

Artículo original

Los niveles de interleucina-5 disminuyen en plasma de pacientes con enfermedad coronaria e inhiben la diferenciación *in vitro* de Th1 y Th17Di Ye^{a,b,c,◇}, Zhen Wang^{a,b,c,◇}, Jing Ye^{a,b,c,◇}, Menglong Wang^{a,b,c,◇}, Jianfang Liu^{a,b,c}, Yao Xu^{a,b,c}, Huimin Jiang^{a,b,c}, Jiangbin Chen^{a,b,c} y Jun Wan^{a,b,c,*}^a Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, China^b Cardiovascular Research Institute, Wuhan University, Wuhan, China^c Hubei Key Laboratory of Cardiology, Wuhan, China

Historia del artículo:

Recibido el 5 de enero de 2019

Aceptado el 12 de julio de 2019

On-line el 25 de noviembre de 2019

Palabras clave:

Enfermedad coronaria

Inflamación

Interleucina 5

Diferenciación de Th1

Diferenciación de Th17

Célula T reguladora

RESUMEN

Introducción y objetivos: La interleucina 5 (IL-5) es una citocina antiinflamatoria que se ha involucrado en las enfermedades cardiovasculares, incluidos los aneurismas aórticos y la insuficiencia cardíaca. El objetivo de este estudio es investigar el papel de la IL-5 en la enfermedad coronaria (EC) y sus posibles mecanismos.**Métodos:** Se analizó la expresión de la IL-5 en muestras de arterias coronarias humanas de 17 pacientes con EC y donantes fallecidos. Además, se determinaron las concentraciones plasmáticas de IL-5, IL-17 e interferón gamma en pacientes con EC usando kits ELISA con muestras de pacientes con dolor torácico (sin EC) como controles. Se separaron las células murinas CD4⁺T helper (Th), y el efecto de la IL-5 en la diferenciación de Th1, célula T reguladora y Th17 y la cantidad de ARNm de sus citocinas características se determinaron mediante citometría de flujo y reacción en cadena de la polimerasa tras transcripción inversa respectivamente.**Resultados:** La IL-5 disminuyó significativamente en las placas coronarias de los pacientes con EC comparados con el grupo de donantes fallecidos, y la IL-5 derivó fundamentalmente de los macrófagos de las placas de las arterias coronarias. Además, comparados con el grupo sin EC, las concentraciones plasmáticas de IL-5 en el grupo de EC fueron significativamente menores, y la secuencia de mayor a menor fue angina estable, angina inestable e infarto de miocardio. El análisis de regresión lineal binaria mostró que la IL-5 se correlacionó independientemente con la aparición de la EC. Además, el tratamiento con IL-5 recombinante de ratón disminuyó los valores de Th1 y Th17 y la expresión del ARNm de sus citocinas características en lipoproteínas oxidadas de baja densidad tratadas con CD4⁺Th.**Conclusiones:** Los valores de IL-5 disminuyeron en los pacientes con EC e inhiben la diferenciación *in vitro* de Th1 y Th17 inducida por lipoproteínas oxidadas de baja densidad.

© 2019 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Interleukin-5 levels are decreased in the plasma of coronary artery disease patients and inhibit Th1 and Th17 differentiation *in vitro*

ABSTRACT

Introduction and objectives: Interleukin (IL)-5 is an anti-inflammatory cytokine that has been demonstrated to be involved in cardiovascular diseases, including aortic aneurysm and heart failure. This study aimed to investigate the involvement of IL-5 in coronary artery disease (CAD) and the possible mechanisms.**Methods:** We analyzed IL-5 expression in human coronary artery specimens collected from CAD patients and deceased donors. Plasma IL-5, IL-17, and interferon- γ levels in CAD patients were detected using ELISA kits, with samples from chest pain patients (non-CAD) as controls. Mouse CD4⁺T helper (Th) cells were separated, and the effect of IL-5 on Th1, regulatory T cell and Th17 differentiation and mRNA levels of their characteristic cytokines were detected using flow cytometry and reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction, respectively.**Results:** IL-5 was significantly decreased in the coronary plaque of CAD patients compared with the deceased donors group, and IL-5 was mainly derived from macrophages in the coronary artery plaque. Compared with the non-CAD group, plasma IL-5 levels in the CAD groups were significantly lower, and the sequence from high to low was stable angina pectoris, unstable angina pectoris, and acute

Keywords:

Coronary artery disease

Inflammation

Interleukin-5

Th1 differentiation

Th17 differentiation

Regulatory T cell

* Autor para correspondencia: Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Cardiovascular Research Institute, 238 Jiefang Road, Wuhan 430060, China.

