

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I
DEL MEDI NATURAL
(ETSIAMN)

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

ESTUDIO DE LA INFILTRACIÓN EOSINOFÍLICA EN LA LESIÓN ATEROSCLERÓTICA DE RATONES APOE^{-/-} INDUCIDA POR DIETA HIPERCOLESTEROLÉMICA

Curso Académico 2020-2021

AUTORA: LAURA BAÑOS CARRIÓN
TUTORES: MARÍA JOSÉ BAÑULS POLO (TUTOR EN LA UPV)
MARÍA JESÚS SANZ FERRANDO (TUTOR EXTERNO)
PATRICE GOMES MARQUES (COTUTOR EXTERNO)

VALENCIA, 26 DE JULIO

Título: Estudio de la infiltración eosinofílica en la lesión aterosclerótica de ratones apoE^{-/-} inducida por dieta hipercolesterolémica.

Resumen:

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por disfunción endotelial, acumulación de lípidos en las paredes arteriales e infiltración de células inflamatorias y constituye la principal base patológica de las enfermedades cardiovasculares (ECV). La inflamación sistémica de bajo grado juega un papel importante en el desarrollo del proceso aterosclerótico, estando presente en todas las etapas de la aterogénesis, donde participan una gran variedad de células inflamatorias. Se ha estudiado la implicación de varias poblaciones leucocitarias en la aterosclerosis; sin embargo, el papel de los eosinófilos en este proceso todavía no se conoce en profundidad. Este subtipo leucocitario expresa constitutivamente el receptor transmembrana CCR3, el cual interactúa con eotaxina-1/CCL11, una quimioquina con propiedades quimioatrayentes para eosinófilos que señala de forma exclusiva a través de este receptor. Se han encontrado niveles elevados tanto de CCR3 como de eotaxina-1/CCL11 en placas ateroscleróticas humanas, aparentemente independiente de su acción sobre los eosinófilos. En base a estos datos, en el presente estudio, y con el objetivo de aclarar el papel de los eosinófilos y el eje CCR3/CCL11 en esta patología metabólica, se emplearon ratones deficientes en la apolipoproteína E (apoE^{-/-}) de dos meses de edad, sometidos o no a una dieta hipercolesterolémica durante dos meses adicionales para llevar a cabo el estudio de la infiltración de eosinófilos en la lesión aterosclerótica de este modelo animal. En primer lugar, se observó que en aquellos ratones alimentados con una dieta aterogénica el grado de lesión aterosclerótica era mucho mayor que el presente en el grupo control, corroborando que una dieta rica en grasas induce la formación de complejas placas de ateroma. Así mismo, se encontraron niveles plasmáticos significativamente más altos de eotaxina-1/CCL11 y del porcentaje de leucocitos circulantes que expresan CCR3 en aquellos ratones apoE^{-/-} sometidos a una dieta rica en grasas frente a aquellos sometidos a dieta control. Este mayor porcentaje de células CCR3⁺ se debió al aumento del número de eosinófilos circulantes, ya que el porcentaje de basófilos y de mastocitos progenitores circulantes permaneció sin cambios en ambos grupos. Estos mismos resultados se obtuvieron cuando se realizó el estudio inmunofenotípico en la médula ósea. Finalmente, se detectó un mayor número de eosinófilos infiltrados en las válvulas sigmoideas aórticas en ratones con dieta aterogénica frente al grupo control. Por tanto, podemos concluir que quizás los eosinófilos y el eje CCR3/CCL11 puedan participar en la aterogénesis. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para evaluar el papel de esta población leucocitaria en el desarrollo del proceso aterosclerótico.

Palabras clave: aterosclerosis; eosinófilos; CCR3, eotaxina-1/CCL11, dieta hipercolesterolémica; inflamación.

Alumna: Dña. Laura Baños Carrión

Valencia, Julio de 2021

Tutor Académico: Dña. María José Bañuls Polo

Tutor Externo: Dña. María Jesús Sanz Ferrando

Cotutor colaborador: Don Patrice Gomes Marques

Title: Study of the eosinophilic infiltration in the atherosclerotic lesion of apoE^{-/-} mice induced by an hypercholesterolemic diet

Abstract:

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease characterized by endothelial dysfunction, lipid accumulation in the arterial wall and infiltration of inflammatory cells which constitutes the main pathological basis of cardiovascular diseases. Low-grade systemic inflammation plays an important role in the development of the atherosclerotic process, being present in all stages of atherogenesis. The involvement of several leukocyte populations in atherosclerosis has been widely studied. However, the role of eosinophils in this process remains unclear. This leukocyte subtype constitutively expresses the CCR3 transmembrane receptor, which interacts with eotaxin-1/CCL11, a chemokine with eosinophil chemoattractant properties that signals exclusively through this receptor. Elevated levels of both CCR3 and eotaxin-1/CCL11 have been found in human atherosclerotic plaques. In order to clarify the role of eosinophils and the CCR3/CCL11 axis in this cardiovascular disease, in the present study, two-months mice deficient in apolipoprotein E (apoE^{-/-}) were used. Animals were fed or not with an hypercholesterolemic diet for two additional months to study the infiltration of eosinophils in the atherosclerotic lesion. First, a greater atherosclerotic lesion was observed when animals were fed with an atherogenic diet than with a control diet. Thus corroborating that a high-fat diet induces the formation of complex atheroma plaques. Likewise, significantly higher plasma levels of eotaxin-1/CCL11 and percentage of circulating CCR3 expressing leukocytes were found in apoE^{-/-} mice subjected to a high-fat diet than those fed with a control diet. This higher percentage of CCR3⁺ cells was due to the increased numbers of circulating eosinophils since the percentage of basophils and circulating progenitor mast cells remained unchanged in both groups. Similar results were obtained when the immunophenotypic study was performed in the bone marrow. Notably, a greater number of infiltrated eosinophils in the aortic sigmoid valves was detected in mice subjected to an atherogenic diet than those found in the control group. Therefore, it seems that eosinophils and the CCR3/CCL11 axis might participate in the atherogenic process. However, additional studies are required to investigate the exact role of this leukocyte population in atherosclerosis lesion development.

Key words: atherosclerosis; eosinophils; CCR3, eotaxin-1/CCL11, hypercholesterolemic diet; inflammation.

Author: Laura Baños Carrión
Valencia, July 2021

Academic tutor: María José Bañuls Polo

Experimental tutor: María Jesús Sanz Ferrando

Collaborating co-tutor: Patrice Gomes Marques

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a la Dra. María Jesús Sanz Ferrando por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación, donde he podido ampliar mis conocimientos y empezar mi formación profesional, y por su atención y dedicación en todo momento. A Patrice Gomes y a Elena Domingo por haberme guiado y aconsejado durante estos meses, por descubrirme el mundo de los Western Blot y las inmunos, por vuestra profesionalidad y constancia y por confiar en mí.

A todos mis compañeros de laboratorio, por ofrecerme su ayuda constante y por hacerme sentir una más del grupo, haciendo que mi estancia en el laboratorio haya sido una experiencia totalmente enriquecedora.

A mi tutora académica María José Bañuls Polo, por prestarme su ayuda, al igual que a todos mis profesores de la Universitat Politècnica de València, por ser parte activa en mi formación, por transmitirme su pasión por su profesión, por hacerme llegar la ciencia.

A mis compañeros y amigos de carrera, por formar parte de esta etapa, que se podría decir que ha sido la más bonita y a la vez de las más duras de mi vida. Gracias por todos los momentos y conocimientos compartidos, por las comidas en bellas artes, las tardes de cabinas, noches de fiesta... pero, sobre todo, gracias por vuestro apoyo en los momentos más estresantes, y por el ánimo para alcanzar todo lo que nos proponíamos. Sois la razón principal por la que, de aquí en adelante, querré volver a estos años.

A mis amigas y amigos, por los momentos de desconexión cuando más los necesitaba, por vuestra admiración por lo que hago y lo que quiero conseguir. A mis compañeras de piso, por aguantar mis quejas y mis días más insoportables, sobre todo en época de exámenes, y por el vermut al solet para ahogar las penas.

A Cristian, por haber sufrido las consecuencias de tanto estrés y nerviosismo, por escuchar siempre mis problemas y hacerlos más pequeños, por hacer que no me rinda y por creer, incluso más que yo, en que puedo sacar todo adelante.

A toda mi familia, por confiar siempre en mí, por no soltarme nunca de la mano, apoyándome incondicionalmente en todas mis decisiones, os gustasen más, o menos. Por sentirnos orgullosos de mi y mostrar siempre interés en todo aquello que hago, a pesar de no estar habituados a los tecnicismos y conceptos científicos. Si he llegado hasta aquí ha sido gracias a cada uno de vosotros.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Aterosclerosis.....	1
1.1.1. Aterogénesis: Etapas de formación de la placa de ateroma	2
1.1.1.1. Inicio del proceso: disfunción endotelial	3
1.1.1.2. Formación de estrías grasas.....	3
1.1.1.3. La lesión avanzada: placa fibrosa.....	5
1.2. Inflamación: conceptos generales y relación con la aterosclerosis	5
1.2.1. Componentes celulares: Eosinófilos.....	7
1.2.2. Citocinas relevantes para la población eosinofílica	9
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS	12
3.1. Modelo animal de aterosclerosis.....	12
3.2. Cuantificación de la lesión aterosclerótica	12
3.3. Análisis histológico de las válvulas sigmoideas aórticas	12
3.3.1. Tinción hematoxilina/eosina	13
3.3.2. Determinación de la infiltración eosinofílica en válvulas sigmoideas aórticas por inmunofluorescencia	13
3.4. Estudio de citometría de flujo.....	14
3.5. Cuantificación de los niveles plasmáticos de IL-4, IL-5, eotaxina-1/CCL11 y eotaxina-2/CCL24.	16
3.6. Análisis estadístico	16
4. RESULTADOS.....	17
4.1. La administración de una dieta rica en grasas durante dos meses a ratones apoE^{-/-} indujo el desarrollo de ateroma en el arco aórtico y la aorta torácica.....	17
4.2. El grado de lesión aterosclerótica en las válvulas sigmoideas aórticas aumentó en ratones apoE^{-/-} sometidos a dieta aterogénica durante dos meses	18
4.3. El porcentaje de leucocitos CCR3⁺ y eosinófilos circulantes aumentó en los ratones apoE^{-/-} sometidos a una dieta aterogénica	19
4.4. Los niveles plasmáticos de eotaxina-1/CCL11 aumentaron en ratones apoE^{-/-} alimentados con dieta aterogénica.....	20
4.5. El número de eosinófilos infiltrados en las válvulas sigmoideas aumentó significativamente en ratones apoE^{-/-} tras dos meses con dieta aterogénica.	21
5. DISCUSIÓN.....	23
6. CONCLUSIONES.....	27
7. BIBLIOGRAFÍA.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cronología de la placa aterosclerótica: de la vasculatura normal a la ruptura de la placa.	2
Figura 2. Etapas de formación de la placa de ateroma.....	4
Figura 3. Eosinofilopoyesis y transmigración eosinófila a los tejidos.....	8
Figura 4. Estrategia de gating usada para la selección de leucocitos y eosinófilos murinos en sangre y en médula ósea.....	15
Figura 5. Estrategia de gating usada para la selección de basófilos y progenitores de mastocitos murinos en sangre y en médula ósea.	15
Figura 6. La administración de una dieta hipercolesterolémica durante dos meses a ratones apoE ^{-/-} incrementó la formación de placa de ateroma en el arco aórtico y la aorta torácica.	17
Figura 7. La administración de una dieta aterogénica durante dos meses a ratones apoE ^{-/-} incrementó la lesión aterosclerótica en el seno aórtico..	18
Figura 8. Los ratones apoE ^{-/-} sometidos a dieta aterogénica durante dos meses mostraron un incremento en los niveles de leucocitos CCR3 ⁺ y eosinófilos, tanto en sangre como en médula ósea.....	20
Figura 9. Los niveles circulantes de eotaxina-1/CCL11 se incrementaron en los ratones apoE ^{-/-} sometidos a una dieta aterogénica..	21
Figura 10. Los ratones apoE ^{-/-} alimentados con dieta aterogénica presentan mayor número de eosinófilos infiltrados en el seno aórtico.....	21

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores de riesgo en el desarrollo de la aterosclerosis (Glasser <i>et al.</i> , 1996; Nahrendorf & Swirski, 2015).....	2
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---

LISTADO DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

- ApoE** – Apolipoproteína E
BUV – Ultravioleta brillante (del inglés *Brilliant Ultraviolet*)
BV – Violeta brillante (del inglés *Brilliant Violet*)
ECV – Enfermedades cardiovasculares
EEM – Error Estándar de la Media
ELISA – Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)
EROs – Especies Reactivas de Oxígeno
GM-CSF – Factor de estimulación de colonias granulocito-macrófago (del inglés *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*)
IL – Interleucina
IL-5R – Receptor de IL-5
LDL – Lipoproteína de baja densidad (del inglés *Low-Density Lipoproteins*)
LDLox – LDL oxidadas
mAb – anticuerpo monoclonal (del inglés *Monoclonal Antibody*)
MACs – Moléculas de Adhesión Celular
MCP-1/CCL2 – Proteína quimioatrayentes de monocitos (del inglés *Monocyte Chemoattractant Protein-1*)
MMPs – Metaloproteasas de Matriz (del inglés *Matrix Metalloproteinases*)
NO – Óxido Nítrico (del inglés *Nitric Oxide*)
PBS – Tampón Fosfato Salino (del inglés *Phosphate-Buffered Saline*)
PFA – Paraformaldehido
RANTES/CCL5 – del inglés *Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Presumably Secreted*
Th – Linfocito T *helper*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aterosclerosis

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo, causando 17,9 millones de muertes anuales, lo que representa un 31% de todas las muertes registradas en el mundo según la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*, 2017). Estas cifras se ven aumentadas en países de ingresos bajos y medianos, donde la muerte por ECV representa más del 80% de los fallecimientos (*World Health Organization*, 2017). En este escenario, España no es una excepción, sino que en nuestro país también es la primera causa de muerte, incluso por delante del cáncer y las enfermedades del sistema respiratorio, con un total de 116.615 muertes en el año 2019 (*INE*, 2019).

La aterosclerosis es una de las mayores contribuyentes a esta alta tasa de mortalidad por ECV (Libby *et al.*, 2019). Concretamente, en el año 2019, se registraron un total de 1.348 muertes por aterosclerosis en España (*INE*, 2019). El término *aterosclerosis* proviene del griego, donde *athero* significa “gachas” o “papilla”, queriendo reflejar la apariencia del material lipídico que se encuentra en el núcleo de la placa aterosclerótica (o ateroma); y *esclerosis*, cuyo significado es endurecimiento (Libby *et al.*, 2019). Se trata de una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por la acumulación de material no celular (ej. lípidos modificados y componentes de la matriz extracelular) y de células inflamatorias (tanto innatas como adaptativas) en la capa íntima de las arterias. Estas lesiones arterioscleróticas reciben el nombre de *placa aterosclerótica* o *ateroma* y conducen a un estrechamiento del lumen aórtico (estenosis), incrementando el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares asociadas. La acumulación de estas placas y su posterior erosión puede conducir a su ruptura, con la consiguiente formación de trombos que provocan isquemia en los tejidos dependientes de la arteria ocluida (**Figura 1**) (J. J. Badimon *et al.*, 2002). Es importante destacar que esta enfermedad cursa de manera asintomática, pudiendo desarrollarse durante décadas. Es sólo en las últimas etapas cuando aparecen síntomas o complicaciones tales como infarto de miocardio, infarto cerebral o pérdida de función de las extremidades (L. Badimon & Vilahur, 2014).

