F. Bayard, and G. K. Hansson. 2003. Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res* 59:234-240.

*Uso de neuropéptidos anti-inflamatorios en enfermedades cardiovasculares:
Aterosclerosis y miocarditis autoinmune.*

129. Gupta, S., A. M. Pablo, X. Jiang, N. Wang, A. R. Tall, and C. Schindler. 1997. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest* 99:2752-2761.
130. Whitman, S. C., P. Ravisankar, H. Elam, and A. Daugherty. 2000. Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E^{-/-} mice. *Am J Pathol* 157:1819-1824.
131. Mor, F., F. J. Quintana, and I. R. Cohen. 2004. Angiogenesis-inflammation cross-talk: vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization. *J Immunol* 172:4618-4623.
132. King, V. L., S. J. Szilvassy, and A. Daugherty. 2002. Interleukin-4 deficiency decreases atherosclerotic lesion formation in a site-specific manner in female LDL receptor^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:456-461.
133. King, V. L., L. A. Cassis, and A. Daugherty. 2007. Interleukin-4 does not influence development of hypercholesterolemia or angiotensin II-induced atherosclerotic lesions in mice. *Am J Pathol* 171:2040-2047.
134. Binder, C. J., K. Hartvigsen, M. K. Chang, M. Miller, D. Broide, W. Palinski, L. K. Curtiss, M. Corr, and J. L. Witztum. 2004. IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis. *J Clin Invest* 114:427-437.
135. Erbel, C., L. Chen, F. Bea, S. Wangler, S. Celik, F. Lasitschka, Y. Wang, D. Bockler, H. A. Katus, and T. J. Dengler. 2009. Inhibition of IL-17A attenuates atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice. *J Immunol* 183:8167-8175.
136. Mallat, Z., S. Taleb, H. Ait-Oufella, and A. Tedgui. 2009. The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis. *J Lipid Res* 50 Suppl:S364-369.
137. Ait-Oufella, H., B. L. Salomon, S. Potteaux, A. K. Robertson, P. Gourdy, J. Zoll, R. Merval, B. Esposito, J. L. Cohen, S. Fisson, R. A. Flavell, G. K. Hansson, D. Klatzmann, A. Tedgui, and Z. Mallat. 2006. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med* 12:178-180.
138. Maganto-Garcia, E., M. L. Tarrio, N. Grabie, D. X. Bu, and A. H. Lichtman. Dynamic changes in regulatory T cells are linked to levels of diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation* 124:185-195.
139. Liu, G., H. Ma, L. Qiu, L. Li, Y. Cao, J. Ma, and Y. Zhao. Phenotypic and functional switch of macrophages induced by regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in mice. *Immunol Cell Biol* 89:130-142.
140. Bu, D. X., M. Tarrio, E. Maganto-Garcia, G. Stavrakis, G. Tajima, J. Lederer, P. Jarolim, G. J. Freeman, A. H. Sharpe, and A. H. Lichtman. Impairment of the programmed cell death-1 pathway increases atherosclerotic lesion development and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:1100-1107.
141. Kolbus, D., O. H. Ramos, K. E. Berg, J. Persson, M. Wigren, H. Bjorkbacka, G. N. Fredrikson, and J. Nilsson. CD8⁺ T cell activation predominate early immune responses to hypercholesterolemia in Apoe⁻(/)(-) mice. *BMC Immunol* 11:58.
142. Elhage, R., P. Gourdy, L. Brouchet, J. Jawien, M. J. Fouque, C. Fievet, X. Huc, Y. Barreira, J. C. Couloumiers, J. F. Arnal, and F. Bayard. 2004. Deleting TCR alpha beta⁺ or CD4⁺ T lymphocytes leads to opposite effects on site-specific atherosclerosis in female apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol* 165:2013-2018.
143. Kyaw, T., C. Tay, S. Krishnamurthi, P. Kanellakis, A. Agrotis, P. Tipping, A. Bobik, and B. H. Toh. B1a B lymphocytes are atheroprotective by secreting natural IgM that increases IgM deposits and reduces necrotic cores in atherosclerotic lesions. *Circ Res* 109:830-840.
144. Binder, C. J., S. Horkko, A. Dewan, M. K. Chang, E. P. Kieu, C. S. Goodyear, P. X. Shaw, W. Palinski, J. L. Witztum, and G. J. Silverman. 2003. Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between Streptococcus pneumoniae and oxidized LDL. *Nat Med* 9:736-743.