Correo electrónico: wanjun@whu.edu.cn (J. Wan).

◇ Estos autores han contribuido por igual en la redacción de este artículo.

myocardial infarction. Binary linear regression analysis showed that IL-5 was independently correlated with the occurrence of CAD. Recombinant mouse IL-5 treatment decreased Th1 and Th17 levels and mRNA expression of their characteristic cytokines in oxidized low-density lipoprotein-treated CD4⁺Th cells.

Conclusion: IL-5 levels were decreased in CAD patients and inhibited oxidized low-density lipoprotein Th1 and Th17 differentiation in vitro.

© 2019 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Abreviaturas

EC: enfermedad coronaria
IAM: infarto agudo de miocardio
IL-5: interleucina 5

INTRODUCCIÓN

La enfermedad coronaria (EC) es una enfermedad cardiovascular frecuente, aunque grave, y la primera causa de morbilidad y mortalidad en el mundo. La EC sucede después de la aterosclerosis, y su principal proceso patológico es la activación de reacciones inflamatorias y del sistema de coagulación¹. Varias células inflamatorias y citocinas contribuyen al adelgazamiento de la capa fibrosa y al agrandamiento del núcleo lipídico, lo que favorece la formación y la rotura de placas vulnerables².

Las interleucinas (IL) están relacionadas con la inflamación y hacen un papel crucial en la formación de aterosclerosis/EC. La IL-1 tiene efectos inflamatorios en los macrófagos, las células endoteliales y las células vasculares del músculo liso, mientras que la delección genética de IL-1 β o IL-1R disminuye el desarrollo de la lesión aterosclerótica³. Por otra parte, la IL-6 se relaciona de manera independiente con la prevalencia y la gravedad de la aterosclerosis coronaria⁴. Además, la IL-18 puede aumentar el desarrollo de lesión al incrementar una respuesta inflamatoria en la que interviene el mecanismo dependiente del interferón (IFN) gamma⁵, mientras que la IL-10 se define como un factor protector tanto de la formación de lesión aterosclerótica como de su estabilización⁶.

La IL-5 es una citocina antiinflamatoria secretada principalmente por células inflamatorias: linfocitos T, mastocitos, macrófagos y eosinófilos^{7,8}. La IL-5 es muy conocida como uno de los principales factores de crecimiento de eosinófilos, así como de su maduración y liberación desde la médula ósea. Se ha observado que el número de eosinófilos era significativamente mayor en pacientes con angina de pecho vasoespástica o con EC y que el número absoluto volvía a la normalidad tras el tratamiento^{9,10}. La IL-5 podría prolongar la supervivencia de los eosinófilos y es crucial en la organización e intensificación de la respuesta alérgica en el asma y el síndrome hipereosinofílico¹¹. Por otra parte, Zhang et al.¹² observaron que la producción excesiva de IL-5 puede aumentar el riesgo de sufrir infecciones respiratorias graves en niños con antecedentes familiares de atopia. Frente a los ratones inmunocompetentes, los ratones deficientes en IL-5 mostraban una menor activación de los eosinófilos en los pulmones tras infección por parásitos¹³. Los estudios han demostrado que la concentración de IL-5 está elevada en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico¹⁴ y la IL-5 también está involucrada en el tratamiento antirretroviral del sida¹⁵.

También se demostró la participación de la IL-5 en las enfermedades cardiovasculares. Liu et al.¹⁶ observaron que, en la inflamación pulmonar alérgica, las concentraciones plasmáticas de IL-5, IL-13 y factor de crecimiento transformador beta disminuían, mientras que aumentaba la acumulación de eosinó-

filos y de células inflamatorias; estos autores también vieron que la concentración de IL-5 y de factor de crecimiento transformador beta era inferior en ratones con aneurisma aórtico abdominal preestablecido. La IL-5 también había disminuido en los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica¹⁷. Curiosamente, se ha informado que los pacientes asmáticos corren menor riesgo de aterosclerosis, mientras que la IL-5 plasmática está aumentada en pacientes con asma¹⁸.

Se carece de datos sobre la expresión de IL-5 en pacientes con EC. En consecuencia, el objetivo de este estudio es evaluar prospectivamente la expresión de IL-5 en pacientes con EC y explorar los posibles mecanismos.