Esta patología está generalmente asociada a un estilo de vida poco saludable, pudiendo prevenirse, en muchos casos, con una aproximación no farmacológica. Se han identificado diferentes factores de riesgo en el desarrollo de la aterosclerosis, algunos de ellos se resumen en la **Tabla 1**. Estos factores no siempre están presentes en todos los pacientes, sino que varían en prevalencia y potencia, y en aquellos que sufren aterosclerosis en su forma más severa, suelen manifestarse de forma combinada, lo que evidencia la naturaleza multifactorial de esta patología, presentando tanto un componente genético como ambiental, lo que explica la distinta incidencia en las diferentes zonas del mundo (Glasser *et al.*, 1996; Nahrendorf & Swirski, 2015).

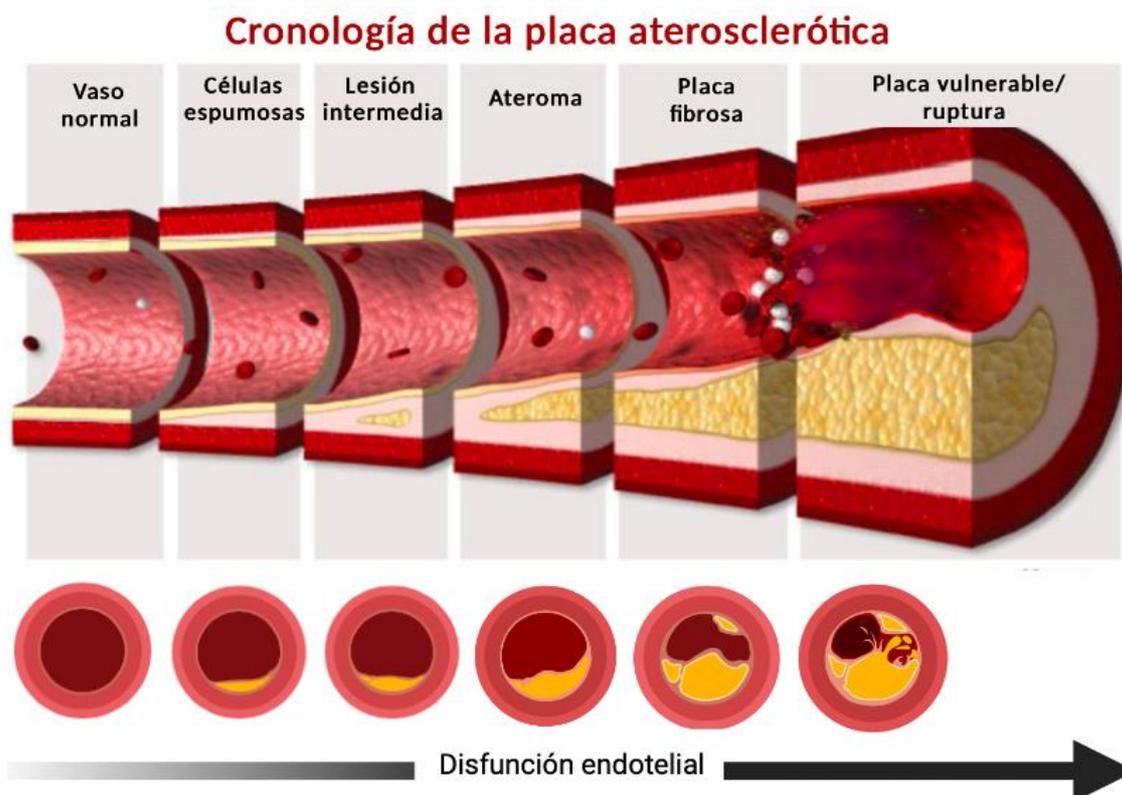


Figura 1. Cronología de la placa aterosclerótica: de la vasculatura normal a la ruptura de la placa. Adaptado de (Kahn Center for Cardiac Longevity, s. f.)

Tabla 1. Factores de riesgo en el desarrollo de la aterosclerosis (Glasser *et al.*, 1996; Nahrendorf & Swirski, 2015).

Factores de riesgo en el desarrollo de la aterosclerosis	
Edad (a partir de 40-50 años)	Hipertensión
Sexo Masculino	Elevada concentración de LDL
Hipertrigliceridemia	Tabaquismo
Obesidad	Antecedentes familiares
Diabetes <i>mellitus</i>	Inflamaciones crónicas

1.1.1. Aterogénesis: Etapas de formación de la placa de ateroma

Se conoce por *aterogénesis* al proceso de formación de la placa de ateroma. Tradicionalmente, se ha considerado un trastorno metabólico caracterizado por una obstrucción arterial por depósitos de grasa en las paredes de los vasos sanguíneos (R. Ross, 1999). Hoy en día, está ampliamente aceptado que la aterogénesis es un proceso más complejo que involucra numerosas respuestas bioquímicas y moleculares

altamente específicas, con interacciones constantes entre varios mediadores celulares. La inflamación está presente en cada paso de la aterogénesis, sin embargo, la relación causa-efecto aún no se comprende bien (Libby *et al.*, 2019). No obstante, la evidencia científica que asocia un proceso inflamatorio con la aterogénesis es hoy en día indudable. Tanto la respuesta inmunitaria innata como la adaptativa participan en este proceso (Libby *et al.*, 2019).

1.1.1.1. Inicio del proceso: disfunción endotelial

El endotelio vascular consiste en una monocapa de células endoteliales que reviste la pared luminal de los vasos sanguíneos, proporcionando una interfaz entre la sangre y la íntima arterial. Desempeña un papel importante en la homeostasis vascular: en la regulación del tono, de la estructura y de la permeabilidad vascular así como en la coagulación (Cho *et al.*, 2018). Una alteración de la fisiología endotelial conduce a un estado proinflamatorio y protrombótico del endotelio, conocido como **disfunción endotelial**, una de las primeras etapas de la aterogénesis (**Figura 2**) (Badimón & Martínez-González, 2006; Tabas *et al.*, 2015). La disfunción endotelial se caracteriza por una sobreexpresión endotelial de varias citocinas (incluyendo quimiocinas) y moléculas de adhesión celular (MACs), responsables de las interacciones leucocito-endotelio, una etapa crucial para el inicio del proceso aterosclerótico (Weber & Noels, 2011).

Además, estos cambios en el endotelio cursan con un desbalance de óxido nítrico (NO), un vasodilatador endógeno con propiedades protectoras sobre la pared del vaso, debido a la reducción de la expresión de óxido nítrico sintasa endotelial y/o debido al aumento de la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Libby *et al.*, 2019; Vanhoutte *et al.*, 2017). El desbalance en la biodisponibilidad del NO favorece el depósito de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) plasmáticas en la pared íntima del vaso (Libby *et al.*, 2019). El entorno hemodinámico local también afecta las funciones endoteliales. De hecho, el transporte de partículas LDL hacia la íntima es promovido en regiones donde el flujo sanguíneo es irregular y turbulento debido a un contacto intenso y prolongado entre las células endoteliales vasculares y la sangre (Kwak *et al.*, 2014). La mayor curvatura del arco aórtico y las zonas de bifurcación de la carótida son regiones donde el flujo sanguíneo tiene mayor complejidad geométrica, variando así la magnitud y dirección de la fuerza de cizallamiento, siendo propensas a desarrollar disfunción endotelial (Tabas *et al.*, 2015).

1.1.1.2. Formación de estrías grasas

Una vez depositadas en la íntima, estas partículas LDL, protegidas de los agentes antioxidantes plasmáticos, sufren modificaciones oxidativas (oxLDL, LDL oxidadas). La oxidación de las partículas LDL genera un fenotipo proinflamatorio y protrombótico que precede al desarrollo del proceso aterosclerótico, creando una respuesta inflamatoria innata en la íntima (Weber & Noels, 2011). La sobreexpresión endotelial de diversos mediadores inflamatorios y de MACs favorece la infiltración de monocitos hacia la íntima, que una vez ahí, maduran y se diferencian a macrófagos. Estas células sobreexpresan receptores con afinidad por las oxLDL (receptores *scavengers*) y acaban

por internalizar estas partículas por endocitosis. Frente a la dificultad de los macrófagos para degradar las oxLDL, estas se acumulan en su citoplasma, activando estos macrófagos y convirtiéndolos en *células espumosas*, un sello distintivo de la lesión aterosclerótica temprana (**Figura 2**). Las células espumosas liberan más citocinas, lo que conduce al reclutamiento de leucocitos circulantes, principalmente monocitos y linfocitos T, en el espacio subendotelial (C. Chen & Khismatullin, 2015; Ley *et al.*, 2011).

Como consecuencia de la acumulación de células inflamatorias en el espacio subendotelial, se liberan más citocinas proinflamatorias, EROs y metaloproteasas de matriz (MMPs), amplificando el proceso inflamatorio *in situ* lo que acelera el desarrollo de la lesión aterosclerótica. Los ejes quimiocina/receptor son fundamentales en este proceso. Los linfocitos T, aunque numéricamente menos abundantes que los monocitos/macrófagos, regulan las funciones de las células inmunitarias innatas, así como de las células endoteliales y del músculo liso (Libby *et al.*, 2019). La acumulación subendotelial de células espumosas y linfocitos T dan lugar a la denominada lesión aterosclerótica precoz o **estría grasa** (**Figura 2**) (Rafieian-Kopaei *et al.*, 2014).

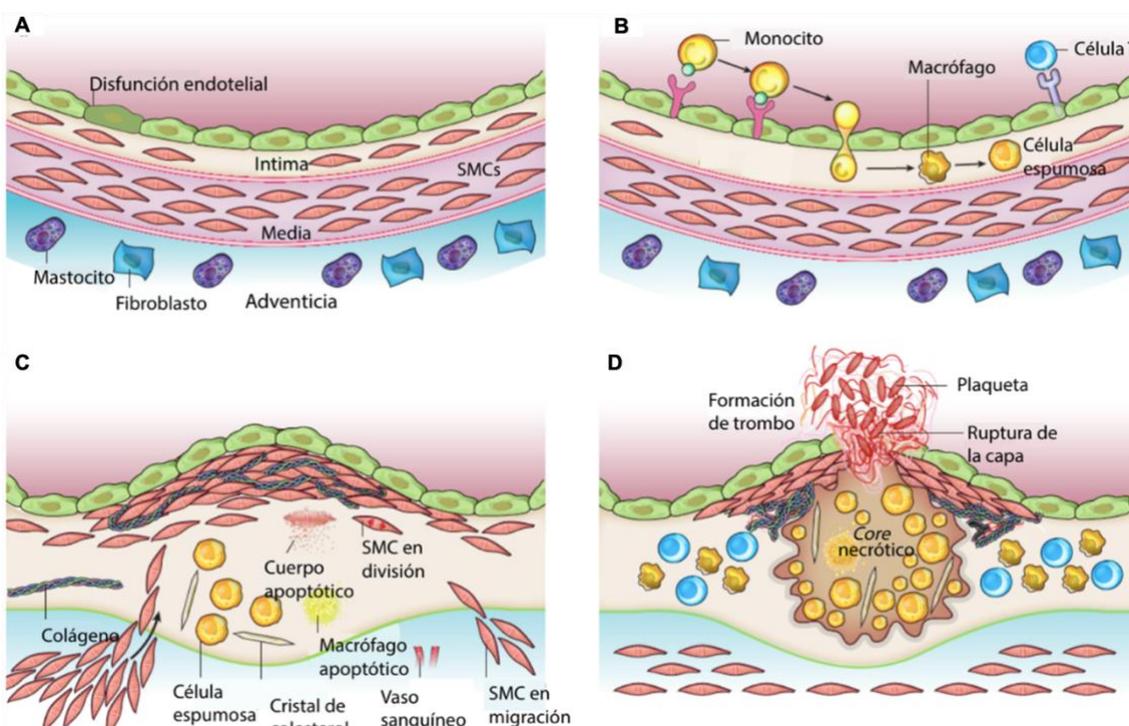


Figura 2. Etapas de formación de la placa de ateroma. Estructura trilaminar de la pared arterial normal. La disfunción y activación de las células endoteliales conduce a una mayor permeabilidad del endotelio (**A**). Los monocitos se reclutan en la íntima y se transforman en macrófagos y posteriormente en células espumosas debido a la acumulación intracelular de lípidos (**B**). El influjo continuo de células mononucleares, la deposición de componentes de la matriz y el reclutamiento de células de músculo liso dan lugar a la progresión de las placas ateroscleróticas (**C**). La apoptosis de los macrófagos y otras células de la placa crea un núcleo necrótico y se forma una capa fibrosa. El adelgazamiento y la erosión de la capa fibrosa en las placas inestables conduce a la ruptura de la placa, con activación del sistema de coagulación y trombosis (**D**). SMCs – células del músculo liso (del inglés *Smooth Muscle Cells*). Adaptado de (Libby *et al.*, 2011).

1.1.1.3. La lesión avanzada: placa fibrosa

Durante la evolución de la placa aterosclerótica, tanto las células de músculo liso residentes como las reclutadas, producen moléculas de matriz extracelular como colágeno intersticial y elastina, así como proteoglicanos y glucosaminoglicanos que contribuyen al engrosamiento de la capa íntima (Insull, 2009; Libby *et al.*, 2019).

La progresión de la estría grasa conduce a la formación de la **placa fibrosa**. Los macrófagos y las células del músculo liso pueden sufrir eventualmente muerte celular programada y convertirse en células apoptóticas, lo que, junto con la acumulación de lípidos, cristales de colesterol, residuos celulares y de material extracelular en la región central de la placa, forma lo que se conoce como núcleo o *core* necrótico, cuya formación se ve favorecida por el estado de inflamación crónica (**Figura 2**) (Libby *et al.*, 2019). La acumulación de desechos necróticos promueve la inflamación, la inestabilidad de la placa y la trombosis aguda (Seimon & Tabas, 2009).

Durante su evolución, muchas placas ateroscleróticas desarrollan regiones de calcificación, fenómeno que se correlaciona negativamente con la ruptura de la placa, ya que la microcalcificación (típicamente de 10 μm de diámetro) se asocia con la inestabilidad mecánica de las placas y puede facilitar la ruptura de las mismas (Hansson *et al.*, 2015; Libby *et al.*, 2019).

Aquellas placas que presentan un gran *core* necrótico cubierto por una fina capa fibrosa (<60 μm de espesor) son las que tienen una mayor probabilidad de ruptura (de Vries & Quax, 2016). Estas lesiones inestables reciben el nombre de “placas vulnerables” y en ellas se observa un bajo grado de calcificación, además de un aumento en la neovascularización. Por el contrario, las placas con una acumulación de lípidos limitada y capa fibrosa más gruesa se denominan “placas estables” (Libby *et al.*, 2019). A medida que progresa la enfermedad, la placa se va haciendo cada vez más fina e inestable. La matriz extracelular asociada a la placa de ateroma se va desintegrando debido tanto a la degradación de ésta por la acción de las MMPs secretadas por los distintos tipos celulares presentes en la lesión, así como al cese en la síntesis de colágeno por la apoptosis y senescencia de las células del músculo liso dirigida por los procesos inflamatorios (Libby *et al.*, 2019; Ruddy *et al.*, 2016).