145. Kyaw, T., C. Tay, A. Khan, V. Dumouchel, A. Cao, K. To, M. Kehry, R. Dunn, A. Agrotis, P. Tipping, A. Bobik, and B. H. Toh. Conventional B2 B cell depletion ameliorates whereas its adoptive transfer aggravates atherosclerosis. *J Immunol* 185:4410-4419.
146. Charo, I. F., and R. Taub. Anti-inflammatory therapeutics for the treatment of atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 10:365-376.
147. McNamara, D. M., R. Holubkov, R. C. Starling, G. W. Dec, E. Loh, G. Torre-Amione, A. Gass, K. Janosko, T. Tokarczyk, P. Kessler, D. L. Mann, and A. M. Feldman. 2001. Controlled trial of intravenous immune globulin in recent-onset dilated cardiomyopathy. *Circulation* 103:2254-2259.
148. Mason, J. W., J. B. O'Connell, A. Herskowitz, N. R. Rose, B. M. McManus, M. E. Billingham, and T. E. Moon. 1995. A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators. *N Engl J Med* 333:269-275.
149. Costanzo-Nordin, M. R., E. A. Reap, J. B. O'Connell, J. A. Robinson, and P. J. Scanlon. 1985. A nonsteroid anti-inflammatory drug exacerbates Coxsackie B3 murine myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 6:1078-1082.
150. Cabinian, A. E., R. J. Kiel, F. Smith, K. L. Ho, R. Khatib, and M. P. Reyes. 1990. Modification of exercise-aggravated coxsackievirus B3 murine myocarditis by T lymphocyte suppression in an inbred model. *J Lab Clin Med* 115:454-462.
151. Okada, I., A. Matsumori, Y. Matoba, M. Tominaga, T. Yamada, and C. Kawai. 1992. Combination treatment with ribavirin and interferon for coxsackievirus B3 replication. *J Lab Clin Med* 120:569-573.
152. Cannon, C. P., E. Braunwald, C. H. McCabe, D. J. Rader, J. L. Rouleau, R. Belder, S. V. Joyal, K. A. Hill, M. A. Pfeffer, and A. M. Skene. 2004. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 350:1495-1504.
153. Ridker, P. M., E. Danielson, F. A. Fonseca, J. Genest, A. M. Gotto, Jr., J. J. Kastelein, W. Koenig, P. Libby, A. J. Lorenzatti, J. G. MacFadyen, B. G. Nordestgaard, J. Shepherd, J. T. Willerson, and R. J. Glynn. 2008. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med* 359:2195-2207.
154. Tardif, J. C., J. J. McMurray, E. Klug, R. Small, J. Schumi, J. Choi, J. Cooper, R. Scott, E. F. Lewis, P. L. L'Allier, and M. A. Pfeffer. 2008. Effects of succinobucol (AGI-1067) after an acute coronary syndrome: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 371:1761-1768.
155. Shaposhnik, Z., X. Wang, J. Trias, H. Fraser, and A. J. Lusis. 2009. The synergistic inhibition of atherogenesis in apoE^{-/-} mice between pravastatin and the sPLA2 inhibitor varespladib (A-002). *J Lipid Res* 50:623-629.
156. Serruys, P. W., H. M. Garcia-Garcia, P. Buszman, P. Erne, S. Verheye, M. Aschermann, H. Duckers, O. Bleie, D. Dudek, H. E. Botker, C. von Birgelen, D. D'Amico, T. Hutchinson, A. Zambanini, F. Mastik, G. A. van Es, A. F. van der Steen, D. G. Vince, P. Ganz, C. W. Hamm, W. Wijns, and A. Zalewski. 2008. Effects of the direct lipoprotein-associated phospholipase A(2) inhibitor darapladib on human coronary atherosclerotic plaque. *Circulation* 118:1172-1182.
157. Hakonarson, H., S. Thorvaldsson, A. Helgadóttir, D. Gudbjartsson, F. Zink, M. Andresdóttir, A. Manolescu, D. O. Arnar, K. Andersen, A. Sigurdsson, G. Thorgeirsson, A. Jonsson, U. Agnarsson, H. Bjornsdóttir, G. Gottskalksson, A. Einarsson, H. Gudmundsdóttir, A. E. Adalsteinsdóttir, K. Gudmundsson, K. Kristjánsson, T. Hardarson, A. Kristinsson, E. J. Topol, J. Gulcher, A. Kong, M. Gurney, and K. Stefansson. 2005. Effects of a 5-lipoxygenase-activating protein inhibitor on biomarkers associated with risk of myocardial infarction: a randomized trial. *JAMA* 293:2245-2256.
158. Tardif, J. C., L. L'Allier P, R. Ibrahim, J. C. Gregoire, A. Nozza, M. Cossette, S. Kouz, M. A. Lavoie, J. Paquin, T. M. Brotz, R. Taub, and J. Pressacco. Treatment with 5-lipoxygenase

*Uso de neuropéptidos anti-inflamatorios en enfermedades cardiovasculares:
Aterosclerosis y miocarditis autoinmune.*

- inhibitor VIA-2291 (Atreleuton) in patients with recent acute coronary syndrome. *Circ Cardiovasc Imaging* 3:298-307.
159. Boring, L., J. Gosling, M. Cleary, and I. F. Charo. 1998. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394:894-897.
160. Ridker, P. M. 2009. Testing the inflammatory hypothesis of atherothrombosis: scientific rationale for the cardiovascular inflammation reduction trial (CIRT). *J Thromb Haemost* 7 Suppl 1:332-339.
161. Jacobsson, L. T., C. Turesson, A. Gulfe, M. C. Kapetanovic, I. F. Petersson, T. Saxne, and P. Geborek. 2005. Treatment with tumor necrosis factor blockers is associated with a lower incidence of first cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 32:1213-1218.
162. Crossman, D. C., A. C. Morton, J. P. Gunn, J. P. Greenwood, A. S. Hall, K. A. Fox, A. J. Lucking, M. D. Flather, B. Lees, and C. E. Foley. 2008. 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* 9:8.
163. Haverslag, R., G. Pasterkamp, and I. E. Hoefer. 2008. Targeting adhesion molecules in cardiovascular disorders. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 8:252-260.
164. Zapolska-Downar, D., A. Siennicka, M. Kaczmarczyk, B. Kolodziej, and M. Naruszewicz. 2004. Simvastatin modulates TNF α -induced adhesion molecules expression in human endothelial cells. *Life Sci* 75:1287-1302.
165. Aikawa, M., E. Rabkin, S. Sugiyama, S. J. Voglic, Y. Fukumoto, Y. Furukawa, M. Shiomi, F. J. Schoen, and P. Libby. 2001. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation* 103:276-283.
166. Steffens, S., and F. Mach. 2004. Anti-inflammatory properties of statins. *Semin Vasc Med* 4:417-422.
167. Linda, H., A. von Heijne, E. O. Major, C. Ryschkewitsch, J. Berg, T. Olsson, and C. Martin. 2009. Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab monotherapy. *N Engl J Med* 361:1081-1087.
168. Sternberg, E. M. 2006. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol* 6:318-328.
169. Gonzalez-Rey, E., V. Delgado-Maroto, L. Souza Moreira, and M. Delgado. Neuropeptides as therapeutic approach to autoimmune diseases. *Curr Pharm Des* 16:3158-3172.
170. Pozo, D., and M. Delgado. 2004. The many faces of VIP in neuroimmunology: a cytokine rather a neuropeptide? *FASEB J* 18:1325-1334.
171. Said, S. I., and V. Mutt. 1970. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science* 169:1217-1218.
172. Delgado, M., D. Pozo, and D. Ganea. 2004. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacol Rev* 56:249-290.
173. Itoh, N., K. Obata, N. Yanaihara, and H. Okamoto. 1983. Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. *Nature* 304:547-549.
174. Fry, D. C., V. S. Madison, D. R. Bolin, D. N. Greeley, V. Toome, and B. B. Wegrzynski. 1989. Solution structure of an analogue of vasoactive intestinal peptide as determined by two-dimensional NMR and circular dichroism spectroscopies and constrained molecular dynamics. *Biochemistry* 28:2399-2409.
175. Said, S. I., and V. Mutt. 1972. Isolation from porcine-intestinal wall of a vasoactive octacosapeptide related to secretin and to glucagon. *Eur J Biochem* 28:199-204.