MÉTODOS

Recogida de muestras coronarias humanas

El tejido arterial coronario (n = 10) se obtuvo de las arterias coronarias de pacientes con EC que se sometieron a cirugía de trasplante cardíaco. Las muestras de control (n = 7) se obtuvieron de donantes fallecidos que habían sufrido un accidente de tráfico o un ictus y muerte cerebral certificada. Los donantes carecían de antecedentes de enfermedad cardiovascular, y las muestras no mostraban signos de patología. Los cirujanos obtuvieron todo el tejido coronario durante intervenciones de trasplante cardíaco realizadas en el Hospital Popular de la Región Autónoma Zhuang de Guangxi (China). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de las familias y el Comité Ético del Hospital Popular de la Región Autónoma Zhuang de Guangxi aprobó el protocolo del estudio.

Inmunotransferencia

Se lisaron las muestras coronarias y se obtuvo la proteína total. Tras cuantificar con el kit de análisis de proteínas con ácido bicinconínico (BCA), se añadieron 20 μ g de proteína a la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico al 12% (SDS-PAGE). Se separaron las proteínas por medio de electroforesis y a continuación se transfirieron a las membranas de transferencia PVDF FL Immobilon. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% y se incubaron con anticuerpo anti-IL-5 (Santa Cruz Biotechnology) y con anticuerpo contra la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, tecnología para señalización celular) a 4 °C durante toda la noche antes de la incubación con anticuerpo secundario a temperatura ambiente durante 1 h. Las proteínas se visualizaron y cuantificaron utilizando un sistema de imagen infrarroja en 2 colores (Odyssey; LI-COR Biosciences). Los niveles de expresión de proteínas se normalizaron al control de GAPDH.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

Tras el lisado de las células y el tejido coronario con el reactivo TRIzol, se obtuvo el ARN mensajero (ARNm) total. Después, se sintetizó el ADN complementario (ADNc) a partir de 2 μ g del ARNm

Tabla 1

Cebadores utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa tras transcriptasa inversa

Gen	Cebador directo (5'-3')	Cebador inverso (5'-3')
IL-5 (humana)	CCCACAAGTGCATTGGTGAA	CCTCAGAGTCTCATTGGCTATCAG
IL-17 (humana)	CTCTGTGATCTGGGAGGCAAA	CTCTGTGGATGGGGACA
IFN γ (humano)	GCAGGTCAITTCAGATGTAGCGG	TGTCTTCTTGATGGTCTCCACAC
GAPDH (humana)	TTGTCAAAGCTCATTTCCTGGT	TTACTCCTGGAGGCCATGTA
IL-17 (murina)	TCCAGAAGGCCCTCAGACTA	AGCATCTTCTCGACCCCTGAA
IFN γ (murino)	ACTGGCAAAAAGGATGGTGAC	TGAGCTCATTGAATGCTTGG
TBX21 (murino)	ATTGGTGGAGAGGAAGCGG	TGTGCACCCTTCAAACCTT
IL-18 (murina)	ATGCTTTCTGGACTCTCGCC	GTCTGGTCTGGGGTTCCTG
ROR γ T (murino)	CTGTCTGGGCTACCTACT	CCACTTGTCTGTTGCTGC
IL-23 (murina)	AATAATGTGCCCGTATCCA	CATGGGGTATCAGGGAGTA
GAPDH (murina)	AACITTTGGCATTGTGGAAGG	CACATTGGGGGTAGGAACAC

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; IFN γ : interferón gamma; IL: interleucina; ROR γ : receptor huérfano gamma relacionado con el receptor de ácido retinoico; TBX21: factor de transcripción caja T.

total con cebadores oligo (dT) y con un kit de transcriptasa inversa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las amplificaciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron utilizando una mezcla maestra LightCycler 480 SYBR Green (todo de Roche). Las secuencias del cebador aparecen en la [tabla 1](#). Se determinaron los niveles de expresión relativa del ARNm y se normalizaron a la GAPDH en la muestra correspondiente.

Análisis histológico

Todas las muestras coronarias se fijaron con paraformaldehído neutro al 4%; a continuación se incluyeron en parafina, se cortaron en secciones de 5 μ m y se montaron en portaobjetos. Se recurrió a la tinción por inmunofluorescencia para detectar la expresión de IL-5 en cada muestra. Para determinar la fuente de IL-5, se realizó una tinción doble por inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-CD4, anti-CD68 y anti-IL-5.