Finalmente, la ruptura súbita de la placa vulnerable rica en lípidos expone el contenido del interior de la placa a la circulación, permitiendo en primer lugar, la activación de la cascada de coagulación y reclutamiento de plaquetas, y la consecuente formación de trombos (**Figura 2**); desencadenado así diversos eventos de riesgo mortal ya mencionados, como el infarto de miocardio o el accidente cerebrovascular, al bloquear el lumen arterial (L. Badimon & Vilahur, 2014; Libby *et al.*, 2019).

1.2. Inflamación: conceptos generales y relación con la aterosclerosis

La inflamación es la respuesta reparadora inmediata del sistema inmunológico de un organismo frente a una alteración de la homeostasis ante el daño causado a sus células y tejidos por patógenos bacterianos y/o por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química o física, tratándose de un mecanismo de defensa vital para el

organismo (L. Chen *et al.*, 2018). La respuesta inflamatoria es un proceso complejo que implica la activación coordinada de las vías de señalización que regulan los niveles de mediadores inflamatorios en las células tisulares residentes y las células inflamatorias reclutadas de la sangre (L. Chen *et al.*, 2018). Tales mediadores, amplifican la respuesta inflamatoria e influyen sobre su evolución.

Según la naturaleza de la reacción inflamatoria y la duración de la respuesta, la inflamación se puede clasificar en dos tipos: la inflamación aguda y la inflamación crónica (Moro-García *et al.*, 2018). El término *agudo* se refiere a una respuesta inmediata y de corta duración (horas a días) en la cual se liberan mediadores inflamatorios de defensa del huésped en el sitio de la lesión. Se caracteriza por la presencia de alteraciones en el calibre vascular con el consecuente aumento en el flujo sanguíneo, cambios estructurales en la microvasculatura que permiten que las proteínas plasmáticas y los leucocitos abandonen la circulación, migren y se acumulen en el foco de la lesión con su posterior activación para eliminar el agente agresor, además de la acumulación de líquidos en la zona afectada, lo que conduce a la sintomatología propia de la inflamación: dolor, hinchazón, pérdida de función y ardor (A. C. Ross, 2017). En este tipo de inflamación, los leucocitos polimorfonucleares, principalmente los neutrófilos, juegan un papel fundamental.

Para impedir la progresión de una inflamación aguda a una inflamación crónica persistente, la respuesta inflamatoria debe suprimirse, evitando un daño tisular excesivo. Dicha resolución de la inflamación implica mecanismos activos antiinflamatorios que, de forma espacial y temporalmente controlada, disminuyen el gradiente de quimiocinas (L. Chen *et al.*, 2018).

La inflamación *crónica*, a diferencia de la inflamación aguda, es una respuesta de duración prolongada (semanas a meses o años), desregulada y desadaptativa que implica inflamación activa, destrucción tisular e intentos de reparación tisular, es decir ocurre al mismo tiempo que la inflamación aguda. Dicha inflamación persistente es una patogenia común de muchas afecciones y enfermedades humanas crónicas, incluidas enfermedades cardiovasculares e intestinales, diabetes, artritis, cáncer y enfermedades autoinmunes (L. Chen *et al.*, 2018).

Como se ha mencionado anteriormente, la inflamación sistémica de bajo grado juega un papel clave en la aterogénesis (R. Ross, 1999). Este fenómeno inflamatorio parece no resolverse con el curso de la enfermedad y, sostenido en el tiempo, es propicio para el desarrollo de aterosclerosis. La inflamación, incluyendo tanto la inmunidad innata como la adaptativa, vincula muchos factores de riesgo tradicionales con la función alterada de las arterias. En este sentido, las rutas inflamatorias se han convertido en dianas en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas y preventivas frente a las ECV (Libby, 2012). A nivel celular, los monocitos innatos son uno de los ejes clave que conectan la inflamación de bajo grado y el metabolismo lipídico alterado, a través de la expresión de mediadores inflamatorios, así como la modulación de la acumulación de lípidos intracelulares (Geng *et al.*, 2016). La señalización inflamatoria altera el comportamiento de las células intrínsecas de la pared arterial (endotelio y músculo liso) y recluta más células inflamatorias que interactúan para promover la formación de lesiones y complicaciones ateroscleróticas (Libby *et al.*, 2011). En muchos casos,

señales inflamatorias persistentes, pueden desencadenar una tolerancia antiinflamatoria compensatoria. Además, se ha observado que la disfunción de un regulador negativo puede ser fundamental para el establecimiento de la inflamación no resolutive asociada con la progresión de la aterosclerosis (Geng *et al.*, 2016).

1.2.1. Componentes celulares: Eosinófilos

Como ya se ha comentado anteriormente, en el proceso inflamatorio participan una gran variedad de poblaciones celulares, especialmente los leucocitos mononucleares (monocitos y linfocitos) y leucocitos polimorfonucleares donde encontramos los eosinófilos, la población leucocitaria de interés en este estudio. Se conoce el papel de varias poblaciones celulares en el proceso aterosclerótico, pero todavía no se ha estudiado en profundidad el papel de los eosinófilos en esta enfermedad.

Los eosinófilos son células del sistema inmunológico y pertenecen, junto con los neutrófilos y los basófilos, al grupo de los granulocitos por poseer gránulos en su citoplasma. Este subtipo leucocitario, derivado de la médula ósea, representa menos de un 5% de los leucocitos circulantes en sangre periférica. Sin embargo, esta proporción se ve aumentada durante las respuestas inmunitarias específicas, entre las que se encuentran las respuestas frente a infecciones por parásitos helmintos, y en las enfermedades alérgicas, incluidas las formas de asma (Weller & Spencer, 2017). Presentan una vida media en sangre relativamente corta (aproximadamente 18h) antes de migrar a los tejidos, donde permanecen por varios días (McBrien & Menzies-Gow, 2017).

Los eosinófilos se desarrollan a partir de células progenitoras de granulocitos CD34⁺ pluripotentes (McBrien & Menzies-Gow, 2017), perteneciendo por tanto a la línea mieloide. Esta diferenciación en la médula ósea está principalmente dirigida por el factor de estimulación de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF), interleucina (IL)-3 e IL-5 (**Figura 3**). De estas citocinas, la IL-5 promueve exclusivamente el desarrollo y diferenciación terminal de eosinófilos en la médula ósea, a diferencia de IL-3 y GM-CSF que también estimulan otras líneas celulares además de promover la eosinofilopoyesis (Galeana & Yamazaki, 2003).

La amplia variedad de moléculas de superficie y receptores que tienen los eosinófilos le permiten responder a multitud de señales ambientales a través de citocinas, quimiocinas y mediadores lipídicos y refleja la variedad de funciones que pueden desempeñar en la homeostasis inmunitaria. De todos ellos, el receptor heterodimérico de IL-5 (IL-5R) es uno de los más relevantes de la población eosinofílica. Su subunidad alfa (IL-5R α , también conocido por CD125) se expresa exclusivamente en eosinófilos (McBrien & Menzies-Gow, 2017).

Los eosinófilos también expresan en su superficie Siglec-8 y Siglec-F, según se trate de eosinófilos de humanos o de ratones respectivamente, una familia de lectinas de tipo inmunoglobulina (Bochner, 2009). Siglec-8, que recibe ese nombre por ser el octavo miembro de la familia identificado en ese momento, está presente de forma prominente en eosinófilos pero también en otros tipos celulares como mastocitos y, en menor medida, en basófilos, y su función en eosinófilos se ha relacionado con la inducción de

la apoptosis (Bochner, 2009). Siglec-F, identificado posteriormente como un parólogo funcionalmente convergente del Siglec-8, se expresa predominantemente en eosinófilos de ratón, como ya se ha mencionado (Zhang *et al.*, 2004), pero no en mastocitos, aunque en su lugar está presente en una gama más amplia de células que incluyen macrófagos alveolares y, en niveles muy bajos, en células T y neutrófilos (Bochner, 2009). En base a estos datos, Siglec-F ha surgido como un marcador distintivo fiable de eosinófilos entre granulocitos en el ratón.

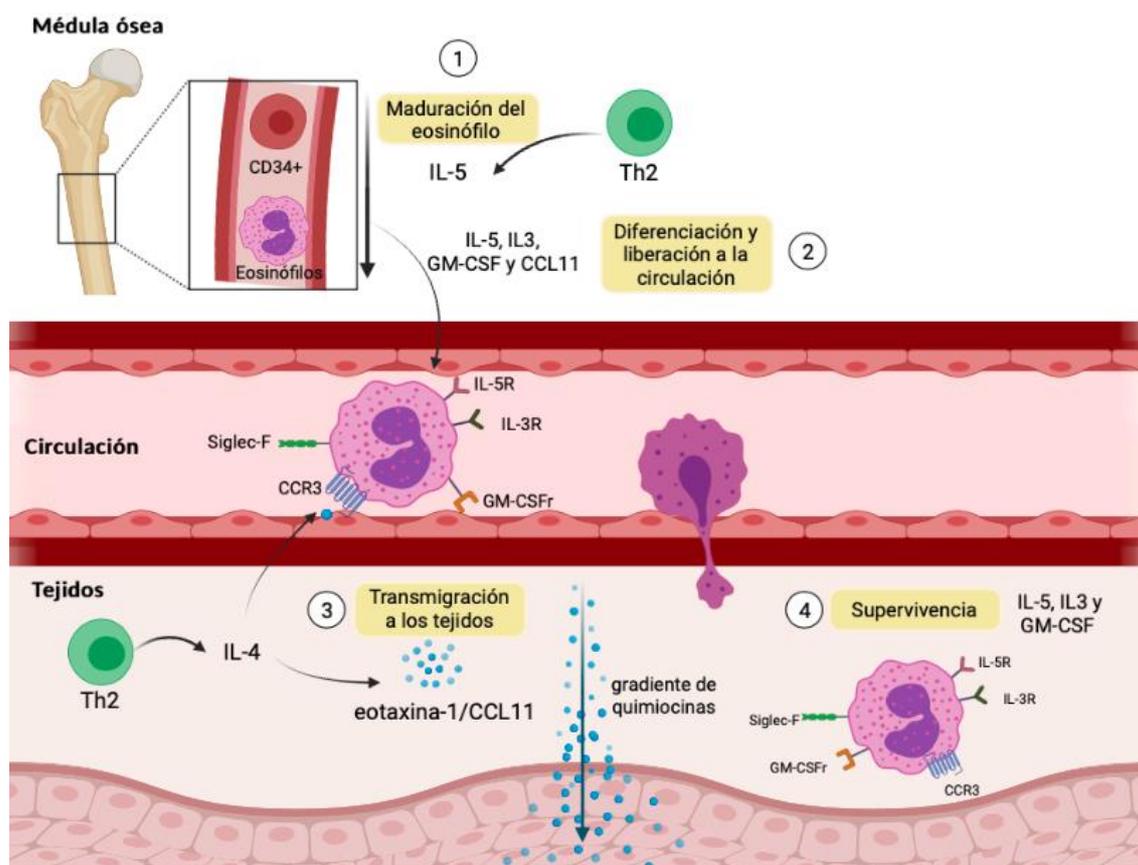


Figura 3. Eosinofilopoyesis y transmisión eosinofílica a los tejidos. (1) El eosinófilo maduro es derivado de la célula madre CD34⁺ pluripotencial por medio de IL-5 en la médula ósea. (2) La diferenciación y la liberación a la circulación del eosinófilo es dirigida por IL-5, IL-3, GM-CSF y eotaxina-1/CCL11. (3) El eosinófilo migra al tejido por medio de un gradiente de eotaxina (principalmente eotaxina-1/CCL11). IL-4, producida principalmente por células Th2, induce la expresión del receptor CCR3, así como la producción de eotaxina-1/CCL11. (4) La supervivencia del eosinófilo está mediada por IL-5, IL-3 y GM-CSF. IL – Interleucina; GM-SCF – Factor de estimulación de colonias granulocito-macrófago; Th2 – Linfocito T *helper* 2.

Por otra parte, los eosinófilos también expresan el receptor de quimiocinas CC de tipo 3 (CCR3) (Grimaldi *et al.*, 1999). El receptor CCR3 puede expresarse de manera constitutiva o bien ser inducido por citocinas específicas como IL-4 (Figura 3) (Turner *et al.*, 2018). No solo se expresa en eosinófilos sino también en mastocitos, basófilos y algunas poblaciones de linfocitos como los T *helper* 2 (Th2) (Ferguson & Engelhard, 2010; Forsythe & Befus, 2003; Sen *et al.*, 2004). Sin embargo, la expresión en

eosinófilos es significativamente mayor que en otros tipos celulares, contando hasta 5×10^4 receptores por célula (Elsner *et al.*, 2004). En eosinófilos y linfocitos Th2, el receptor se encuentra en la superficie celular, a diferencia de mastocitos que está localizado intracelularmente y es tras su activación cuando se transloca a la superficie celular (Forsythe & Befus, 2003; Willems & IJzerman, 2010). Cabe destacar que, al contrario de los humanos, los linfocitos Th2 murinos no expresan el receptor CCR3 (Grimaldi *et al.*, 1999).

Se ha descrito que CCR3 interactúa con varias quimiocinas, principalmente con los tres subtipos de eotaxina – eotaxina-1/CCL11, eotaxina-2/CCL24 y eotaxina-3/CCL26 (solo presente en humanos) – así como con la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1)/CCL2 y *Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Presumably Secreted* (RANTES)/CCL5 (Forsythe & Befus, 2003; Willems & IJzerman, 2010).

1.2.2. Citocinas relevantes para la población eosinofílica

La diferenciación, la trasmigración desde la circulación a los tejidos y la supervivencia de eosinófilos está dirigida por citocinas derivadas de células y quimiocinas que facilitan la quimiotaxis.

Las citocinas, proteínas de bajo peso molecular con un importante papel señalizador, son un grupo de mediadores solubles con múltiples funciones, entre las que destacan las siguientes (Fava & Montagnana, 2018; Galeana & Yamazaki, 2003):

- Promover el desarrollo y maduración de eosinófilos en la médula ósea.
- Liberar eosinófilos maduros de la médula ósea al torrente sanguíneo.
- Mantener la viabilidad de eosinófilos.
- Inhibir la apoptosis de eosinófilos maduros.
- Incrementar respuestas efectoras de eosinófilos.

Entre las citocinas con un papel relevante en la población eosinofílica se destaca la IL-4, una citocina pleiotrópica multifuncional con capacidad de promover la polarización de células T CD4 vírgenes (Th0) a células Th2 y la polarización del fenotipo proinflamatorio de los macrófagos M1 al antiinflamatorio M2. Esta citocina, producida no solo por células Th2 como también por mastocitos, basófilos y eosinófilos (Nelms *et al.*, 1999), induce la expresión de CCR3 en estas poblaciones (Turner *et al.*, 2018). Además, se ha descrito que IL-4 participa en la producción de eotaxina-1/CCL11 (**Figura 3**) (Hattori & Ishihara, 2020; Lv *et al.*, 2018).