176. Delgado, M., and D. Ganea. Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions. *Amino Acids* 45:25-39.
177. Delgado, M., C. Abad, C. Martinez, J. Leceta, and R. P. Gomariz. 2001. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med* 7:563-568.
178. Abad, C., C. Martinez, M. G. Juarranz, A. Arranz, J. Leceta, M. Delgado, and R. P. Gomariz. 2003. Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 124:961-971.
179. Keino, H., T. Kezuka, M. Takeuchi, N. Yamakawa, T. Hattori, and M. Usui. 2004. Prevention of experimental autoimmune uveoretinitis by vasoactive intestinal peptide. *Arch Ophthalmol* 122:1179-1184.
180. Lodde, B. M., F. Mineshiba, J. Wang, A. P. Cotrim, S. Afione, P. P. Tak, and B. J. Baum. 2006. Effect of human vasoactive intestinal peptide gene transfer in a murine model of Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 65:195-200.
181. Gonzalez-Rey, E., A. Fernandez-Martin, A. Chorny, J. Martin, D. Pozo, D. Ganea, and M. Delgado. 2006. Therapeutic effect of vasoactive intestinal peptide on experimental autoimmune encephalomyelitis: down-regulation of inflammatory and autoimmune responses. *Am J Pathol* 168:1179-1188.
182. Harmar, A. J., A. Arimura, I. Gozes, L. Journot, M. Laburthe, J. R. Pisegna, S. R. Rawlings, P. Robberecht, S. I. Said, S. P. Sreedharan, S. A. Wank, and J. A. Waschek. 1998. International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol Rev* 50:265-270.
183. Vaudry, D., A. Falluel-Morel, S. Bourgault, M. Basille, D. Burel, O. Wurtz, A. Fournier, B. K. Chow, H. Hashimoto, L. Galas, and H. Vaudry. 2009. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev* 61:283-357.
184. Gonzalez-Rey, E., and M. Delgado. 2007. Anti-inflammatory neuropeptide receptors: new therapeutic targets for immune disorders? *Trends Pharmacol Sci* 28:482-491.
185. Herrera, J. L., E. Gonzalez-Rey, R. Fernandez-Montesinos, F. J. Quintana, R. Najmanovich, and D. Pozo. 2009. Toll-like receptor stimulation differentially regulates vasoactive intestinal peptide type 2 receptor in macrophages. *J Cell Mol Med* 13:3209-3217.
186. Goetzl, E. J., J. K. Voice, S. Shen, G. Dorsam, Y. Kong, K. M. West, C. F. Morrison, and A. J. Harmar. 2001. Enhanced delayed-type hypersensitivity and diminished immediate-type hypersensitivity in mice lacking the inducible VPAC(2) receptor for vasoactive intestinal peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13854-13859.
187. Martinez, C., C. Abad, M. Delgado, A. Arranz, M. G. Juarranz, N. Rodriguez-Henche, P. Brabet, J. Leceta, and R. P. Gomariz. 2002. Anti-inflammatory role in septic shock of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1053-1058.
188. Sun, W., J. Hong, Y. C. Zang, X. Liu, and J. Z. Zhang. 2006. Altered expression of vasoactive intestinal peptide receptors in T lymphocytes and aberrant Th1 immunity in multiple sclerosis. *Int Immunol* 18:1691-1700.
189. Delgado, M., G. Robledo, B. Rueda, N. Varela, F. O'Valle, P. Hernandez-Cortes, M. Caro, G. Orozco, E. Gonzalez-Rey, and J. Martin. 2008. Genetic association of vasoactive intestinal peptide receptor with rheumatoid arthritis: altered expression and signal in immune cells. *Arthritis Rheum* 58:1010-1019.
190. Edvinsson, L., B. B. Fredholm, E. Hamel, I. Jansen, and C. Verrecchia. 1985. Perivascular peptides relax cerebral arteries concomitant with stimulation of cyclic adenosine