Obtención de muestras de sangre humana

Entre junio de 2016 y diciembre de 2017, se llevó a cabo en el mismo hospital una nueva selección de pacientes consecutivos con dolor torácico en quienes se sospechaba EC. Todos los pacientes se sometieron a angiografía coronaria. En función de los síntomas clínicos y los resultados del angiograma coronario y el electrocardiograma, se dividió a los pacientes en 4 grupos: *a*) grupo sin EC ($n = 36$; criterios de inclusión: el dolor torácico no se acompañaba de cambios en el electrocardiograma ni de estenosis coronaria o espasmo coronario tras la inyección intracoronaria de acetilcolina administrada en la angiografía coronaria); *b*) grupo con angina estable ($n = 51$; criterios de inclusión: malestar torácico característico inducido por esfuerzo asociado con desviación descendente o depresión horizontal del segmento ST > 1 mm en una prueba de esfuerzo); *c*) grupo con angina inestable ($n = 44$; criterios de inclusión: dolor torácico en reposo con cambios electrocardiográficos de isquemia confirmados —cambios en el segmento ST o inversiones de la onda T—), y *d*) grupo con infarto agudo de miocardio (IAM) ($n = 29$; criterios de inclusión: infarto de miocardio confirmado por un aumento significativo de la concentración sanguínea de troponina I y creatinina).

El criterio de agrupación se basó en un estudio previo de Lin et al.¹⁹. Se excluyó a los pacientes que habían sufrido IAM en los 3 meses previos o angina inestable durante el mes anterior²⁰. También se excluyó a los pacientes con indicios de enfermedad concomitante significativa, en particular cardiopatía valvular hemodinámica,

miocardiopatía, enfermedades malignas conocidas y fiebre²¹. Médicos con una amplia experiencia clínica establecieron el diagnóstico. Se utilizó la puntuación de Gensini para evaluar la estenosis en las arterias coronarias. El algoritmo detallado de las puntuaciones de Gensini ya fue explicado con anterioridad por Ye et al.²².

Los propios pacientes proporcionaron el consentimiento informado por escrito y el Comité Ético del Hospital Popular de la Región Autónoma Zhuang de Guangxi aprobó el protocolo del estudio.

Determinación plasmática de IL-5, IL-17 e IFN γ

Las muestras de sangre se obtuvieron a la llegada del paciente a urgencias. Estas se recogieron antes de realizar la angiografía coronaria y de proporcionar cualquier tipo de tratamiento. El tiempo de inicio fue < 6 h en todos los pacientes. Las muestras se centrifugaron a 4.000 g durante 20 min y a continuación se recogió el sobrenadante y se conservó a -80°C hasta el comienzo de los experimentos. Se retiraron las muestras del medio a -80°C y a continuación se descongelaron a temperatura ambiente. Las concentraciones plasmáticas de IL-5 (R&D Systems), IL-17 e IFN γ (ambos de eBioscience) se determinaron con un kit de análisis de inmunoadsorción enzimática (ELISA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cultivo celular

Se anestesió a machos adultos de ratón C57BL/6 con isoflurano al 2% y se les separó el bazo. La suspensión esplénica de una sola célula se preparó y cultivó en medio de cultivo completo RPMI 1640 (Gibco). El grupo de diferenciación de células Th4 (CD4⁺) se obtuvo mediante selección positiva utilizando perlas magnéticas CD4 (Miltenyi Biotech) y un separador de células activadas por magnetismo²³. Tras la activación por medio de anti-CD3 y anti-CD28 (ambos de eBioscience), las células CD4⁺Th se trataron con lipoproteína oxidada de baja densidad (50 μ g/ml, Servicebio) o con IL-5 recombinante de ratón (rIL-5, Genetex). A continuación se cultivaron las células en una incubadora humidificada de CO₂ con CO₂ al 5%, a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 h^{24,25}.

Determinación de Th1 y Th17

Se obtuvieron las células CD4⁺Th cultivadas previamente y se tiñeron con isotiocianato de fluoresceína (FITC) anti-CD4 (FITC-CD4). Tras tratamiento con concentrado de fijación/permeabilización, se

tiñeron las células con ficoeritrina (PE) marcada con anti-IFN γ (PE-IFN γ) y PE marcada con anti-IL-17 (PE-IL-17). Se incluyeron los controles de isotipo para compensar y confirmar la especificidad de los anticuerpos. Las células Th1 se definieron como CD4⁺/IFN γ ⁺ y las Th17, como CD4⁺/IL-17⁺. Las mezclas de estimulación celular y todos los anticuerpos de citometría de flujo se adquirieron en eBioscience y se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico

Las concentraciones plasmáticas de citocinas y las características clínicas se expresan en mediana [intervalo intercuartílico] y se compararon con la prueba de la U de Mann-Whitney. Las correlaciones entre la IL-17, el IFN γ , las características clínicas y la IL-5 se analizaron utilizando el coeficiente de correlación de Spearman. El análisis de regresión lineal simple y el posterior análisis de regresión lineal binario se utilizaron para determinar si la IL-5 es un biomarcador independiente de la EC. Los valores del cultivo celular expresan media \pm desviación estándar y se compararon con las pruebas de la t de Student. Todos los datos se analizaron con el *software* SPSS 23.0, y se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Características clínicas de los pacientes que proporcionaron las muestras de tejido coronario

Entre los pacientes que proporcionaron tejido coronario, los valores de troponina cardiaca I (Tncl) y proteína C reactiva eran considerablemente más altos en los grupos con EC que en el grupo de donantes fallecidos. No se observaron diferencias entre los grupos en lo que respecta a otras características clínicas, tales como edad, sexo, fumar, beber, presión arterial sistólica (PAS), glucosa (Glu) en ayunas, colesterol total (CT), triglicéridos (TG), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL) y presión arterial diastólica (PAD). Los datos clínicos se enumeran en la [tabla 2](#).