Por su parte, IL-5 destaca por su papel central en la eosinofilopoyesis. Esta interleucina, principalmente producida por las células Th2, mastocitos, eosinófilos y basófilos, promueve exclusivamente la proliferación de precursores de eosinófilos en la médula ósea e incrementa la función y la supervivencia del eosinófilo maduro en la periferia (Ikutani *et al.*, 2012; Weller & Spencer, 2017). Aunque son menos específicos que la IL-5, la IL-3 y GM-CSF también están implicados en activación y supervivencia de los eosinófilos tisulares (Olivieri *et al.*, 2020). Asimismo, la IL-5, actuando de forma sinérgica con la eotaxina-1/CCL11, es capaz de inducir la liberación rápida al torrente sanguíneo de toda la fuente de eosinófilos desarrollados en la médula ósea para un incremento

agudo de los eosinófilos periféricos (eosinofilia) bajo el control de los linfocitos T (**Figura 3**) (Galeana & Yamazaki, 2003).

Las quimiocinas o citocinas quimiotácticas son una familia de proteínas de bajo peso molecular que juegan un papel fundamental en la defensa del organismo ya que se encargan de dirigir la migración selectiva de determinados leucocitos hacia el foco inflamatorio (Willems & IJzerman, 2010; Zernecke & Weber, 2010). Son sintetizadas y liberadas por las células del sistema inmunitario durante el proceso de la inflamación y constituyen un grupo heterogéneo de citocinas. En comparación con otras citocinas, las quimiocinas son de menor tamaño (8-17 kDa) y actúan a través de receptores acoplados a proteínas G (Ahmadi *et al.*, 2016; Willems & IJzerman, 2010).

Las quimiocinas se subdividen en cuatro familias según la posición de los dos primeros residuos de cisteína: CC, CXC, CX₃C y C (Zernecke & Weber, 2010). De todas ellas, las quimiocinas de interés en este estudio son una variedad de quimiocinas de tipo CC, conocidas como eotaxinas y caracterizadas por la presencia de dos residuos de cisteína adyacentes a la posición N-terminal, con propiedades quimioatrayentes selectivas de eosinófilos. Se conocen tres miembros de la familia de eotaxinas: eotaxina-1/CCL11, eotaxina-2/CCL24, eotaxina-3/CCL26 (Ahmadi *et al.*, 2016). A diferencia de los humanos que expresan los tres tipos de eotaxina, los ratones únicamente expresan eotaxina-1/CCL11 y eotaxina-2/CCL24 (Weller & Spencer, 2017).

Como se ha mencionado anteriormente, las eotaxinas son ligandos de CCR3 y señalizan exclusivamente a través de este receptor (Ahmadi *et al.*, 2016). De todos los ligandos que interactúan con CCR3, las eotaxinas son las quimiocinas con mayor capacidad quimiotáctica de eosinófilos. Además, son capaces de inducir en eosinófilos la polimerización de actina, el flujo intracelular de calcio y su degranulación en el foco inflamatorio, liberando radicales libres y moléculas citotóxicas, y promoviendo de esta manera una respuesta inflamatoria (Willems & IJzerman, 2010).

Se han encontrado niveles elevados tanto de eotaxina-1/CCL11 como de su receptor CCR3 en placas ateroscleróticas humanas (Haley *et al.*, 2000) y se ha descrito que la eotaxina-1/CCL11 está implicada en la aterosclerosis, aparentemente independiente de su acción sobre los eosinófilos (Williams, 2015). Por otro lado, el papel de los eosinófilos en el desarrollo de ECV no está claro: mientras que se ha descrito que esta población leucocitaria contribuye a la formación de placa aterosclerótica (Marx *et al.*, 2019) también se ha descubierto que la población eosinofílica ejerce un papel protector frente al desarrollo de aneurisma aórtico abdominal (Liu *et al.*, 2021).

2. OBJETIVOS

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica y la principal base patológica de las enfermedades cardiovasculares (Cheng *et al.*, 2019). Como enfermedad inflamatoria, se ha estudiado bien el papel que juegan varias poblaciones leucocitarias en el proceso aterosclerótico, pero todavía no se ha profundizado en la implicación de los eosinófilos en esta enfermedad. Dado que la literatura indica que este subtipo leucocitario rara vez está presente en la lesión aterosclerótica, pero CCR3 y eotaxina-1/CCL11 sí (Haley *et al.*, 2000), receptor presente en la superficie de eosinófilos y su principal citocina quimioatrayente (Ahmadi *et al.*, 2016), se pretende aclarar el papel de los eosinófilos en este proceso patológico.

Para ello, el presente trabajo tiene por objetivo estudiar la infiltración eosinofílica en la lesión aterosclerótica inducida por una dieta hipercolesterolémica en ratones deficientes en la apolipoproteína E (apoE^{-/-}, modelo animal de aterosclerosis), así como la expresión del eje CCR3/CCL11 en la aterosclerosis.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Modelo animal de aterosclerosis

Los protocolos experimentales realizados con animales se ajustaron a las directrices de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicados por el *National Institutes of Health* (Estados Unidos) y aprobado por el Comité de Ética Institucional de Experimentación Animal de la Universidad de Valencia (España).

Ratones macho de dos meses de edad deficientes en la apolipoproteína E (apoE^{-/-}) C57BL/6J fueron empleados, los cuales fueron suministrados por Charles River (España).

Los animales fueron criados y mantenidos en condiciones específicas libres de patógenos y alimentados con dieta y agua autoclavada, a una humedad del 60-65% y a una temperatura constante de 22 ± 2°C con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h.

Los ratones macho apoE^{-/-} de dos meses de edad fueron divididos en dos grupos y alimentados durante ocho semanas adicionales. Un grupo recibió una dieta control (2,8% de grasa; Panlab, S.L. – Harvard Apparatus, Barcelona, Spain) y otro una dieta aterogénica rica en grasa (10,8% de grasa, con un porcentaje de colesterol del 0,75%, S4892-E010; Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Alemania) para acelerar el desarrollo de aterosclerosis.

3.2. Cuantificación de la lesión aterosclerótica

Una vez transcurridos los dos meses de dieta, los ratones fueron sacrificados por sobredosis de anestesia mediante una inyección intraperitoneal de una mezcla de clorhidrato de medetomidina (1 mg/mL; Orion Corporation, Espoo, Finlandia) y ketamina (50 mg/mL; Orion Corporation), y fueron abiertos ventralmente para acceder a los órganos internos. Los ventrículos cardíacos izquierdos se perfundieron con 10 mL de tampón fosfato salino (PBS).

Las aortas fueron aisladas y lavadas con PBS *in situ*, y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% (PanReac AppliChem GmbH, Barcelona, España) durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Al día siguiente, las aortas extraídas se tiñeron con *Oil Red-O* (0,2% *Oil-Red-O* en 78% de metanol; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) siguiendo un protocolo anteriormente descrito (Avogaro & de Kreutzenberg, 2005; Landmesser, 2004). Finalmente, las imágenes fueron capturadas (microscopio invertido Axio Observer A1; ZEISS International, Oberkochen, Alemania), digitalizadas y analizadas (software ImageJ, versión gratuita de Windows; NIH, Bethesda, MD).

3.3. Análisis histológico de las válvulas sigmoideas aórticas

Para la realización de los estudios histológicos en las válvulas sigmoideas aórticas, se extrajeron los corazones de ratones, se lavaron con PBS, se fijaron con PFA al 4%

(PanReac AppliChem GmbH, Barcelona, España) durante toda la noche a 4°C y finalmente se embebieron en parafina para el posterior seccionamiento y análisis (Escudero *et al.*, 2015).

Sobre las muestras incluidas en parafina se realizaron cortes histológicos para estudios posteriores empleando un microtomo (Leica RM2245; Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). El grosor de los cortes de la sección del seno aórtico fue establecido a 5 µm y se montaron en portaobjetos de microscopio Superfrost® plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Por cada ratón, se examinaron al menos 20 portaobjetos, que contenían aproximadamente cuatro secciones transversales de tejido (número medio de secciones por ratón = 80 ± 5). Los cortes histológicos obtenidos se secaron a 37°C durante toda la noche y posteriormente se seleccionó el área de interés mediante un microscopio digital (Leica DMD108; Leica Biosystems) con un objetivo 4x.

3.3.1. Tinción hematoxilina/eosina

La cuantificación del tamaño de la lesión aterosclerótica se llevó a cabo mediante una tinción de hematoxilina/eosina de los cortes de la sección del seno aórtico.

Las muestras se hidrataron y se sumergieron en hematoxilina de Harris previamente filtrada (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se lavaron continuamente en agua corriente. A continuación, se sumergieron rápidamente en una solución de diferenciación (0,25 mL de ácido clorhídrico concentrado en 100 mL de etanol al 70%) seguido de un lavado continuo en agua corriente. Posteriormente, se sumergieron los portaobjetos con las muestras de tejido en etanol al 95% y luego en eosina (Sigma-Aldrich) diluida 1:1 en etanol al 95%. Se realizó otro lavado constante en agua y, finalmente, se deshidrataron las muestras en una serie de baños de etanol de concentraciones crecientes, acabando con un baño final de xileno. La tinción se completó con el montaje de los cubreobjetos en los portaobjetos con la ayuda de medios de montaje de base sintética Bio-Mount para histología y citología (Bio-Optica, Milán, Italia).

Finalmente, las imágenes fueron capturadas mediante un microscopio digital (Leica DMD108; Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania), digitalizadas y analizadas (software ImageJ, versión gratuita de Windows; NIH, Bethesda, MD).

3.3.2. Determinación de la infiltración eosinofílica en válvulas sigmoideas aórticas por inmunofluorescencia

La determinación de la infiltración eosinofílica en válvulas sigmoideas aórticas se realizó mediante ensayo de inmunofluorescencia. Tras la desparafinación y la desmascaración del antígeno mediante calor, se redujeron las interacciones no específicas con una solución de bloqueo (5% de suero de caballo en PBS, Abcam, Cambridge, UK) durante 1 hora. Posteriormente, los cortes histológicos se incubaron durante 24 h con dos anticuerpos primarios: un anticuerpo monoclonal (mAb) de rata frente a ratón anti-SiglecF (dilución 1:20, BD Biosciences, San José, CA) y un anticuerpo policlonal de cabra frente a ratón anti-CCR3 (dilución 1:200, Abcam). Se detectó el marcaje específico con anticuerpos secundarios anti-IgG de gallina frente a rata

conjugado a Alexa Fluor 488 (dilución 1:2000, Life Technologies, Carlsbad, CA) y anti-IgG de gallina frente a cabra Alexa Fluor 594 (dilución 1:500, Life Technologies). Los núcleos celulares se contratiñeron con Hoechst (dilución 1:4000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Tras ello, se llevó a cabo el montaje con el reactivo SlowFade® Gold antifade reagent (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Para confirmar la especificidad de todos los anticuerpos, se utilizaron unos isotipos control coincidentes en concentración y especie (Life Technologies) como controles negativos.

Finalmente, se tomaron fotografías de distintos campos de cada sección del seno aórtico mediante la cámara digital Olympus CAMEDIA-C5060 acoplada a un microscopio invertido (Axio Observer A1; ZEISS International, Oberkochen, Alemania) y fueron digitalizadas y analizadas (software ImageJ, versión gratuita de Windows; NIH, Bethesda, MD). Las imágenes fueron tomadas con el modo secuencial para evitar las interferencias procedentes de la fluorescencia solapante.

3.4. Estudio de citometría de flujo

Se empleó sangre completa heparinizada y médula ósea para realizar los análisis de citometría de flujo. Para la obtención de la médula ósea, primeramente, se aisló el fémur y se limpió cuidadosamente para retirar los tejidos restantes. La médula ósea se obtuvo realizando un corte en un lado del fémur con ayuda de bisturí seguido de una centrifugación a 6.000 rpm durante 1 min. Finalmente, se resuspendió en PBS y se conservó a 4°C hasta su posterior uso.

Para llevar a cabo el análisis inmunofenotípico se utilizó un total de 10 µL de muestra, tanto de sangre como de médula ósea. Se añadieron, a las muestras, cantidades saturantes de mAbs conjugados con fluorocromo junto con 50 µL de tampón de tinción (BD Biosciences, San José, CA). Todas las muestras fueron agitadas suavemente e incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Seguidamente, se adicionó tampón de lisis 1x (eBioscience™ 10X RBC Lysis Buffer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) a cada tubo para lisar los eritrocitos. Posteriormente, todas las muestras fueron procesadas en un citómetro de flujo BD LSRFortessa™ X-20 (BD Biosciences).

Se emplearon anticuerpos marcados con fluorocromos frente a diferentes marcadores de superficie para identificar los diferentes subtipos de leucocitos. Las muestras se incubaron con un mAb conjugado con violeta brillante (BV) 510 frente a CD45 de ratón (1,25 µL, clon 30-F11, IgG2b,κ, BD Biosciences) para detectar leucocitos (CD45⁺). Para eosinófilos (CD45⁺ Ly6G⁻ CD125⁺ SiglecF⁺), un mAb conjugado con ultravioleta brillante (BUV) 395 frente a Ly6G de ratón (1,25 µL, clon 1A8, IgG2a,κ, BD Biosciences), un mAb conjugado con PE-Cy7 frente a CD125 de ratón (5 µL, clon DIH37, IgG2a,κ, BioLegend, San Diego, CA) y un mAb conjugado con BV421 frente a SiglecF de ratón (5 µL, clon E50-2440, IgG2a,κ, BD Biosciences). Para progenitores de mastocitos (CD45⁺ CD49d⁻ FcεRIα⁺ CD117⁺) y basófilos (CD45⁺ CD49d⁻ FcεRIα⁺ CD117⁻), un mAb conjugado con BV605 frente a CD49d de ratón (1,25 µL, clon 9C10 (MFR4.B), IgG2a,κ, BD Biosciences), un mAb conjugado con PE frente a FcεRIα de ratón (2,5 µL, clon MAR-1, IgG, BioLegend) y un mAb conjugado con un BV421 frente a CD117 de ratón (2,5 µL, clon 2B8, IgG2b,κ, BD Biosciences).

Por último, para determinar la expresión de CCR3 en las diferentes poblaciones celulares estudiadas, se incubaron las muestras de sangre y de médula ósea con cantidades saturantes de un mAb conjugado con APC frente a CCR3 de ratón (5 μ l, clon J073E5, IgG2a,k, BioLegend). Las estrategias de *gating* usadas se ilustran en las Figuras 4 y 5.

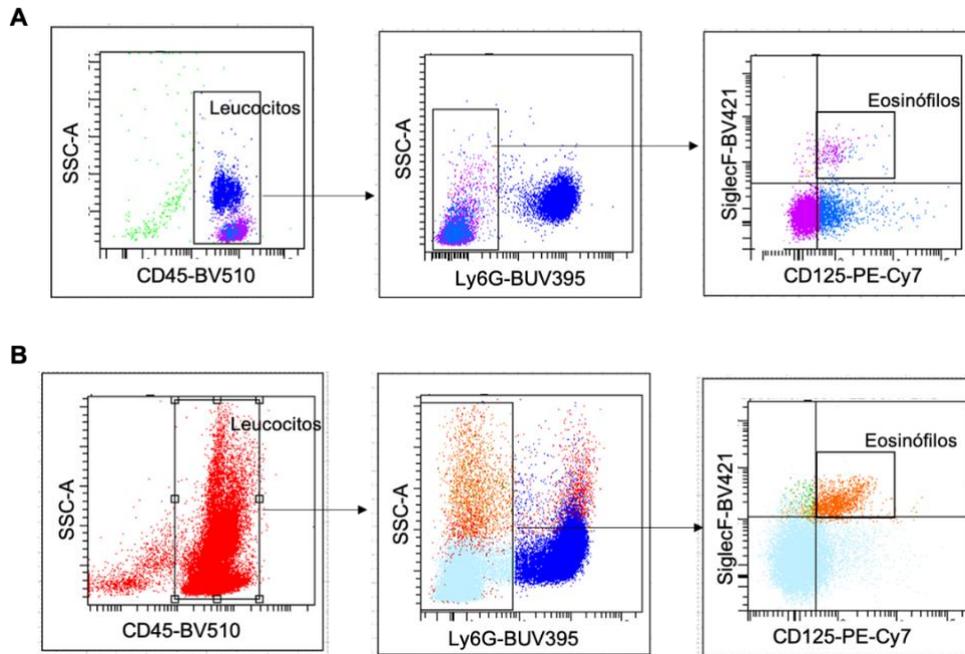


Figura 4. Estrategia de *gating* usada para la selección de leucocitos y eosinófilos murinos en sangre y en médula ósea. Los leucocitos murinos se seleccionaron como población CD45⁺, mientras que los eosinófilos se seleccionaron como población CD45⁺ Ly6G⁻ CD125⁺ SiglecF⁺, tanto en sangre (A) como en médula ósea (B).