- monophosphate accumulation or release of an endothelium-derived relaxing factor in the cat. *Neurosci Lett* 58:213-217.
191. Baun, M., A. Hay-Schmidt, L. Edvinsson, J. Olesen, and I. Jansen-Olesen. Pharmacological characterization and expression of VIP and PACAP receptors in isolated cranial arteries of the rat. *Eur J Pharmacol* 670:186-194.
 192. Erdling, A., M. Sheykhzade, A. Maddahi, F. Bari, and L. Edvinsson. VIP/PACAP receptors in cerebral arteries of rat: characterization, localization and relation to intracellular calcium. *Neuropeptides* 47:85-92.
 193. Kim, J., L. Zhang, K. Peppel, J. H. Wu, D. A. Zidar, L. Brian, S. M. DeWire, S. T. Exum, R. J. Lefkowitz, and N. J. Freedman. 2008. Beta-arrestins regulate atherosclerosis and neointimal hyperplasia by controlling smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res* 103:70-79.
 194. Dinsmore, W. W., C. Gingell, G. Hackett, P. Kell, D. Savage, R. Oakes, and G. D. Frenzt. 1999. Treating men with predominantly nonpsychogenic erectile dysfunction with intracavernosal vasoactive intestinal polypeptide and phentolamine mesylate in a novel auto-injector system: a multicentre double-blind placebo-controlled study. *BJU Int* 83:274-279.
 195. Leuchte, H. H., C. Baezner, R. A. Baumgartner, D. Bevec, G. Bacher, C. Neurohr, and J. Behr. 2008. Inhalation of vasoactive intestinal peptide in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 32:1289-1294.
 196. Petkov, V., W. Mosgoeller, R. Ziesche, M. Raderer, L. Stiebellehner, K. Vonbank, G. C. Funk, G. Hamilton, C. Novotny, B. Burian, and L. H. Block. 2003. Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 111:1339-1346.
 197. Prasse, A., G. Zissel, N. Lutzen, J. Schupp, R. Schmiedlin, E. Gonzalez-Rey, A. Rensing-Ehl, G. Bacher, V. Cavalli, D. Bevec, M. Delgado, and J. Muller-Quernheim. Inhaled vasoactive intestinal peptide exerts immunoregulatory effects in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 182:540-548.
 198. de Lecea, L., J. R. Criado, O. Prospero-Garcia, K. M. Gautvik, P. Schweitzer, P. E. Danielson, C. L. Dunlop, G. R. Siggins, S. J. Henriksen, and J. G. Sutcliffe. 1996. A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* 381:242-245.
 199. Spier, A. D., and L. de Lecea. 2000. Cortistatin: a member of the somatostatin neuropeptide family with distinct physiological functions. *Brain Res Brain Res Rev* 33:228-241.
 200. Puebla, L., R. Mouchantaf, R. Sasi, S. Khare, H. P. Bennett, S. James, and Y. C. Patel. 1999. Processing of rat preprocortistatin in mouse AtT-20 cells. *J Neurochem* 73:1273-1277.
 201. Dalm, V. A., P. M. Van Hagen, R. R. de Krijger, J. M. Kros, P. M. Van Koetsveld, A. J. Van Der Lely, S. W. Lamberts, and L. J. Hofland. 2004. Distribution pattern of somatostatin and cortistatin mRNA in human central and peripheral tissues. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60:625-629.
 202. Capuano, A., D. Curro, P. Navarra, and G. Tringali. Cortistatin modulates calcitonin gene-related peptide release from neuronal tissues of rat. Comparison with somatostatin. *Peptides* 32:138-143.
 203. Liu, Y., Y. B. Zhou, G. G. Zhang, Y. Cai, X. H. Duan, X. Teng, J. Q. Song, Y. Shi, C. S. Tang, X. H. Yin, and Y. F. Qi. Cortistatin attenuates vascular calcification in rats. *Regul Pept* 159:35-43.
 204. Cordoba-Chacon, J., M. D. Gahete, A. I. Pozo-Salas, A. J. Martinez-Fuentes, L. de Lecea, F. Gracia-Navarro, R. D. Kineman, J. P. Castano, and R. M. Luque. Cortistatin is not a

- somatostatin analogue but stimulates prolactin release and inhibits GH and ACTH in a gender-dependent fashion: potential role of ghrelin. *Endocrinology* 152:4800-4812.
205. Deghenghi, R., M. Papotti, E. Ghigo, and G. Muccioli. 2001. Cortistatin, but not somatostatin, binds to growth hormone secretagogue (GHS) receptors of human pituitary gland. *J Endocrinol Invest* 24:RC1-3.
 206. Robas, N., E. Mead, and M. Fidock. 2003. MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion. *J Biol Chem* 278:44400-44404.
 207. Siehler, S., C. Nunn, J. Hannon, D. Feuerbach, and D. Hoyer. 2008. Pharmacological profile of somatostatin and cortistatin receptors. *Mol Cell Endocrinol* 286:26-34.
 208. Gonzalez-Rey, E., and M. Delgado. 2008. Emergence of cortistatin as a new immunomodulatory factor with therapeutic potential in immune disorders. *Mol Cell Endocrinol* 286:135-140.
 209. Dalm, V. A., P. M. van Hagen, P. M. van Koetsveld, S. Achilefu, A. B. Houtsmuller, D. H. Pols, A. J. van der Lely, S. W. Lamberts, and L. J. Hofland. 2003. Expression of somatostatin, cortistatin, and somatostatin receptors in human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E344-353.
 210. Dalm, V. A., P. M. van Hagen, P. M. van Koetsveld, A. W. Langerak, A. J. van der Lely, S. W. Lamberts, and L. J. Hofland. 2003. Cortistatin rather than somatostatin as a potential endogenous ligand for somatostatin receptors in the human immune system. *J Clin Endocrinol Metab* 88:270-276.
 211. Gonzalez-Rey, E., A. Chorny, R. G. Del Moral, N. Varela, and M. Delgado. 2007. Therapeutic effect of cortistatin on experimental arthritis by downregulating inflammatory and Th1 responses. *Ann Rheum Dis* 66:582-588.
 212. Gonzalez-Rey, E., A. Chorny, and M. Delgado. 2007. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nat Rev Immunol* 7:52-63.
 213. Gonzalez-Rey, E., N. Varela, A. F. Sheibanie, A. Chorny, D. Ganea, and M. Delgado. 2006. Cortistatin, an antiinflammatory peptide with therapeutic action in inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4228-4233.
 214. Souza-Moreira, L., M. Morell, V. Delgado-Maroto, M. Pedreno, L. Martinez-Escudero, M. Caro, F. O'Valle, R. Luque, M. Gallo, L. de Lecea, J. P. Castano, and E. Gonzalez-Rey. Paradoxical Effect of Cortistatin Treatment and Its Deficiency on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*.
 215. Giordano, R., A. Picu, L. Bonelli, F. Broglio, F. Prodam, S. Grottoli, G. Muccioli, E. Ghigo, and E. Arvat. 2007. The activation of somatostatinergetic receptors by either somatostatin-14 or cortistatin-17 often inhibits ACTH hypersecretion in patients with Cushing's disease. *Eur J Endocrinol* 157:393-398.
 216. Delgado, M., E. Gonzalez-Rey, and D. Ganea. 2004. VIP/PACAP preferentially attract Th2 effectors through differential regulation of chemokine production by dendritic cells. *FASEB J* 18:1453-1455.
 217. Delgado, M., A. Reduta, V. Sharma, and D. Ganea. 2004. VIP/PACAP oppositely affects immature and mature dendritic cell expression of CD80/CD86 and the stimulatory activity for CD4(+) T cells. *J Leukoc Biol* 75:1122-1130.
 218. Voice, J., S. Donnelly, G. Dorsam, G. Dolganov, S. Paul, and E. J. Goetzl. 2004. c-Maf and JunB mediation of Th2 differentiation induced by the type 2 G protein-coupled receptor (VPAC2) for vasoactive intestinal peptide. *J Immunol* 172:7289-7296.
 219. Delgado, M., J. Leceta, R. P. Gomariz, and D. Ganea. 1999. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulate the induction of Th2 responses by up-regulating B7.2 expression. *J Immunol* 163:3629-3635.
 220. Anderson, P., and E. Gonzalez-Rey. Vasoactive intestinal peptide induces cell cycle arrest and regulatory functions in human T cells at multiple levels. *Mol Cell Biol* 30:2537-2551.