Tabla 2

Características clínicas de los donantes de muestras de tejido coronario

Características	Donantes fallecidos	EC	p
Sexo (V/M)	4/3	7/3	0,585
Edad (años)	57 [50-62]	57 [50-69]	0,732
Fumar ^a	1/6	4/6	0,252
Beber ^b	2/5	4/6	0,628
Glu (mmol/l)	5,3 [4,74-5,41]	5,60 [5,03-7,65]	0,475
TG (mmol/l)	1,38 [0,88-1,54]	2,29 [1,10-3,08]	0,157
CT (mmol/l)	4,18 [3,16-4,48]	4,03 [3,55-5,75]	0,669
HDL (mmol/l)	1,28 [0,91-1,59]	1,02 [0,77-1,21]	0,161
LDL (mmol/l)	1,89 [1,17-2,01]	2,33 [1,34-3,92]	0,417
PAS (mmHg)	111 [103-125]	121 [109-131]	0,435
PAD (mmHg)	85 [74-86]	84 [79-94]	0,378
PCR (mg/l)	0,41 [0,07-1,08]	7,18 [2,40-36,91]	0,002
Tncl (ng/ml)	0,024 [0,006-0,053]	0,55 [0,16-0,79]	0,002

CT: colesterol total; EC: enfermedad coronaria; Glu: glucosa en ayunas; HD: lipoproteínas de alta densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad; M: mujeres; PAD: presión arterial diastólica; PAS: presión arterial sistólica; PCR: proteína C reactiva; TG: triglicéridos totales; Tncl: troponina cardiaca I; V: varones. Los valores expresan proporciones o mediana [intervalo intercuartílico].

^a Por lo menos 1 cigarrillo diario durante más de 6 meses.

^b Cualquier tipo de bebida alcohólica, por lo menos 1 vez a la semana durante más de 6 meses.

Expresión y fuente de IL-5 en tejido coronario humano

Había significativamente menos IL-5 en la placa coronaria de los pacientes con EC que en la de los donantes fallecidos ([figura 1A y B](#)). La IL-5 procedía tanto de las células CD4⁺Th como de los macrófagos, si bien estos constituían la fuente principal ([figura 1C y D](#)).

Características clínicas de los pacientes que proporcionaron las muestras de sangre

Los valores de Glu, CT, PAS, LDL, PCR y Tncl eran considerablemente inferiores en el grupo sin EC que en los otros 3 grupos. Otras características clínicas, tales como la edad, el sexo, fumar y beber, los TG, las HDL y la PAD, no mostraban diferencias evidentes. Ninguna de las características clínicas era claramente distinta entre los grupos con angina estable, con angina inestable y con IAM, excepto la PAS y la Tncl. La PAS y los valores de Tncl más altos eran los del grupo con IAM, más altos que en el grupo con angina inestable, y los más bajos eran los del grupo con angina estable. Los datos clínicos se enumeran en la [tabla 3](#).

Asociación entre las concentraciones plasmáticas de citocinas y las puntuaciones de Gensini

Los resultados del ensayo ELISA mostraban que las concentraciones de IL-5 disminuían de manera gradual en los grupos sin EC, con angina estable y con angina inestable, mientras que no se observaban diferencias entre los grupos de angina inestable y de IAM ([figura 2A](#)). Las concentraciones de IL-17 y de IFN γ aumentaron gradualmente en los grupos sin EC, con angina estable, con angina inestable y con IAM ([figura 2B y C](#)). El coeficiente de correlación de Spearman mostró que las concentraciones de IL-5 se correlacionaban negativamente con las de IL-17 e IFN γ en los pacientes con EC ([figura 2D y E](#)). Además, las concentraciones de IL-17 se correlacionaban de forma positiva con las de IFN γ ([figura 2F](#)).

Se detectó que la correlación entre las concentraciones de IL-5, IL-17 e IFN γ y las puntuaciones de Gensini también determinaba si las 3 citocinas se relacionaban con la gravedad de la EC. Los resultados mostraron que la puntuación de Gensini tenía una correlación positiva con las concentraciones de IL-17 e IFN γ , pero negativa con las de IL-5 ([figura 2G-I](#)).