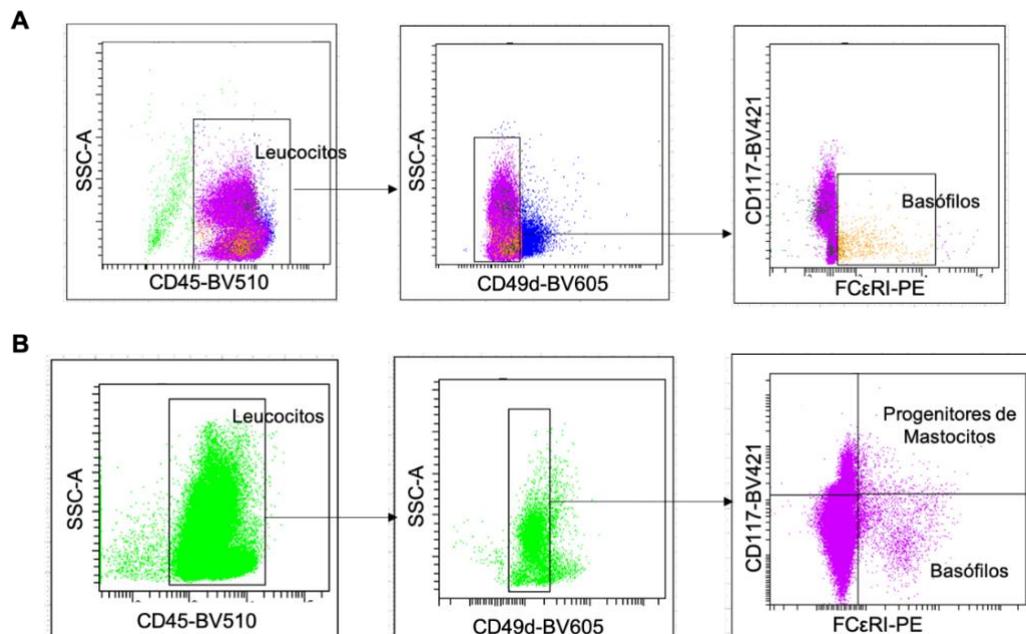


Figura 5. Estrategia de *gating* usada para la selección de basófilos y progenitores de mastocitos murinos en sangre y en médula ósea. Los basófilos murinos se seleccionaron como población CD45⁺ CD49d⁻ FcεRIα⁺ CD117⁻, mientras que los progenitores de mastocitos se seleccionaron como población CD45⁺ CD49d⁻ FcεRIα⁺ CD117⁺, tanto en sangre (A) como en médula ósea (B).

3.5. Cuantificación de los niveles plasmáticos de IL-4, IL-5, eotaxina-1/CCL11 y eotaxina-2/CCL24.

En el momento del sacrificio, se extrajo sangre heparinizada a los ratones en estudio y se centrifugó para la obtención de plasma. Las muestras de plasma se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso. Los niveles solubles de IL-4, IL-5, eotaxina-1/CCL11 y eotaxina-2 /CCL24 en plasma se cuantificaron utilizando kits de ELISA comerciales y siguiendo las instrucciones del fabricante (Mouse DuoSet® ELISA; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN). Los resultados se expresaron en pg/mL de citocina soluble en plasma.

3.6. Análisis estadístico

Todos los resultados se analizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) y los valores se expresaron como puntos de datos individuales, porcentajes o media \pm error estándar de la media (EEM) cuando corresponde. Para la determinación de diferencias entre los dos grupos experimentales se utilizó la prueba t de *Student* para datos no apareados en aquellos datos que aprobaron tanto la normalidad (prueba de *Kolmogorov-Smirnov*) como la igualdad de varianza (prueba de *Levene*), según corresponda; de lo contrario, se realizó una prueba *U de Mann Whitney* no paramétrica. Los datos fueron considerados estadísticamente significativos cuando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. La administración de una dieta rica en grasas durante dos meses a ratones apoE^{-/-} indujo el desarrollo de ateroma en el arco aórtico y la aorta torácica

La determinación de la lesión aterosclerótica, a nivel macroscópico mediante la tinción *Oil-Red-O* de aortas extraídas de ratones apoE^{-/-}, mostró un incremento significativo de las placas de ateroma en aquellos ratones sometidos a una dieta rica en grasas durante dos meses (**Figura 6A**).

Los valores de área de ateroma ascendieron aproximadamente a un 19% en el arco aórtico (**Figura 6B**) y a un 3% en la aorta torácica (**Figura 6C**). Estos valores sugieren que la dieta aterogénica promueve la formación de placa de ateroma, la cual se desarrolla predominantemente en el arco aórtico.

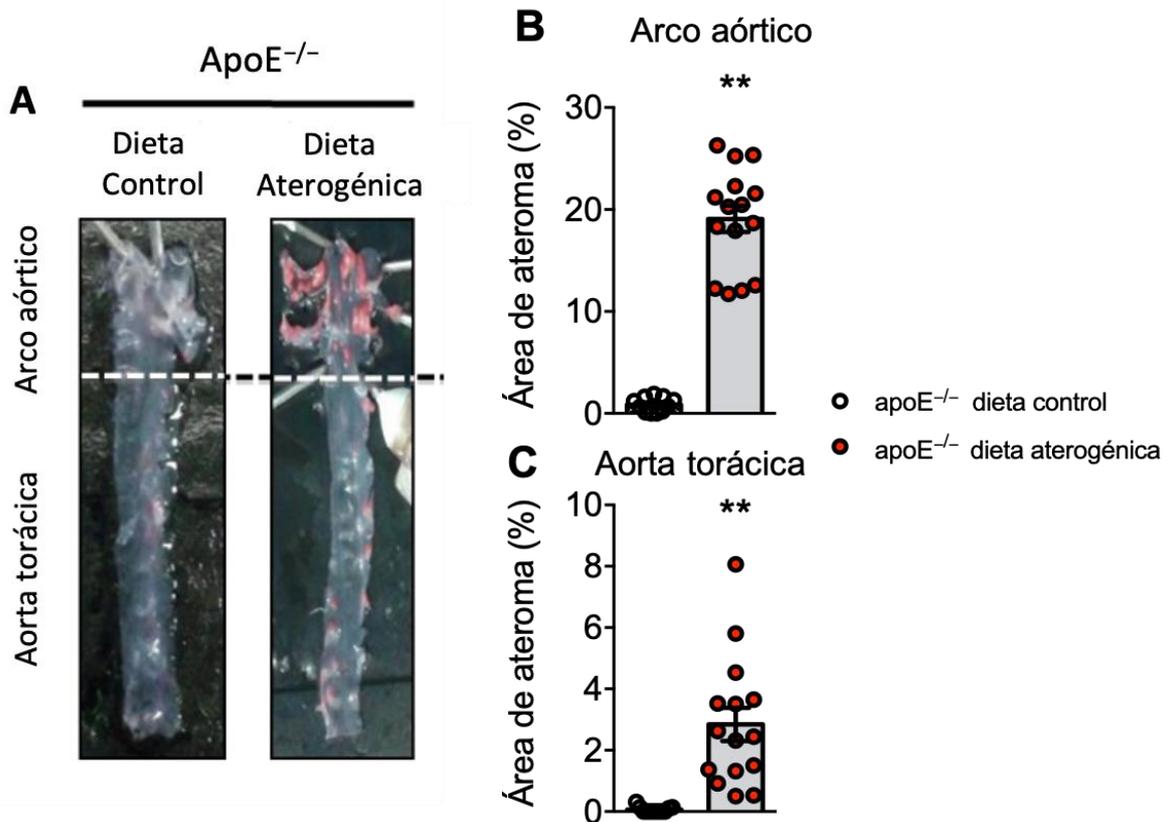


Figura 6. La administración de una dieta hipercolesterolémica durante dos meses a ratones apoE^{-/-} incrementó la formación de placa de ateroma en el arco aórtico y la aorta torácica. Se muestran imágenes representativas de aortas teñidas con tinción *Oil-Red-O* (A). Las áreas de ateroma se han calculado en el arco aórtico (B) y aorta torácica (C). Los resultados se presentan como media \pm EEM de n=15 animales por grupo. **P<0,01 relativo a los valores de los animales sometidos a una dieta control.

4.2. El grado de lesión aterosclerótica en las válvulas sigmoideas aórticas aumentó en ratones apoE^{-/-} sometidos a dieta aterogénica durante dos meses

Para estudiar la lesión a nivel microscópico se realizó una tinción hematoxilina/eosina sobre cortes transversales del seno aórtico del corazón (**Figura 7A**). El cociente íntima/media indica el grado de lesión presente en cada grupo (**Figura 7B**). El análisis de dicho cociente revela que en aquellos ratones apoE^{-/-} sometidos a una dieta control, el área de la íntima es menor que la media, mientras que en ratones sometidos a dieta hipercolesterolémica la superficie de la íntima es significativamente mayor, alcanzando un ratio íntima/media superior a 1 en la mayoría de los casos, indicando que en estos ratones existe mayor grado de lesión aterosclerótica. Además, se midió el área de la lesión, resultando ésta significativamente mayor en los ratones sometidos a dieta aterogénica frente aquellos con dieta control (**Figura 7C**).

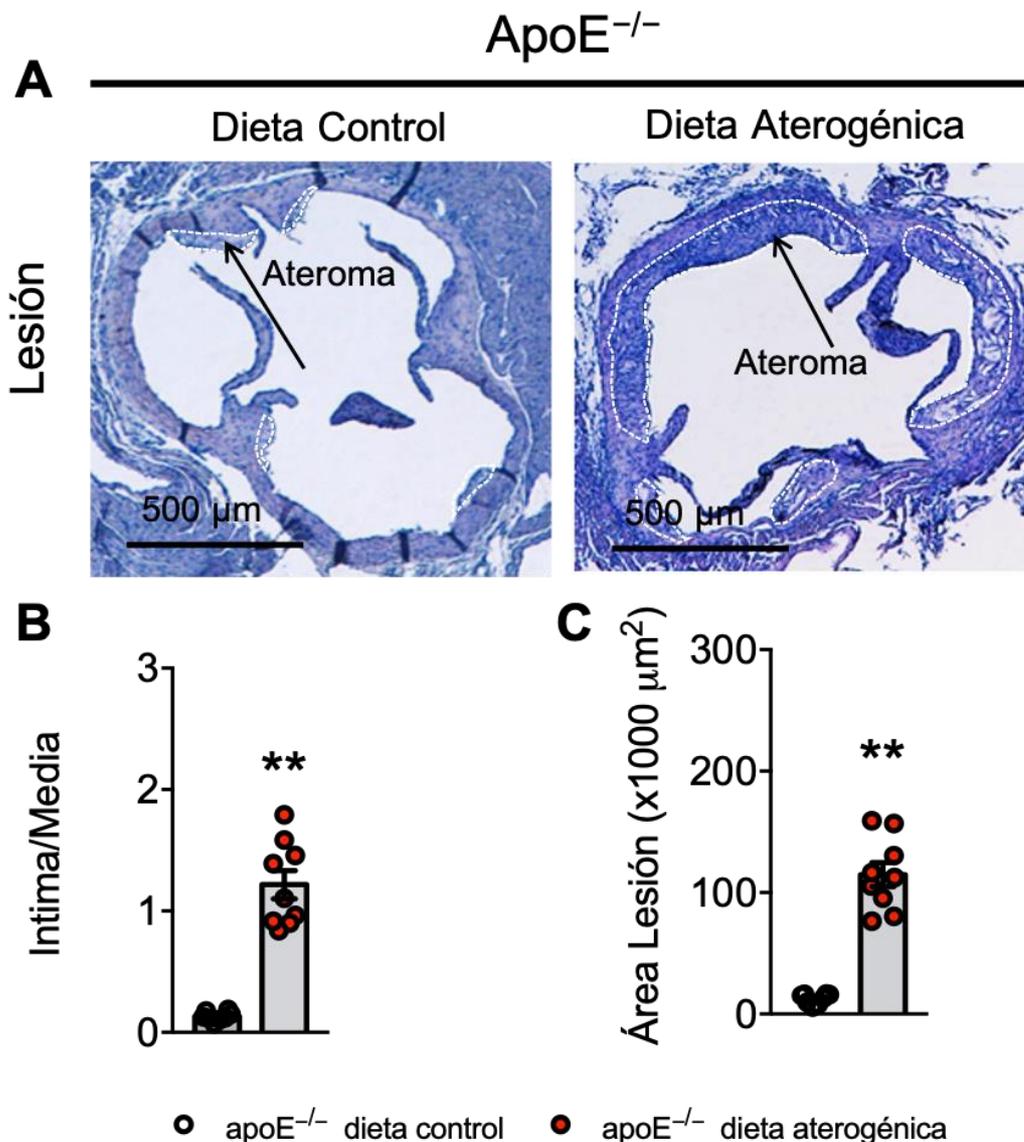


Figura 7. La administración de una dieta aterogénica durante dos meses a ratones apoE^{-/-} incrementó la lesión aterosclerótica en el seno aórtico. Se muestran imágenes representativas de cortes transversales del seno aórtico teñidos con

hematoxilina/eosina en los distintos grupos experimentales. Las líneas discontinuas delimitan la lesión aterosclerótica (A). Cociente íntima/media (B) y área de la lesión (C). Los resultados se presentan como media ± EEM de n=8 animales por grupo. **P<0,01 relativo a los valores del grupo sometido a una dieta control.

4.3. El porcentaje de leucocitos CCR3⁺ y eosinófilos circulantes aumentó en los ratones apoE^{-/-} sometidos a una dieta aterogénica

Se realizó un extenso estudio inmunofenotípico mediante citometría de flujo a partir de muestras de sangre y médula ósea (Figura 8). El análisis en sangre reveló un claro aumento de leucocitos circulantes que expresan CCR3 en ratones apoE^{-/-} alimentados con una dieta aterogénica con respecto al grupo control (Figura 8A). Dado que el porcentaje de leucocitos CCR3⁺ se ve aumentado, y que los eosinófilos, basófilos y progenitores de mastocitos son las principales poblaciones murinas que expresan este receptor, se determinó el porcentaje de cada población celular en ambos grupos experimentales.