*Uso de neuropéptidos anti-inflamatorios en enfermedades cardiovasculares:
Aterosclerosis y miocarditis autoinmune.*

221. Delgado, M., A. Chorny, E. Gonzalez-Rey, and D. Ganea. 2005. Vasoactive intestinal peptide generates CD4+CD25+ regulatory T cells in vivo. *J Leukoc Biol* 78:1327-1338.
222. Fernandez-Martin, A., E. Gonzalez-Rey, A. Chorny, D. Ganea, and M. Delgado. 2006. Vasoactive intestinal peptide induces regulatory T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 36:318-326.
223. Gonzalez-Rey, E., A. Fernandez-Martin, A. Chorny, and M. Delgado. 2006. Vasoactive intestinal peptide induces CD4+,CD25+ T regulatory cells with therapeutic effect in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 54:864-876.
224. Rulle, S., M. D. Ah Kioon, C. Asensio, J. Mussard, H. K. Ea, M. C. Boissier, F. Liote, and G. Falgarone. Adrenomedullin, a neuropeptide with immunoregulatory properties induces semi-mature tolerogenic dendritic cells. *Immunology* 136:252-264.
225. Chorny, A., E. Gonzalez-Rey, A. Fernandez-Martin, D. Pozo, D. Ganea, and M. Delgado. 2005. Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells with therapeutic effects on autoimmune disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13562-13567.
226. Gonzalez-Rey, E., A. Chorny, A. Fernandez-Martin, D. Ganea, and M. Delgado. 2006. Vasoactive intestinal peptide generates human tolerogenic dendritic cells that induce CD4 and CD8 regulatory T cells. *Blood* 107:3632-3638.
227. Yadav, M., J. Rosenbaum, and E. J. Goetzl. 2008. Cutting edge: vasoactive intestinal peptide (VIP) induces differentiation of Th17 cells with a distinctive cytokine profile. *J Immunol* 180:2772-2776.
228. Maganto-Garcia, E., M. Tarrío, and A. H. Lichtman. Mouse models of atherosclerosis. *Curr Protoc Immunol* Chapter 15:Unit 15 24 11-23.
229. <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/3-parafina.php>.
230. Alcaide, P., S. L. King, C. J. Dimitroff, Y. C. Lim, R. C. Fuhlbrigge, and F. W. Luscinskas. 2007. The 130-kDa glycoform of CD43 functions as an E-selectin ligand for activated Th1 cells in vitro and in delayed-type hypersensitivity reactions in vivo. *J Invest Dermatol* 127:1964-1972.
231. Smith, E., K. M. Prasad, M. Butcher, A. Dobrian, J. K. Kolls, K. Ley, and E. Galkina. Blockade of interleukin-17A results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 121:1746-1755.
232. Lim, Y. C., L. Henault, A. J. Wagers, G. S. Kansas, F. W. Luscinskas, and A. H. Lichtman. 1999. Expression of functional selectin ligands on Th cells is differentially regulated by IL-12 and IL-4. *J Immunol* 162:3193-3201.
233. Lim, Y. C., G. Garcia-Cardena, J. R. Allport, M. Zervoglos, A. J. Connolly, M. A. Gimbrone, Jr., and F. W. Luscinskas. 2003. Heterogeneity of endothelial cells from different organ sites in T-cell subset recruitment. *Am J Pathol* 162:1591-1601.
234. Wittwer, C. T., M. G. Herrmann, A. A. Moss, and R. P. Rasmussen. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22:130-131, 134-138.
235. Wang, K. K., N. Liu, N. Radulovich, D. A. Wigle, M. R. Johnston, F. A. Shepherd, M. D. Minden, and M. S. Tsao. 2002. Novel candidate tumor marker genes for lung adenocarcinoma. *Oncogene* 21:7598-7604.
236. Zhu, C. Q., F. H. Blackhall, M. Pintilie, P. Iyengar, N. Liu, J. Ho, T. Chomiak, D. Lau, T. Winton, F. A. Shepherd, and M. S. Tsao. 2004. Skp2 gene copy number aberrations are common in non-small cell lung carcinoma, and its overexpression in tumors with ras mutation is a poor prognostic marker. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10:1984-1991.
237. Cobo, M., P. Anderson, K. Benabdellah, M. G. Toscano, P. Munoz, A. Garcia-Perez, I. Gutierrez, M. Delgado, and F. Martin. Mesenchymal stem cells expressing vasoactive intestinal peptide ameliorate symptoms in a model of chronic multiple sclerosis. *Cell Transplant* 22:839-854.