Análisis de regresión lineal simple y binario

Los resultados del análisis de regresión lineal simple mostraban que la IL-5, la IL-17, el IFN γ , la Tncl, el CT, las LDL y la Glu tendían a establecer correlación con la prevalencia de EC ($p < 0,05$). Luego se analizaron las 3 citocinas y las 4 características clínicas mediante análisis de regresión lineal binario, y los resultados mostraron que la IL-5 ($\beta = -0,273$; intervalo de confianza del 95% [IC95%], $-0,455$ a $-0,091$; $p = 0,003$), la IL-17 ($\beta = 0,228$; IC95%, $0,068-0,388$; $p = 0,006$) y el IFN γ ($\beta = 0,232$; IC95%, $0,081-0,382$; $p = 0,003$) se asociaban con la presencia de EC (tal como se muestra en la [tabla 4](#)).

Efecto de la IL-5 en la diferenciación de las células CD4⁺Th

Los resultados del análisis de citometría de flujo mostraron que el tratamiento con lipoproteínas de baja densidad oxidadas aumentaba considerablemente los porcentajes de Th1 y Th17, mientras disminuía el número de células T reguladoras (Treg) ([figura 3A-D](#)). Estos efectos podrían invertirse con rIL-5. El ARNm de las citocinas Th1 y Th17 características, como el IFN γ , el TBX21,

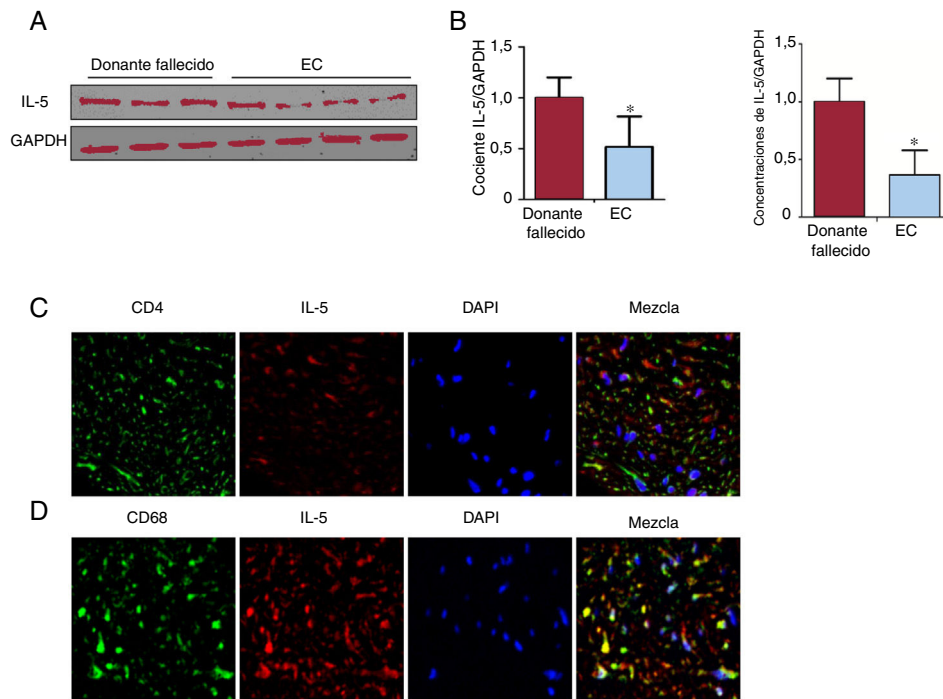


Figura 1. Expresión y fuente de IL-5 en tejido coronario humano. A: la concentración de IL-5 en la placa coronaria de los pacientes con EC y en los donantes fallecidos se determinó mediante inmunotransferencia. B: la concentración de ARNm de la IL-5 en estos 2 grupos se determinó mediante RT-qPCR. C y D: la fuente de IL-5 se analizó mediante tinción doble por inmunofluorescencia en tejido coronario ($\times 400$). CD: antígeno CD o de diferenciación; EC: enfermedad coronaria; GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; IL: interleucina; RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa tras transcriptasa inversa. * $p < 0,05$.

la IL-18, el ROR γ T, la IL-17 y la IL-23, mostraba tendencias similares a las de las células Th1 y Th17 respectivamente (figura 3E).