De toda la población leucocitaria CCR3⁺, se observó un incremento significativo en los niveles circulantes de eosinófilos en el grupo sometido a una dieta aterogénica (Figura 8B), mientras que no se observaron diferencias en el porcentaje de basófilos entre los grupos (Figura 8C).

Lo mismo sucedió al estudiar la médula ósea, observándose un mayor número de leucocitos CCR3⁺ (Figura 8D), debido a un mayor número de eosinófilos (Figura 8E) en aquellos ratones sometidos a una dieta aterogénica durante dos meses, sin observar cambios en el porcentaje de basófilos o progenitores de mastocitos (Figuras 8F y G).

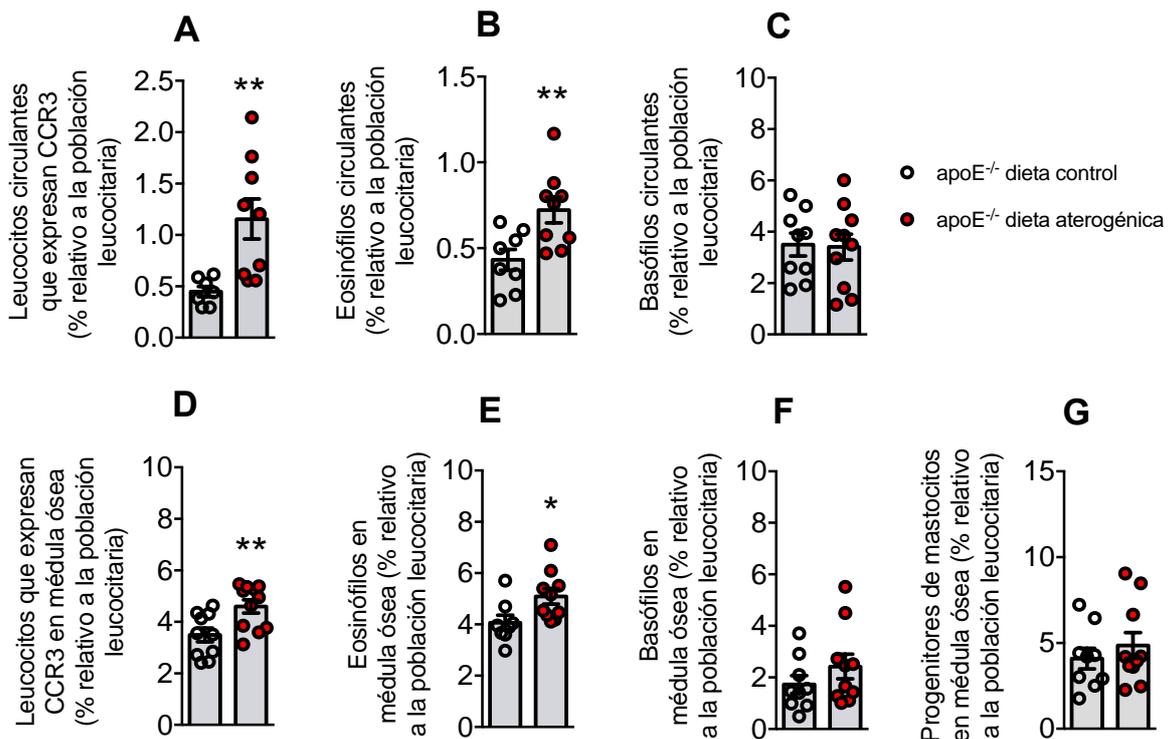


Figura 8. Los ratones apoE^{-/-} sometidos a dieta aterogénica durante dos meses mostraron un incremento en los niveles de leucocitos CCR3⁺ y eosinófilos, tanto en sangre como en médula ósea. Las muestras de sangre y de médula ósea se tiñeron con marcadores específicos para leucocitos CCR3⁺ (A y D), eosinófilos (B y E), basófilos (C y F) así como para progenitores de mastocitos (G), y se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados están expresados en porcentaje de células positivas, y los valores se presentan como media ± EEM de n=9 animales por grupo. *P<0,05 y **P<0,01 relativo a los valores del grupo sometido a una dieta control.

4.4. Los niveles plasmáticos de eotaxina-1/CCL11 aumentaron en ratones apoE^{-/-} alimentados con dieta aterogénica.

Los niveles plasmáticos de citocinas relevantes en la eosinofilo-poyesis, trans migración y quimiotaxis de eosinófilos (IL-4, IL-5, eotaxina-1/CCL11 y eotaxina-2/CCL24) se determinaron mediante ELISA en los distintos grupos experimentales (Figura 9). Mientras que no se observaron diferencias en los niveles plasmáticos de IL-4 e IL-5 (Figuras 9A y B), se detectó un incremento significativo de los niveles circulantes de eotaxina-1/CCL11 (Figura 9C), así como una disminución en los niveles de eotaxina-2/CCL24 (Figura 9D) en los ratones sometidos a una dieta aterogénica frente a ratones control.

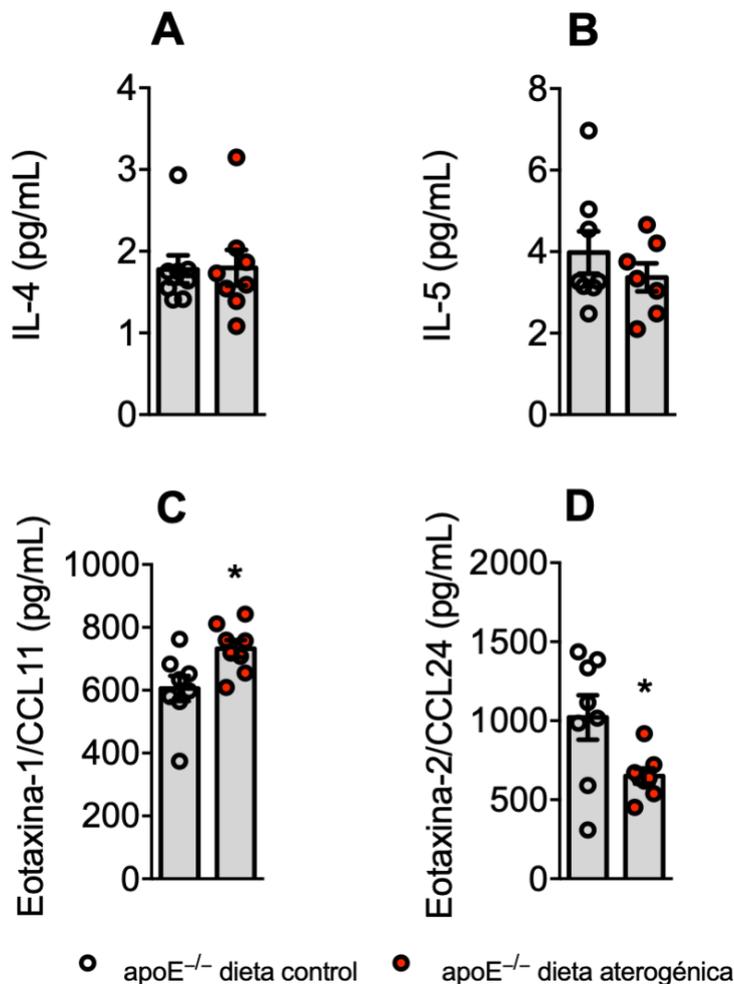


Figura 9. Los niveles circulantes de eotaxina-1/CCL11 se incrementaron en los ratones apoE^{-/-} sometidos a una dieta aterogénica. Los niveles plasmáticos (pg/mL) de IL-4 (A), IL-5 (B), eotaxina-1/CCL11 (C) y eotaxina-2/CCL24 (D) fueron determinados mediante ELISA. Los resultados se presentan como media ± EEM de n=7-8 animales por grupo. *P<0,05 relativo a los valores del grupo sometido a una dieta control.

4.5. El número de eosinófilos infiltrados en las válvulas sigmoideas aumentó significativamente en ratones apoE^{-/-} tras dos meses con dieta aterogénica.

Dado el aumento del número de eosinófilos circulantes y de los niveles de eotaxina-1/CCL11 en los ratones sometidos a una dieta aterogénica frente al grupo control, se evaluó mediante inmunofluorescencia la infiltración eosinofílica en el seno aórtico en los ratones de ambos grupos (**Figura 10A**).

Tras realizar un conteo de las células Siglec-F⁺ CCR3⁺, se observó un aumento significativo de la infiltración eosinofílica en el seno aórtico de los ratones alimentados con dieta aterogénica con respecto los ratones control (**Figura 10B**).

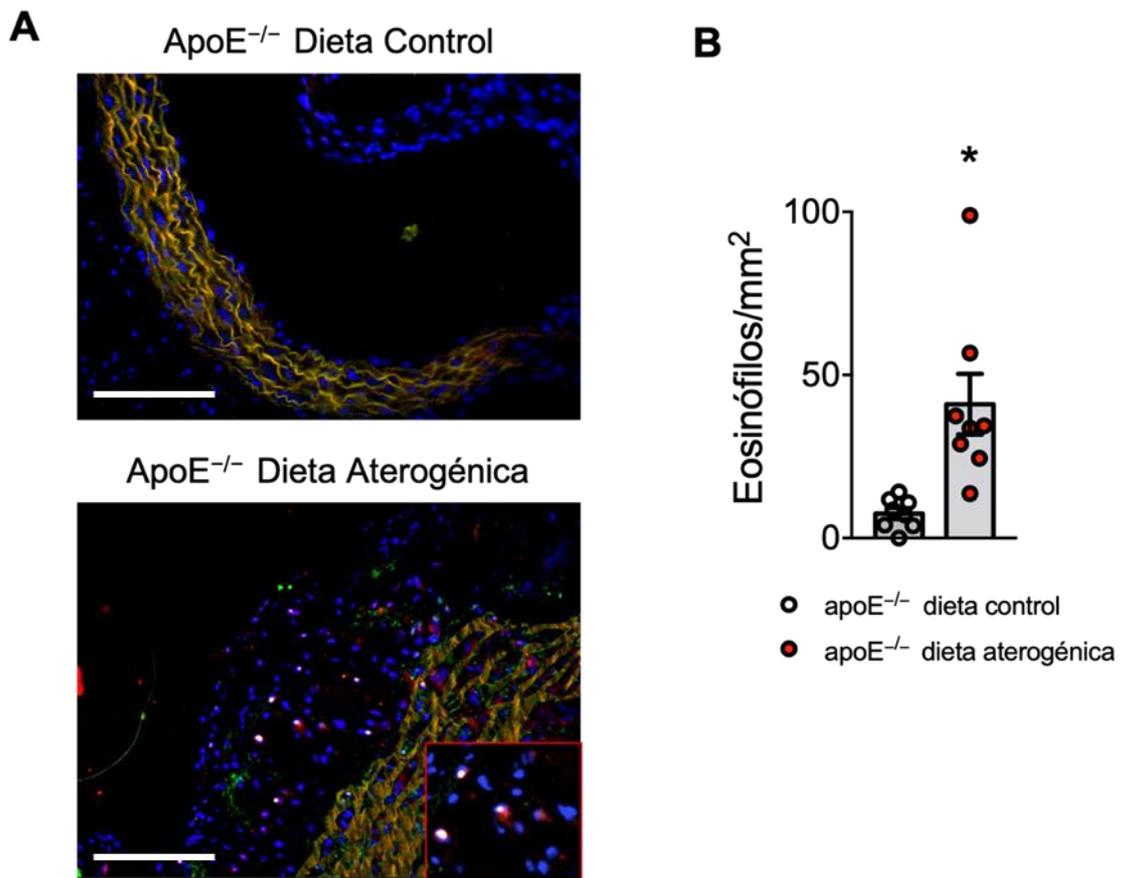


Figura 10. Los ratones apoE^{-/-} alimentados con dieta aterogénica presentan mayor número de eosinófilos infiltrados en el seno aórtico. Se muestran imágenes representativas del ensayo de inmunofluorescencia (A). El color verde (Alexa Fluor 488) indica presencia del marcador altamente expresado en eosinófilos Siglec-F, el color rojo

(Alexa Fluor 594) indica presencia del marcador CCR3, y el color azul los núcleos (Hoechst). La sobreposición de las tres fluorescencias proporciona un color amarillo, indicando específicamente la presencia de eosinófilos. Número de eosinófilos infiltrados en el seno aórtico por mm² (células Siglec-F⁺ CCR3⁺) (**B**). Los resultados están expresados como número de células Siglec-F⁺ CCR3⁺ por mm², y los valores se presentan como media ± EEM de cada animal (n= 8). *P< 0,05 relativo a los valores del grupo control. Escala de barra = 100 µm.

5. DISCUSIÓN

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica y la causa subyacente de infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y muerte cardíaca súbita. En conjunto, estas enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de muerte en el mundo (Tabas *et al.*, 2015). Se sabe que esta patología está asociada a un estado de inflamación sistémica de bajo grado (R. Ross, 1999) y como tal, se ha estudiado la implicación de varias poblaciones leucocitarias en la aterosclerosis, pero hasta el momento, no existen estudios que caractericen de manera exhaustiva el papel de los eosinófilos y el eje CCR3/CCL11, receptor presente en la superficie de eosinófilos y su principal citocina quimioatrayente (Ahmadi *et al.*, 2016), en esta patología.

En el presente trabajo se llevó cabo el estudio de la infiltración de eosinófilos en la lesión aterosclerótica en un modelo animal de aterosclerosis. Para ello, se emplearon ratones deficientes en la apolipoproteína E (apoE^{-/-}) de dos meses de edad, sometidos o no a una dieta hipercolesterolémica durante dos meses adicionales. Este modelo murino surge de la necesidad del estudio de las ECV y aparece ya en la década de los 90 con la ayuda de la ingeniería genética a través de la inactivación de la apoE por recombinación homóloga (Lo Sasso *et al.*, 2016). Desde su desarrollo, el ratón apoE^{-/-} constituye el modelo más utilizado para el estudio preclínico de los mecanismos moleculares implicados en el inicio y el progreso de las lesiones ateroscleróticas, ya que desarrolla espontáneamente complejas placas de ateroma muy similares a las observadas en humanos; proceso que puede verse acelerado al someterlos a una dieta hipercolesterolémica (Collado *et al.*, 2015)

Previamente a la realización del estudio de la población leucocitaria de interés, se procedió a la cuantificación de la lesión aterosclerótica desarrollada en ambos grupos experimentales para validar el modelo animal utilizado como modelo animal de aterosclerosis. En primer lugar, el estudio de la lesión macroscópica mediante la tinción *Oil-Red-O* realizada sobre las aortas evidenció que el grado de aterosclerosis es significativamente mayor en aquellos ratones con dieta hipercolesterolémica que en los ratones sometidos a una dieta control. Así mismo, se observó que el área de la lesión en el arco aórtico era mayor que en la aorta torácica, confirmando que las placas de ateroma se desarrollan predominantemente en zonas donde el flujo sanguíneo es irregular y turbulento como sucede en la mayor curvatura de la aorta. Esta propensión por la formación de placa de ateroma en zonas de curvatura arterial se debe a cambios en el flujo local que, a su vez, favorecen el desarrollo de disfunción endotelial, una de las primeras etapas de la aterogénesis (Badimón & Martínez-González, 2006; Tabas *et al.*, 2015).