238. Tarrio, M. L., N. Grabie, D. X. Bu, A. H. Sharpe, and A. H. Lichtman. PD-1 protects against inflammation and myocyte damage in T cell-mediated myocarditis. *J Immunol* 188:4876-4884.
239. Lauer, B., K. Padberg, H. P. Schultheiss, and B. E. Strauer. 1994. Autoantibodies against human ventricular myosin in sera of patients with acute and chronic myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 23:146-153.
240. Okura, Y., K. Takeda, S. Honda, H. Hanawa, H. Watanabe, M. Kodama, T. Izumi, Y. Aizawa, S. Seki, and T. Abo. 1998. Recombinant murine interleukin-12 facilitates induction of cardiac myosin-specific type 1 helper T cells in rats. *Circ Res* 82:1035-1042.
241. Yamashita, T., T. Iwakura, K. Matsui, H. Kawaguchi, M. Obana, A. Hayama, M. Maeda, Y. Izumi, I. Komuro, Y. Ohsugi, M. Fujimoto, T. Naka, T. Kishimoto, H. Nakayama, and Y. Fujio. IL-6-mediated Th17 differentiation through ROR γ is essential for the initiation of experimental autoimmune myocarditis. *Cardiovasc Res* 91:640-648.
242. Rangachari, M., N. Mauermann, R. R. Marty, S. Dirnhofer, M. O. Kurrer, V. Komnenovic, J. M. Penninger, and U. Eriksson. 2006. T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17. *J Exp Med* 203:2009-2019.
243. Eriksson, U., M. O. Kurrer, R. Bingisser, H. P. Eugster, P. Saremaslani, F. Follath, S. Marsch, and U. Widmer. 2001. Lethal autoimmune myocarditis in interferon-gamma receptor-deficient mice: enhanced disease severity by impaired inducible nitric oxide synthase induction. *Circulation* 103:18-21.
244. Eriksson, U., M. O. Kurrer, W. Sebald, F. Brombacher, and M. Kopf. 2001. Dual role of the IL-12/IFN-gamma axis in the development of autoimmune myocarditis: induction by IL-12 and protection by IFN-gamma. *J Immunol* 167:5464-5469.
245. Tajiri, K., N. Shimojo, S. Sakai, T. Machino-Ohtsuka, K. Imanaka-Yoshida, M. Hiroe, Y. Tsujimura, T. Kimura, A. Sato, Y. Yasutomi, and K. Aonuma. Pitavastatin regulates helper T-cell differentiation and ameliorates autoimmune myocarditis in mice. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 27:413-424.
246. Ohshima, M., K. Yamahara, S. Ishikane, K. Harada, H. Tsuda, K. Otani, A. Taguchi, M. Miyazato, S. Katsuragi, J. Yoshimatsu, M. Kodama, K. Kangawa, and T. Ikeda. Systemic transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells suppresses Th1 and Th17 T cell responses in experimental autoimmune myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 53:420-428.
247. Chen, P., G. C. Baldeviano, D. L. Ligon, M. V. Talor, J. G. Barin, N. R. Rose, and D. Cihakova. Susceptibility to autoimmune myocarditis is associated with intrinsic differences in CD4(+) T cells. *Clin Exp Immunol* 169:79-88.
248. Li, Y., J. S. Heuser, S. D. Kosanke, M. Hemric, and M. W. Cunningham. 2005. Protection against experimental autoimmune myocarditis is mediated by interleukin-10-producing T cells that are controlled by dendritic cells. *Am J Pathol* 167:5-15.
249. Gonzalez, M. A., E. Gonzalez-Rey, L. Rico, D. Buscher, and M. Delgado. 2009. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* 136:978-989.
250. Zhou, X., G. Paulsson, S. Stemme, and G. K. Hansson. 1998. Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice. *J Clin Invest* 101:1717-1725.
251. Laurat, E., B. Poirier, E. Tupin, G. Caligiuri, G. K. Hansson, J. Bariety, and A. Nicoletti. 2001. In vivo downregulation of T helper cell 1 immune responses reduces atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 104:197-202.
252. Mor, A., D. Planer, G. Luboshits, A. Afek, S. Metzger, T. Chajek-Shaul, G. Keren, and J. George. 2007. Role of naturally occurring CD4+ CD25+ regulatory T cells in experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:893-900.

*Uso de neuropéptidos anti-inflamatorios en enfermedades cardiovasculares:
Aterosclerosis y miocarditis autoinmune.*

253. Gotsman, I., N. Gracie, R. Gupta, R. Dacosta, M. MacConmara, J. Lederer, G. Sukhova, J. L. Witztum, A. H. Sharpe, and A. H. Lichtman. 2006. Impaired regulatory T-cell response and enhanced atherosclerosis in the absence of inducible costimulatory molecule. *Circulation* 114:2047-2055.
254. Su, Z., C. Sun, C. Zhou, Y. Liu, H. Zhu, S. Sandoghchian, D. Zheng, T. Peng, Y. Zhang, Z. Jiao, S. Wang, and H. Xu. HMGB1 blockade attenuates experimental autoimmune myocarditis and suppresses Th17-cell expansion. *Eur J Immunol* 41:3586-3595.
255. Chorny, A., and M. Delgado. 2008. Neuropeptides rescue mice from lethal sepsis by down-regulating secretion of the late-acting inflammatory mediator high mobility group box 1. *Am J Pathol* 172:1297-1307.
256. Li, X., W. Bauer, M. C. Kreissl, J. Weirather, E. Bauer, I. Israel, D. Richter, G. Riehl, A. Buck, and S. Samnick. Specific somatostatin receptor II expression in arterial plaque: (68)Ga-DOTATATE autoradiographic, immunohistochemical and flow cytometric studies in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 230:33-39.
257. Alter, P., H. Rupp, and B. Maisch. 2006. Activated nuclear transcription factor kappaB in patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy--relation to inflammation and cardiac function. *Biochem Biophys Res Commun* 339:180-187.
258. Azuma, R. W., J. Suzuki, M. Ogawa, H. Futamatsu, N. Koga, Y. Onai, H. Kosuge, and M. Isobe. 2004. HMG-CoA reductase inhibitor attenuates experimental autoimmune myocarditis through inhibition of T cell activation. *Cardiovasc Res* 64:412-420.
259. Mallavia, B., C. Recio, A. Oguiza, G. Ortiz-Munoz, I. Lazaro, V. Lopez-Parra, O. Lopez-Franco, S. Schindler, R. Depping, J. Egido, and C. Gomez-Guerrero. Peptide inhibitor of NF-kappaB translocation ameliorates experimental atherosclerosis. *Am J Pathol* 182:1910-1921.
260. Gong, X., H. Feng, S. Zhang, Y. Yu, J. Li, J. Wang, and B. Guo. 2007. Increased expression of CCR5 in experimental autoimmune myocarditis and reduced severity induced by anti-CCR5 monoclonal antibody. *J Mol Cell Cardiol* 42:781-791.
261. Gilbert, J., J. Lekstrom-Himes, D. Donaldson, Y. Lee, M. Hu, J. Xu, T. Wyant, and M. Davidson. Effect of CC chemokine receptor 2 CCR2 blockade on serum C-reactive protein in individuals at atherosclerotic risk and with a single nucleotide polymorphism of the monocyte chemoattractant protein-1 promoter region. *Am J Cardiol* 107:906-911.
262. Dong, Z. M., A. A. Brown, and D. D. Wagner. 2000. Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Circulation* 101:2290-2295.
263. Johnson, R. C., S. M. Chapman, Z. M. Dong, J. M. Ordovas, T. N. Mayadas, J. Herz, R. O. Hynes, E. J. Schaefer, and D. D. Wagner. 1997. Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. *J Clin Invest* 99:1037-1043.
264. Phillips, J. W., K. G. Barringhaus, J. M. Sanders, S. E. Hesselbacher, A. C. Czarnik, D. Manka, D. Vestweber, K. Ley, and I. J. Sarembock. 2003. Single injection of P-selectin or P-selectin glycoprotein ligand-1 monoclonal antibody blocks neointima formation after arterial injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 107:2244-2249.
265. Yamazaki, K. G., S. H. Ihm, R. L. Thomas, D. Roth, and F. Villarreal. Cell adhesion molecule mediation of myocardial inflammatory responses associated with ventricular pacing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302:H1387-1393.
266. Yan, S., M. Li, H. Chai, H. Yang, P. H. Lin, Q. Yao, and C. Chen. 2005. TNF-alpha decreases expression of somatostatin, somatostatin receptors, and cortistatin in human coronary endothelial cells. *J Surg Res* 123:294-301.
267. Yu, R. J., L. Zhang, T. H. Yi, S. S. Xie, and Y. Dai. 2008. In vivo anti-obesity effect of the agonist for receptor VPAC1. *Sheng Li Xue Bao* 60:751-758.