DISCUSIÓN

En el presente estudio, se observó por primera vez que la IL-5 había disminuido en la placa coronaria de los pacientes con EC y que los macrófagos eran la fuente principal de IL-5. Además, las concentraciones plasmáticas de IL-5 tenían correlación negativa con la presencia y la gravedad de la EC, y el tratamiento con rIL-5 inhibía considerablemente la diferenciación *in vitro* de Th1 y Th17.

Estudios previos hallaron una correlación negativa entre la IL-5 y la presencia de enfermedades cardiovasculares. Ishigami et al.⁷ informaron de que los anticuerpos anti-IL-5 se relacionaban de manera positiva con la aparición de aterosclerosis. La IL-5 también había disminuido en los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, y las concentraciones reducidas de IL-5 se relacionaban con el avance de la enfermedad¹⁷. En la enfermedad de Kawasaki, las concentraciones de IL-5 se relacionaban negativamente con la aparición de lesiones en las arterias coronarias²⁶. No obstante, la expresión de IL-5 en la EC sigue siendo una incógnita; así que se determinó la expresión de IL-5 en plasma y en las placas coronarias de pacientes con EC y los resultados mostraron que la concentración de IL-5 se había reducido considerablemente. Por otra parte, los resultados de la puntuación de Gensini mostraban que la concentración de IL-5 se relacionaba de forma negativa con el grado de estenosis coronaria.

Los macrófagos desempeñan un papel crucial en el inicio y la propagación de varias enfermedades cardiovasculares, como la aterosclerosis²⁷, la cardiopatía hipertensiva²⁸ y la insuficiencia cardíaca^{29,30}. Los macrófagos se hallan estrechamente relacionados con la EC; las pruebas objetivas son que se observaron abundantes macrófagos de la rotura de placa³¹. También se ha

observado que las células espumosas derivadas de monocitos/macrófagos adoptan formas modificadas de LDL, y así contribuyen a la aterogénesis³². Las células Th se asociaron con aterosclerosis, y también se ha informado de que la IL-5 procede de células Th2^{7,33}. Así pues, también se investigó la fuente de IL-5 en tejido de lesión coronaria humana mediante tinción doble por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-CD68, anti-CD4 y anti-IL-5. Los resultados mostraron que tanto los macrófagos como las células Th eran la fuente de IL-5 en las placas coronarias humanas y que la IL-5 se expresaba principalmente en macrófagos.

La IL-17 y el IFN γ , las citocinas funcionales de Th1 y Th17 respectivamente, son los factores clave de la inflamación vascular crónica característica de la aterosclerosis^{5,34,35}. La sobreexpresión determinada por macrófagos de IL-5 también puede atenuar la aterosclerosis inducida por la comida rica en grasas en los ratones deficientes en el receptor de las LDL^{36,37}, y se ha observado una asociación inversa entre la concentración plasmática de IL-5 y el grosor intímomedial carotídeo³⁸. Teniendo en cuenta la función antiinflamatoria de la IL-5 y el papel crucial de Th1/IFN γ y Th17/IL-17 en la progresión de la aterosclerosis/EC, también se determinaron las concentraciones plasmáticas de IL-17 e IFN γ , y los resultados mostraron que ambos habían aumentado en los pacientes con EC y se correlacionaban positivamente con la puntuación de Gensini. No obstante, el coeficiente de correlación de Spearman mostró que la concentración de IL-5 se relacionaba de forma negativa con la IL-17 y el IFN γ . Por otro lado, la regresión lineal binaria mostró que la IL-5 establecía una correlación negativa con la EC. Estos datos indican que la IL-5 puede participar en la EC regulando la secreción de citocinas inflamatorias como IFN γ e IL-17.

La rotura de la placa aterosclerótica constituye la base patológica de la mayor parte de las complicaciones vasculares como infarto cerebral e infarto de miocardio. La estabilización de la placa está determinada principalmente por su composición³⁹. Las placas estables están mayormente calcificadas y son más

Tabla 3

Características clínicas de los pacientes que proporcionaron las muestras de sangre