En esa línea, también se observó, a nivel microscópico, un aumento significativo de la lesión aterosclerótica en el seno aórtico de ratones alimentados con dieta aterogénica frente al grupo control. Estos resultados coinciden con estudios realizados anteriormente en este contexto (Li *et al.*, 2016). De hecho, está ampliamente aceptado que la lesión aterosclerótica se ve agravada por una dieta rica en grasas, si bien otros factores como el consumo activo de alcohol puede afectar negativamente al grado de complicación de la enfermedad (Furuta *et al.*, 2019).

Una vez confirmado que la dieta aterogénica en ratones apoE^{-/-} promueve el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica, y dado que se han descrito niveles elevados tanto de eotaxina-1/CCL11 como de su receptor CCR3 en placas ateroscleróticas humanas (Haley *et al.*, 2000), se procedió al estudio de la expresión del eje CCR3/CCL11 en este modelo animal.

Para ello, se llevó a cabo un estudio inmunofenotípico mediante citometría de flujo a partir de muestras de sangre y médula ósea. Los resultados indicaron un claro aumento de leucocitos CCR3⁺ en ratones apoE^{-/-} alimentados con una dieta aterogénica con respecto al grupo control. Está ampliamente descrito que el receptor CCR3 es responsable del tráfico de eosinófilos a tejidos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Daugherty *et al.*, 1996). De hecho, se ha confirmado por citometría de flujo que el aumento de la expresión de este receptor se debe, en realidad, a un aumento del número de eosinófilos circulantes, población leucocitaria que expresa constitutivamente el receptor CCR3 (Grimaldi *et al.*, 1999), producida en la médula ósea.

Los mastocitos son células de tejido residentes que, cuando se activan, expresan el receptor CCR3 (Price *et al.*, 2003). En condiciones normales, no circulan por el torrente sanguíneo, por lo que no pueden ser directamente determinadas, pero si lo hacen los progenitores de mastocitos, que también expresan el receptor CCR3 (Li *et al.*, 2001) y migran rápidamente a los tejidos donde se diferencian en mastocitos bajo la influencia de varias citocinas (Krystel-Whittemore *et al.*, 2016). Dada la baja permanencia de los mastocitos progenitores en circulación, los niveles de esta población en sangre no fueron determinados. En este sentido, no se observaron diferencias en el porcentaje de mastocitos progenitores en médula ósea entre los grupos experimentales. Los basófilos también expresan en gran medida el receptor CCR3 (Forsythe & Befus, 2003), sin embargo, el porcentaje de basófilos tampoco se vio afectado por la dieta aterogénica.

De este modo, de todos los leucocitos CCR3⁺, los eosinófilos parecen ser los responsables del aumento de la expresión CCR3 en leucocitos detectado, ya que no se han observado diferencias en el porcentaje basófilos o de progenitores de mastocitos entre los grupos experimentales, y los linfocitos Th2 murinos no expresan el receptor CCR3, al contrario de los humanos (Grimaldi *et al.*, 1999).

Dado el aumento del número de eosinófilos circulantes detectado, se midieron los niveles plasmáticos de distintas citocinas directamente relacionadas con la eosinofilopoyesis, transmigración y quimiotaxis de eosinófilos. Mientras que no se detectaron diferencias en los niveles plasmáticos de IL-4 e IL-5 – citocinas involucradas en diversas fases de la eosinofilopoyesis (Olivieri *et al.*, 2020; Weller & Spencer, 2017), así como en la inducción de CCR3 y producción de eotaxina-1/CCL11 (Hattori & Ishihara, 2020; Turner *et al.*, 2018)– un claro aumento en los niveles de eotaxina-1/CCL11, así como una disminución en los niveles de eotaxina-2/CCL24 fue observado en los ratones sometidos a una dieta aterogénica frente al grupo control, ambas quimiocinas involucradas en la quimiotaxis eosinofílica (Weller & Spencer, 2017).

La expresión de IL-5R es uno de los pasos terminales en la eosinofilo-poyesis y modula los niveles de estas células en sangre, por lo que la eosinofilia suele estar acompañada de una sobreexpresión de IL-5 (Olivieri *et al.*, 2020). Sin embargo, a la vista de los resultados, el aumento observado en el número de eosinófilos no coincide con un aumento en los niveles circulantes de IL-5, citocina clave en la maduración de eosinófilos a partir de progenitores en la médula ósea, así como en la supervivencia y función de esta célula inmune (Weller & Spencer, 2017). Nuestros resultados coinciden con los resultados del grupo de Marx *et al.* (2019), en los que tampoco encontraron un aumento en los niveles de esta interleucina.

La migración de los eosinófilos hacia los tejidos puede ser inducida por una gran variedad de quimiocinas, entre las que se encuentran eotaxina-1/CCL11 y eotaxina-2/CCL24, siendo la primera la quimiocina más potente implicada en el reclutamiento de este subtipo leucocitario (Willetts *et al.*, 2014). En un estudio exhaustivo, llevado a cabo por el grupo, sobre el estado inflamatorio en el síndrome metabólico – desorden metabólico frecuentemente asociado a aterosclerosis (Aboonabi *et al.*, 2019) – también se han detectado niveles reducidos de eotaxina-2/CCL24 en pacientes con este desorden metabólico cuando comparado con voluntarios sanos (Marques *et al.*, 2019). De igual modo, estudios previos y no publicados de nuestro grupo, detectaron que los pacientes con hipercolesterolemia familiar presentaban niveles más altos de eotaxina-1/CCL11 y -3/CCL26 que los detectados en voluntarios sanos, pero no se vieron diferencias en los niveles de eotaxina-2/CCL24. Estos datos son similares a los hallados en nuestro modelo animal cuando es sometido a una dieta hipercolesterolémica, apoyando así la traslacionalidad de nuestro modelo al detectar niveles plasmáticos más altos de eotaxina-1/CCL11.

La eotaxina-1/CCL11 se ha encontrado altamente expresada en zonas con patología vascular, incluidas las placas ateroscleróticas; de hecho, evidencias crecientes apoyan su participación en la aterosclerosis, aparentemente independientemente de los eosinófilos (Emanuele *et al.*, 2006; Williams, 2015). Dado que los niveles circulantes de esta quimiocina parecen reflejar la extensión de la aterosclerosis, la eotaxina-1/CCL11 podría ser utilizada como un biomarcador de esta enfermedad. No obstante, los datos sobre la relación entre los niveles circulantes de eotaxina y la aterosclerosis son todavía escasos y contradictorios (Mosedale *et al.*, 2005).

La eotaxina-1/CCL11 es producida principalmente por células epiteliales, células endoteliales y fibroblastos bajo el control de diversas citocinas, como IL-4, IL-9, IL-13 e IL-17 (Hattori & Ishihara, 2020). Diversas fuentes indican que la señalización de IL-4/IL-13 induce la producción de eotaxina-1/CCL11, contribuyendo a la eosinofilia. Además, IL-4 induce la expresión de CCR3 en eosinófilos, receptor a través del cual señalizan las diferentes eotaxinas para promover la quimiotaxis (Turner *et al.*, 2018). Sin embargo, en base a los resultados obtenidos en este trabajo, IL-4 parece no estar implicada en el incremento en los niveles de eotaxina-1/CCL11 observado en nuestro modelo animal, al no coincidir con un aumento de esta citocina. El incremento en la producción de eotaxina-1/CCL11 podría ser inducido por otros mediadores no considerados en el estudio, como la IL-13, que como se ha mencionado anteriormente, también interviene en la producción de eotaxina-1/CCL11 (Hattori & Ishihara, 2020; Lv *et al.*, 2018).

Debido a la expresión aumentada del eje CCR3/CCL11 en la circulación y médula ósea de los ratones apoE^{-/-} sometidos a dieta aterogénica frente al grupo control, se realizó la determinación del número de eosinófilos infiltrados en las válvulas cardíacas por un ensayo de inmunofluorescencia en cortes transversales de corazón de los animales en estudio. El análisis histológico reveló un incremento significativo de la infiltración eosinofílica en las válvulas cardíacas de ratones sometidos a una dieta aterogénica frente a los sometidos a una dieta control. Este aumento en el número de eosinófilos coincide con un aumento en los niveles circulantes de eotaxina-1/CCL11, como se ha descrito anteriormente, quimiocina específica de eosinófilos que podría ser la responsable de la infiltración de esta población leucocitaria en las válvulas sigmoideas aórticas. Aunque a día de hoy no hay datos que indiquen su implicación directa en la infiltración de eosinófilos en las válvulas sigmoideas de la aorta, se sabe que este subtipo leucocitario migra a los pulmones, así como a una gran variedad de tejidos, a través de un gradiente quimiotáctico de eotaxina-1/CCL11 (Lv *et al.*, 2018; Weller & Spencer, 2017).

Los eosinófilos se han considerado durante mucho tiempo células efectoras con una función protectora contra las infecciones parasitarias. Sin embargo, también están asociados con numerosas enfermedades inflamatorias. De hecho, se ha descrito que este subtipo leucocitario interacciona con las plaquetas, facilitando la adhesión plaquetaria y promoviendo la formación de la placa aterosclerótica y la trombosis (Marx *et al.*, 2019). No obstante, recientemente se ha descubierto que esta población tiene un papel beneficioso en el desarrollo de aneurisma aórtico abdominal (Liu *et al.*, 2021). Así mismo, se ha visto que la cooperación entre adipocitos y eosinófilos promueve la homeostasis metabólica al apoyar la infiltración eosinofílica en el tejido adiposo y mantener el microambiente para la maduración de los adipocitos (Lee *et al.*, 2018). Sin embargo, hasta la fecha, no se puede lograr una conclusión clara a partir de estos resultados y, por tanto, se requieren estudios adicionales para averiguar el verdadero papel de los eosinófilos en la aterosclerosis, así como el papel del eje CCR3/CCL11 en este complejo proceso.

6. CONCLUSIONES

A continuación, se presentan las principales conclusiones extraídas del presente estudio:

1. La formación de placas de ateroma en ratones apoE^{-/-} se ve acelerada por la administración de una dieta aterogénica durante dos meses. Además, estas complejas placas ateroscleróticas tienden a desarrollarse en el arco aórtico, una zona de flujo irregular y propicia al desarrollo de disfunción endotelial.
2. El aumento detectado en los niveles de leucocitos que expresan CCR3, en ratones sometidos a dieta aterogénica, se debe a un aumento del porcentaje de eosinófilos circulantes, procedentes de la médula ósea.
3. De todas las citocinas de gran relevancia en la eosinofilo-poyesis, transmigración y quimiotaxis de eosinófilos, únicamente los niveles plasmáticos de eotaxina-1/CCL11 se han visto aumentados por una dieta aterogénica.
4. El aumento de los niveles plasmáticos de eotaxina-1/CCL11 está acompañado de un aumento de la infiltración eosinofílica en las válvulas cardíacas, por lo que eotaxina-1/CCL11 parece ser la quimiocina clave en la infiltración de los eosinófilos en la lesión aterosclerótica.
5. En síntesis, será necesario seguir estudiando la implicación de los eosinófilos en la aterosclerosis, así como el papel del eje CCR3/CCL11 en la orquestación de este complejo proceso.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aboonabi, A., Meyer, R. R., & Singh, I. (2019). The association between metabolic syndrome components and the development of atherosclerosis. *Journal of Human Hypertension*, 33(12), 844-855. <https://doi.org/10.1038/s41371-019-0273-0>
- Ahmadi, Z., Hassanshahi, G., Khorramdelazad, H., Zainodini, N., & Koochakzadeh, L. (2016). An Overlook to the Characteristics and Roles Played by Eotaxin Network in the Pathophysiology of Food Allergies: Allergic Asthma and Atopic Dermatitis. *Inflammation*, 39(3), 1253-1267. <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0303-9>
- Avogaro, A., & de Kreutzenberg, S. V. (2005). Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. *Clinica Chimica Acta*, 360(1), 9-26. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.04.020>
- Badimon, J. J., Badimon, B., & Fuster, V. (2002). Fisiopatología de la enfermedad aterotrombótica coronaria. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 14(5), 258-271. [https://doi.org/10.1016/S0214-9168\(02\)78871-2](https://doi.org/10.1016/S0214-9168(02)78871-2)
- Badimón, L., & Martínez-González, J. (2006). Disfunción endotelial. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 6(1), 21A-30A. [https://doi.org/10.1016/S1131-3587\(06\)74817-8](https://doi.org/10.1016/S1131-3587(06)74817-8)
- Badimon, L., & Vilahur, G. (2014). Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *Journal of Internal Medicine*, 276(6), 618-632. <https://doi.org/10.1111/joim.12296>
- Bochner, B. S. (2009). Siglec-8 on human eosinophils and mast cells, and Siglec-F on murine eosinophils, are functionally related inhibitory receptors. *Clinical & Experimental Allergy*, 39(3), 317-324. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.03173.x>
- Chen, C., & Khismatullin, D. B. (2015). Oxidized Low-Density Lipoprotein Contributes to Atherogenesis via Co-activation of Macrophages and Mast Cells. *PLOS ONE*, 10(3), e0123088. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123088>
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204-7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>
- Cheng, S., Zhou, F., Xu, Y., Liu, X., Zhang, Y., Gu, M., Su, Z., Zhao, D., Zhang, L., & Jia, Y. (2019). Geniposide regulates the miR-101/MKP-1/p38 pathway and alleviates atherosclerosis inflammatory injury in ApoE^{-/-} mice. *Immunobiology*, 224(2), 296-306. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2018.12.005>
- Cho, J. G., Lee, A., Chang, W., Lee, M.-S., & Kim, J. (2018). Endothelial to Mesenchymal Transition Represents a Key Link in the Interaction between Inflammation and Endothelial Dysfunction. *Frontiers in Immunology*, 9, 294. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00294>
- Collado, A., Perez-Alós, L., Escudero, P., Piqueras, L., Blanes, J. I., & Sanz, M. J. (2015). El ratón deficiente en apolipoproteína E, un modelo traslacional para el estudio de la aterosclerosis. *Angiología*, 67(5), 342-351. <https://doi.org/10.1016/j.angio.2015.01.007>
- Daugherty, B., Siciliano, S., DeMartino, J., Malkowitz, L., Sirotna, A., & Springer, M. (1996). Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. *The Journal of experimental medicine*, 183(5), 2349—2354.

<https://doi.org/10.1084/jem.183.5.2349>

de Vries, M. R., & Quax, P. H. A. (2016). Plaque angiogenesis and its relation to inflammation and atherosclerotic plaque destabilization. *Current Opinion in Lipidology*, 27(5), 499-506. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000339>

Elsner, J., Escher, S. E., & Forssmann, U. (2004). Chemokine receptor antagonists: A novel therapeutic approach in allergic diseases. *Allergy*, 59(12), 1243-1258. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2004.00710.x>

Emanuele, E., Falcone, C., D'Angelo, A., Minoretti, P., Buzzi, M. P., Bertona, M., & Geroldi, D. (2006). Association of plasma eotaxin levels with the presence and extent of angiographic coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 186(1), 140-145. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.07.002>

Escudero, P., Martinez de Marañón, A., Collado, A., Gonzalez-Navarro, H., Hermenegildo, C., Peiró, C., Piqueras, L., & Sanz, M.-J. (2015). Combined Sub-Optimal Doses of Rosuvastatin and Bexarotene Impair Angiotensin II-Induced Arterial Mononuclear Cell Adhesion Through Inhibition of Nox5 Signaling Pathways and Increased RXR/PPAR α and RXR/PPAR γ Interactions. *Antioxidants & Redox Signaling*, 22(11), 901-920. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5969>

Fava, C., & Montagnana, M. (2018). Atherosclerosis Is an Inflammatory Disease which Lacks a Common Anti-inflammatory Therapy: How Human Genetics Can Help to This Issue. A Narrative Review. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 55. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00055>

Ferguson, A. R., & Engelhard, V. H. (2010). CD8 T Cells Activated in Distinct Lymphoid Organs Differentially Express Adhesion Proteins and Coexpress Multiple Chemokine Receptors. *The Journal of Immunology*, 184(8), 4079-4086. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901903>

Forsythe, P., & Befus, A. D. (2003). CCR3: A Key to Mast Cell Phenotypic and Functional Diversity? *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 28(4), 405-409. <https://doi.org/10.1165/rcmb.F265>

Furuta, Y., Liu, J., Himemiya-Hakucho, A., Yoshimura, K., & Fujimiya, T. (2019). Alcohol Consumption in Combination with an Atherogenic Diet Increased Indices of Atherosclerosis in Apolipoprotein E/Low-Density Lipoprotein Receptor Double-Knockout Mice. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 43(2), 227-242. <https://doi.org/10.1111/acer.13925>

Galeana, D. F. B., & Yamazaki, D. M. A. (2003). Eosinófilos: Revisión de la literatura. *Alergia, asma e inmunología pediátrica*, 12(2), 56-62.