268. Kerins, C., and S. I. Said. 1973. Hyperglycemic and glycogenolytic effects of vasoactive intestinal polypeptide. *Proc Soc Exp Biol Med* 142:1014-1017.
269. Saito, Y., N. Matsuoka, K. Shirai, M. Yamamoto, A. Kumagai, and N. Yanaihara. 1978. Effects of adrenergic blocking agents on lipolysis and adenyl cyclase activity induced by vasoactive intestinal polypeptide (VIP). *Endocrinol Jpn* 25:403-405.
270. Attie, A. D., J. P. Kastelein, and M. R. Hayden. 2001. Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. *J Lipid Res* 42:1717-1726.
271. Chawla, A., W. A. Boisvert, C. H. Lee, B. A. Laffitte, Y. Barak, S. B. Joseph, D. Liao, L. Nagy, P. A. Edwards, L. K. Curtiss, R. M. Evans, and P. Tontonoz. 2001. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 7:161-171.
272. Guri, A. J., R. Hontecillas, and J. Bassaganya-Riera. Abscisic acid synergizes with rosiglitazone to improve glucose tolerance and down-modulate macrophage accumulation in adipose tissue: possible action of the cAMP/PKA/PPAR gamma axis. *Clin Nutr* 29:646-653.
273. Oram, J. F., R. M. Lawn, M. R. Garvin, and D. P. Wade. 2000. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J Biol Chem* 275:34508-34511.
274. Yvan-Charvet, L., M. Ranalletta, N. Wang, S. Han, N. Terasaka, R. Li, C. Welch, and A. R. Tall. 2007. Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* 117:3900-3908.
275. Cheng, B., J. Wan, Y. Wang, C. Mei, W. Liu, L. Ke, and P. He. Ghrelin inhibits foam cell formation via simultaneously down-regulating the expression of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 1 and up-regulating adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1. *Cardiovasc Pathol* 19:e159-166.
276. Fahrenkrug, J., J. Hannibal, J. Tams, and B. Georg. 2000. Immunohistochemical localization of the VIP1 receptor (VPAC1R) in rat cerebral blood vessels: relation to PACAP and VIP containing nerves. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1205-1214.
277. Bruns, C., V. Shi, D. Hoyer, H. Schuurman, and G. Weckbecker. 2000. Somatostatin receptors and the potential use of Sandostatin to interfere with vascular remodelling. *Eur J Endocrinol* 143 Suppl 1:S3-7.
278. Duran-Prado, M., M. Morell, V. Delgado-Maroto, J. P. Castano, J. Aneiros-Fernandez, L. de Lecea, M. D. Culler, P. Hernandez-Cortes, F. O'Valle, and M. Delgado. Cortistatin inhibits migration and proliferation of human vascular smooth muscle cells and decreases neointimal formation on carotid artery ligation. *Circ Res* 112:1444-1455.
279. Maruno, K., A. Absood, and S. I. Said. 1995. VIP inhibits basal and histamine-stimulated proliferation of human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 268:L1047-1051.
280. Schachter, M. 1997. Vascular smooth muscle cell migration, atherosclerosis, and calcium channel blockers. *Int J Cardiol* 62 Suppl 2:S85-90.
281. Henning, R. J., and D. R. Sawmiller. 2001. Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects. *Cardiovasc Res* 49:27-37.
282. Dvorakova, M. C. 2005. Cardioprotective role of the VIP signaling system. *Timely Top Med Cardiovasc Dis* 9:E33.
283. Zhang, G., X. Yin, Y. Qi, L. Pendyala, J. Chen, D. Hou, and C. Tang. Ghrelin and cardiovascular diseases. *Curr Cardiol Rev* 6:62-70.
284. Sheikine, Y., B. Deodato, P. S. Olofsson, L. A. Soderstrom, A. M. Lundberg, I. Bodin, M. Rudling, E. Theodorsson, and G. K. Hansson. Activation of VPAC1 receptors aggravates early atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 402:471-476.
285. Yang, R. L., W. Li, P. Yue, Y. H. Shi, and G. W. Le. Relation of plasma somatostatin levels with malondialdehyde in hyperlipidemic patients. *Asia Pac J Clin Nutr* 20:220-224.