Geng, S., Chen, K., Yuan, R., Peng, L., Maitra, U., Diao, N., Chen, C., Zhang, Y., Hu, Y., Qi, C.-F., Pierce, S., Ling, W., Xiong, H., & Li, L. (2016). The persistence of low-grade inflammatory monocytes contributes to aggravated atherosclerosis. *Nature Communications*, 7(1), 13436. <https://doi.org/10.1038/ncomms13436>

Glasser, S. P., Selwyn, A. P., & Ganz, P. (1996). Atherosclerosis: Risk factors and the vascular endothelium. *American Heart Journal*, 131(2), 379-384. [https://doi.org/10.1016/S0002-8703\(96\)90370-1](https://doi.org/10.1016/S0002-8703(96)90370-1)

Grimaldi, J. C., Yu, N.-X., Grunig, G., Seymour, B. W. P., Cottrez, F., Robinson, D. S.,

- Hosken, N., Ferlin, W. G., Wu, X., Soto, H., O'Garra, A., Howard, M. C., & Coffman, R. L. (1999). Depletion of eosinophils in mice through the use of antibodies specific for C-C chemokine receptor 3 (CCR3). *Journal of Leukocyte Biology*, 65(6), 846-853. <https://doi.org/10.1002/jlb.65.6.846>
- Haley, K. J., Lilly, C. M., Yang, J.-H., Feng, Y., Kennedy, S. P., Turi, T. G., Thompson, J. F., Sukhova, G. H., Libby, P., & Lee, R. T. (2000). Overexpression of Eotaxin and the CCR3 Receptor in Human Atherosclerosis: Using Genomic Technology to Identify a Potential Novel Pathway of Vascular Inflammation. *Circulation*, 102(18), 2185-2189. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.102.18.2185>
- Hansson, G. K., Libby, P., & Tabas, I. (2015). Inflammation and plaque vulnerability. *Journal of Internal Medicine*, 278(5), 483-493. <https://doi.org/10.1111/joim.12406>
- Hattori, H., & Ishihara, M. (2020). Fibroblast growth factor-2 and interleukin-4 synergistically induce eotaxin-1 expression in adipose tissue-derived stromal cells. *Cell Biology International*, 44(5), 1124-1132. <https://doi.org/10.1002/cbin.11309>
- Ikutani, M., Yanagibashi, T., Ogasawara, M., Tsuneyama, K., Yamamoto, S., Hattori, Y., Kouro, T., Itakura, A., Nagai, Y., Takaki, S., & Takatsu, K. (2012). Identification of Innate IL-5-Producing Cells and Their Role in Lung Eosinophil Regulation and Antitumor Immunity. *The Journal of Immunology*, 188(2), 703-713. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101270>
- INE, Instituto Nacional de Estadística (2019). *Defunciones según causa de muerte*. Recuperado 02 de junio de 2021, de <https://www.ine.es/jaxiT3/Datos.htm?t=7947>.
- Insull, W. (2009). The Pathology of Atherosclerosis: Plaque Development and Plaque Responses to Medical Treatment. *The American Journal of Medicine*, 122(1 Suppl), S3-S14. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2008.10.013>
- Krystel-Whittemore, M., Dileepan, K. N., & Wood, J. G. (2016). Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Frontiers in Immunology*, 6, 620. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00620>
- Kwak, B. R., Bäck, M., Bochaton-Piallat, M.-L., Caligiuri, G., Daemen, M. J. A. P., Davies, P. F., Hofer, I. E., Holvoet, P., Jo, H., Krams, R., Lehoux, S., Monaco, C., Steffens, S., Virmani, R., Weber, C., Wentzel, J. J., & Evans, P. C. (2014). Biomechanical factors in atherosclerosis: Mechanisms and clinical implications. *European Heart Journal*, 35(43), 3013-3020. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu353>
- Landmesser, U. (2004). Endothelial Function: A Critical Determinant in Atherosclerosis? *Circulation*, 109(21 Suppl 1), II27-II33. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000129501.88485.1f>
- Lee, E.-H., Itan, M., Jang, J., Gu, H.-J., Rozenberg, P., Mingler, M. K., Wen, T., Yoon, J., Park, S.-Y., Roh, J. Y., Choi, C. S., Park, W.-J., Munitz, A., & Jung, Y. (2018). Eosinophils support adipocyte maturation and promote glucose tolerance in obesity. *Scientific Reports*, 8(1), 9894. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28371-4>
- Ley, K., Miller, Y. I., & Hedrick, C. C. (2011). Monocyte and Macrophage Dynamics During Atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(7), 1506-1516. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.221127>
- Li, Y., G Zhang, C., Wang, X.-H., & Liu, D.-H. (2016). Progression of atherosclerosis in

ApoE-knockout mice fed on a high-fat diet. *European review for medical and pharmacological sciences*, 20(18), 3863—3867.

Li, Y., Li, L., Wadley, R., Reddel, S., Qi, J., Archis, C., Collins, A., Clark, E., Cooley, M., Kouts, S., Naif, H., Alali, M., Cunningham, A., Wong, G., Stevens, R., & Krilis, S. (2001). Mast cells/basophils in the peripheral blood of allergic individuals who are HIV-1 susceptible due to their surface expression of CD4 and the chemokine receptors CCR3, CCR5, and CXCR4. *Blood*, 97(11), 3484—3490. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.11.3484>

Libby, P. (2012). History of Discovery: Inflammation in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(9), 2045-2051. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179705>

Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L., Hansson, G. K., Deanfield, J., Bittencourt, M. S., Tokgözoğlu, L., & Lewis, E. F. (2019). Atherosclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 56. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>

Libby, P., Ridker, P. M., & Hansson, G. K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 473(7347), 317-325. <https://doi.org/10.1038/nature10146>

Liu, C.-L., Liu, X., Zhang, Y., Liu, J., Yang, C., Luo, S., Liu, T., Wang, Y., Lindholt, J. S., Diederichsen, A., Rasmussen, L. M., Dahl, M., Sukhova, G. K., Lu, G., Upchurch, G. R., Libby, P., Guo, J., Zhang, J., & Shi, G.-P. (2021). Eosinophils Protect Mice From Angiotensin-II Perfusion-Induced Abdominal Aortic Aneurysm. *Circulation research*, 128(2), 188—202. <https://doi.org/10.1161/circresaha.120.318182>

Lo Sasso, G., Schlage, W. K., Boué, S., Veljkovic, E., Peitsch, M. C., & Hoeng, J. (2016). The Apoe^{-/-} mouse model: A suitable model to study cardiovascular and respiratory diseases in the context of cigarette smoke exposure and harm reduction. *Journal of Translational Medicine*, 14(1), 146. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0901-1>

Lv, J., Xiong, Y., Li, W., Cui, X., Cheng, X., Leng, Q., & He, R. (2018). IL-37 inhibits IL-4/IL-13-induced CCL11 production and lung eosinophilia in murine allergic asthma. *Allergy*, 73(8), 1642-1652. <https://doi.org/10.1111/all.13395>

Marques, P., Collado, A., Martínez-Hervás, S., Domingo, E., Benito, E., Piqueras, L., Real, J. T., Ascaso, J. F., & Sanz, M.-J. (2019). Systemic Inflammation in Metabolic Syndrome: Increased Platelet and Leukocyte Activation, and Key Role of CX3CL1/CX3CR1 and CCL2/CCR2 Axes in Arterial Platelet-Proinflammatory Monocyte Adhesion. *Journal of Clinical Medicine*, 8(5), 708. <https://doi.org/10.3390/jcm8050708>

Marx, C., Novotny, J., Salbeck, D., Zellner, K. R., Nicolai, L., Pekayvaz, K., Kilani, B., Stockhausen, S., Bürgener, N., Kupka, D., Stocker, T. J., Weckbach, L. T., Pircher, J., Moser, M., Joner, M., Desmet, W., Adriaenssens, T., Neumann, F.-J., Gerschlick, A. H., ... Stark, K. (2019). Eosinophil-platelet interactions promote atherosclerosis and stabilize thrombosis with eosinophil extracellular traps. *Blood*, 134(21), 1859—1872. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000518>

McBrien, C. N., & Menzies-Gow, A. (2017). The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. *Frontiers in Medicine*, 4, 93. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00093>

Kahn Center for Cardiac Longevity, (s.f.). *Measuring Artery Age to Reverse Atherosclerosis: Joel Kahn, MD: Integrative Cardiologist*. Recuperado 11 de julio de

2021, de <https://www.kahnlifetimecenter.com/blog/measuring-artery-age-to-reverse-atherosclerosis>.

Moro-García, M. A., Mayo, J. C., Sainz, R. M., & Alonso-Arias, R. (2018). Influence of Inflammation in the Process of T Lymphocyte Differentiation: Proliferative, Metabolic, and Oxidative Changes. *Frontiers in Immunology*, 9, 339. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00339>

Mosedale, D. E., Smith, D. J., Aitken, S., Schofield, P. M., Clarke, S. C., McNab, D., Goddard, H., Gale, C. R., Martyn, C. N., Bethell, H. W. L., Barnard, C., Hayns, S., Nugent, C., Panicker, A., & Grainger, D. J. (2005). Circulating levels of MCP-1 and eotaxin are not associated with presence of atherosclerosis or previous myocardial infarction. *Atherosclerosis*, 183(2), 268—274. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.11.028>

Nahrendorf, M., & Swirski, F. K. (2015). Lifestyle Effects on Hematopoiesis and Atherosclerosis. *Circulation Research*, 116(5), 884-894. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303550>

Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J., Ryan, J. J., & Paul, W. E. (1999). THE IL-4 RECEPTOR: Signaling Mechanisms and Biologic Functions. *Annual Review of Immunology*, 17(1), 701-738. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.701>

Olivieri, B., Tinazzi, E., Caminati, M., & Lunardi, C. (2020). Biologics for the Treatment of Allergic Conditions: Eosinophil Disorders. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 40(4), 649-665. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2020.07.001>

Price, K. S., Friend, D. S., Mellor, E. A., De Jesus, N., Watts, G. F. M., & Boyce, J. A. (2003). CC chemokine receptor 3 mobilizes to the surface of human mast cells and potentiates immunoglobulin E-dependent generation of interleukin 13. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 28(4), 420—427. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2002-0155oc>

Rafieian-Kopaei, M., Setorki, M., Doudi, M., Baradaran, A., & Nasri, H. (2014). Atherosclerosis: Process, indicators, risk factors and new hopes. *International Journal of Preventive Medicine*, 5(8), 927-946.

Ross, A. C. (2017). Impact of chronic and acute inflammation on extra- and intracellular iron homeostasis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 106(Suppl 6), 1581S-1587S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.155838>

Ross, R. (1999). Atherosclerosis—An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine*, 340(2), 115-126. <https://doi.org/10.1056/NEJM199901143400207>

Ruddy, J. M., Ikonomidis, J. S., & Jones, J. A. (2016). Multidimensional Contribution of Matrix Metalloproteinases to Atherosclerotic Plaque Vulnerability: Multiple Mechanisms of Inhibition to Promote Stability. *Journal of Vascular Research*, 53(1-2), 1-16. <https://doi.org/10.1159/000446703>

Seimon, T., & Tabas, I. (2009). Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*, 50(Suppl), S382-S387. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800032-JLR200>

Sen, Y., Chunsong, H., Baojun, H., Linjie, Z., Qun, L., San, J., Qiuping, Z., Junyan, L., Zhang, X., & Jinquan, T. (2004). Aberration of CCR7+ CD8+ memory T cells from

patients with systemic lupus erythematosus: An inducer of T helper type 2 bias of CD4+ T cells. *Immunology*, 112(2), 274-289. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01862.x>

Tabas, I., García-Cardena, G., & Owens, G. K. (2015). Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *Journal of Cell Biology*, 209(1), 13-22. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412052>

Turner, J. D., Pionnier, N., Furlong-Silva, J., Sjoberg, H., Cross, S., Halliday, A., Guimaraes, A. F., Cook, D. A. N., Steven, A., Van Rooijen, N., Allen, J. E., Jenkins, S. J., & Taylor, M. J. (2018). Interleukin-4 activated macrophages mediate immunity to filarial helminth infection by sustaining CCR3-dependent eosinophilia. *PLOS Pathogens*, 14(3), e1006949. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006949>

Vanhoutte, P. M., Shimokawa, H., Feletou, M., & Tang, E. H. C. (2017). Endothelial dysfunction and vascular disease—A 30th anniversary update. *Acta Physiologica*, 219(1), 22-96. <https://doi.org/10.1111/apha.12646>

Weber, C., & Noels, H. (2011). Atherosclerosis: Current pathogenesis and therapeutic options. *Nature Medicine*, 17(11), 1410-1422. <https://doi.org/10.1038/nm.2538>

Weller, P. F., & Spencer, L. A. (2017). Functions of tissue-resident eosinophils. *Nature Reviews Immunology*, 17(12), 746-760. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.95>

Willems, L. I., & IJzerman, A. P. (2010). Small molecule antagonists for chemokine CCR3 receptors: SMALL ANTAGONISTS FOR CHEMOKINE CCR3 RECEPTORS. *Medicinal Research Reviews*, 30(5), 778-817. <https://doi.org/10.1002/med.20181>

Willetts, L., Ochkur, S. I., Jacobsen, E. A., Lee, J. J., & Lacy, P. (2014). Eosinophil Shape Change and Secretion. En G. M. Walsh (Ed.), *Eosinophils: Methods and Protocols* (pp. 111-128). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1016-8_11

Williams, T. J. (2015). Eotaxin-1 (CCL11). *Frontiers in Immunology*, 6, 84. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00084>

World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs) 2021 (actualizado el 17 de mayo de 2017). Recuperado 02 de junio de 2021, de [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).

Zernecke, A., & Weber, C. (2010). Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, 86(2), 192-201. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp391>

Zhang, J. Q., Biedermann, B., Nitschke, L., & Crocker, P. R. (2004). The murine inhibitory receptor mSiglec-E is expressed broadly on cells of the innate immune system whereas mSiglec-F is restricted to eosinophils. *European Journal of Immunology*, 34(4), 1175-1184. <https://doi.org/10.1002/eji.200324723>