*Uso de neuropéptidos anti-inflamatorios en enfermedades cardiovasculares:
Aterosclerosis y miocarditis autoinmune.*

286. Rossi, F., A. Castelli, M. J. Bianco, C. Bertone, M. Brama, and V. Santemma. 2009. Ghrelin inhibits contraction and proliferation of human aortic smooth muscle cells by cAMP/PKA pathway activation. *Atherosclerosis* 203:97-104.
287. Kellokoski, E., A. Kunnari, M. Jokela, S. Makela, Y. A. Kesaniemi, and S. Horkko. 2009. Ghrelin and obestatin modulate early atherogenic processes on cells: enhancement of monocyte adhesion and oxidized low-density lipoprotein binding. *Metabolism* 58:1572-1580.
288. Pang, J., Q. Xu, X. Xu, H. Yin, R. Xu, S. Guo, W. Hao, L. Wang, C. Chen, and J. M. Cao. Hexarelin suppresses high lipid diet and vitamin D3-induced atherosclerosis in the rat. *Peptides* 31:630-638.
289. Kellokoski, E., O. Kumm, R. Serpi, P. Lehenkari, O. Ukkola, Y. A. Kesaniemi, and S. Horkko. 2009. Ghrelin vaccination decreases plasma MCP-1 level in LDLR(-/-)-mice. *Peptides* 30:2292-2300.
290. Habegger, K. M., E. Grant, P. T. Pfluger, D. Perez-Tilve, A. Daugherty, D. Bruemmer, M. H. Tschop, and S. M. Hofmann. Ghrelin Receptor Deficiency does not Affect Diet-Induced Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Null Mice. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2:67.
291. Ye, V. Z., G. Hodge, J. L. Yong, and K. A. Duggan. 2002. Early myocardial fibrosis is associated with depletion of vasoactive intestinal peptide in rat heart. *Exp Physiol* 87:539-546.
292. Dvorakova, M. C., U. Pfeil, J. Kuncova, J. Svirglerova, G. Galvis, G. Krasteva, P. Konig, V. Grau, J. Slavikova, and W. Kummer. 2006. Down-regulation of vasoactive intestinal peptide and altered expression of its receptors in rat diabetic cardiomyopathy. *Cell Tissue Res* 323:383-393.
293. Lucia, P., S. Caiola, A. Coppola, L. L. Manetti, E. Maroccia, A. M. Buongiorno, and C. De Martinis. 2003. Vasoactive intestinal peptide (VIP): a new neuroendocrine marker of clinical progression in chronic heart failure? *Clin Endocrinol (Oxf)* 59:723-727.
294. Hamidi, S. A., S. Prabhakar, and S. I. Said. 2008. Enhancement of pulmonary vascular remodelling and inflammatory genes with VIP gene deletion. *Eur Respir J* 31:135-139.
295. Haberl, I., K. Frei, R. Ramsebner, D. Doberer, V. Petkov, S. Albin, I. Lang, T. Lucas, and W. Mosgoeller. 2007. Vasoactive intestinal peptide gene alterations in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur J Hum Genet* 15:18-22.
296. Abad, C., Y. V. Tan, R. Lopez, H. Nobuta, H. Dong, P. Phan, J. M. Feng, A. T. Campagnoni, and J. A. Waschek. Vasoactive intestinal peptide loss leads to impaired CNS parenchymal T-cell infiltration and resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:19555-19560.
297. Abad, C., Y. V. Tan, G. Cheung-Lau, H. Nobuta, and J. A. Waschek. VIP deficient mice exhibit resistance to lipopolysaccharide induced endotoxemia with an intrinsic defect in proinflammatory cellular responses. *PLoS One* 7:e36922.
298. Curtis, S. B., J. Hewitt, S. Yakubovitz, A. Anzarut, Y. N. Hsiang, and A. M. Buchan. 2000. Somatostatin receptor subtype expression and function in human vascular tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H1815-1822.
299. Callaghan, B., B. Hunne, H. Hirayama, D. M. Sartor, T. V. Nguyen, F. C. Abogadie, D. Ferens, P. McIntyre, K. Ban, J. Baell, J. B. Furness, and J. A. Brock. Sites of action of ghrelin receptor ligands in cardiovascular control. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303:H1011-1021.
300. Tian, Q. P., X. R. Feng, Y. Z. Pang, C. S. Tang, and M. L. Liu. 2009. [Relationship between plasma cortistatin and coronary heart disease]. *Beijing Da Xue Xue Bao* 41:537-540.
301. Chapter, M. C., C. M. White, A. DeRidder, W. Chadwick, B. Martin, and S. Maudsley. Chemical modification of class II G protein-coupled receptor ligands: frontiers in the

- development of peptide analogs as neuroendocrine pharmacological therapies. *Pharmacol Ther* 125:39-54.
302. Fernandez-Montesinos, R., P. M. Castillo, R. Klippstein, E. Gonzalez-Rey, J. A. Mejias, A. P. Zaderenko, and D. Pozo. 2009. Chemical synthesis and characterization of silver-protected vasoactive intestinal peptide nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)* 4:919-930.
303. Delgado, M., M. G. Toscano, K. Benabdellah, M. Cobo, F. O'Valle, E. Gonzalez-Rey, and F. Martin. 2008. In vivo delivery of lentiviral vectors expressing vasoactive intestinal peptide complementary DNA as gene therapy for collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 58:1026-1037.
304. Toscano, M. G., M. Delgado, W. Kong, F. Martin, M. Skarica, and D. Ganea. Dendritic cells transduced with lentiviral vectors expressing VIP differentiate into VIP-secreting tolerogenic-like DCs. *Mol Ther* 18:1035-1045.
305. Adutler-Lieber, S., T. Ben-Mordechai, N. Naftali-Shani, E. Asher, D. Loberman, E. Raanani, and J. Leor. Human macrophage regulation via interaction with cardiac adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 18:78-86.
306. Fang, S. M., D. Y. Du, Y. T. Li, X. L. Ge, P. T. Qin, Q. H. Zhang, and Y. Liu. Allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells transplantation for stabilizing and repairing of atherosclerotic ruptured plaque. *Thromb Res* 131:e253-257.

10 ANEXOS