Características	Grupo sin EC	Grupo con angina estable	Grupo con angina inestable	Grupo con IAM
Sexo (V/M)	20/16	29/22	31/13	20/9
Edad (años)	63 [53-71,25]	62 [53,5-70,5]	64 [58-73]	68 [57-74]
Fumar ^a	6 (16,7)	16 (31,4)	15 (34,1)	8 (27,6)
Beber ^b	2 (5,6)	9 (17,6)	10 (22,7)	3 (10,3)
Clase de Killip I/II/III/IV	—	—	—	22/5/2/0
Diabetes	4 (11,1)	17 (33,3)	11 (25,0)	12 (41,4)
Hiperlipemia	14 (38,9)	20 (39,2)	18 (40,9)	13 (44,8)
Hipertensión	15 (41,7)	35 (68,6)	33 (75,0)	23 (79,3)
Glu (mmol/l)	5,06 [4,52-5,40]	5,29 [4,91-6,36] ^c	5,54 [4,95-6,86] ^c	6,16 [5,03-7,87] ^{c,d}
TG (mmol/l)	1,38 [1,18-1,82]	1,64 [1,01-2,42]	1,28 [0,93-2,01]	1,44 [1,04-2,47]
CT (mmol/l)	3,59 (3,18-4,34)	3,50 [4,17-5,14] ^c	4,40 [3,76-5,13] ^c	4,78 [3,83-5,44] ^c
HDL (mmol/l)	1,06 [0,87-1,28]	1,01 [0,88-1,26]	1,00 [0,90-1,23]	0,90 [0,75-1,15]
LDL (mmol/l)	1,85 [1,36-2,19]	2,13 [1,72-2,90] ^c	2,21 [1,52-2,59] ^c	2,48 [1,81-3,21] ^c
PAS (mmHg)	136 [113-154]	135 [120-149] ^c	144 [125,75-158,50] ^{c,d}	151 [138-162,5] ^{c,d,e}
PAD (mmHg)	80 [71-87,5]	82 [74-90]	81 [73,25-89,75]	90 [84-95] ^c
PCR (mg/l)	0,83 [0,28-1,89]	1,95 [0,32-9,14] ^c	2,57 [0,55-11,32] ^c	3,66 [0,51-16,98] ^c
Tncl (ng/ml)	0,038 [0,006-0,087]	0,426 [0,009-3,320] ^c	2,32 [0,055-13,150] ^{c,d}	20,75 [13,277-26,905] ^{c,d,e}
Medicación				
Hipoglucemiantes orales	3 (8,3)	8 (15,7)	10 (22,7)	9 (32,1)
Insulina	2 (5,6)	5 (9,8)	4 (9,1)	4 (14,3)
Ácido acetilsalicílico	10 (27,8)	18 (35,3)	16 (36,4)	12 (41,4)
Clopidogrel	0 (0)	10 (19,6)	9 (20,5)	7 (24,1)
Ticagrelor	0 (0)	0 (0)	7 (15,9)	8 (27,6)
Nitratos	13 (36,1)	32 (62,7)	29 (65,9)	10 (34,5)
Estatinas	11 (30,6)	16 (31,4)	13 (29,5)	11 (37,9)
IECA/ARA-II	12 (33,3)	20 (39,2)	14 (31,8)	12 (42,9)
Bloqueadores beta	9 (25,0)	17 (33,3)	15 (34,1)	10 (34,5)
Antagonistas del calcio	8 (22,2)	19 (37,3)	18 (40,9)	11 (37,9)
Diuréticos	2 (5,6)	2 (3,9)	3 (6,8)	2 (7,1)

ARA-II: antagonistas del receptor de la angiotensina II; CT: colesterol total; EC: enfermedad coronaria; Glu: glucosa en ayunas; HDL: lipoproteínas de alta densidad; IAM: infarto agudo de miocardio; IECA: inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina; LDL: lipoproteínas de baja densidad; M: mujeres; PAD: presión arterial diastólica; PAS: presión arterial sistólica; PCR: proteína C reactiva; TG: triglicéridos totales; Tncl: troponina cardiaca I; V: varones.

Los valores expresan proporciones, n (%) o mediana [intervalo intercuartílico].

^a Por lo menos 1 cigarrillo diario durante más de 6 meses.

^b Cualquier tipo de bebida alcohólica, por lo menos 1 vez a la semana durante más de 6 meses.

^c $p < 0,05$ frente a grupo sin EC.

^d $p < 0,05$ frente a grupo con angina estable.

^e $p < 0,05$ frente a grupo con angina inestable.

susceptibles de romperse y desprenderse, mientras que las placas inestables no suelen estar calcificadas. Células inflamatorias, como CD3⁺T y los macrófagos CD68⁺, van acumulándose en las placas e inducen la apoptosis de las células vasculares del músculo liso, lo que aumenta el volumen de la placa y la incidencia de remodelación positiva, lo que al final provoca la formación de placas vulnerables^{40,41}. Se ha demostrado que la IL-5 desempeña una función protectora en la aterosclerosis, al estimular la diferenciación de células B-1 secretoras de anticuerpo T15/EO6, el cual bloquea la captación de lipoproteínas de baja densidad oxidadas por los macrófagos y reduce la formación de células espumosas⁴². En este estudio, se ha observado que la concentración plasmática de IL-5 era inferior en los pacientes con síndrome coronario agudo que en aquellos con angina estable. Esto indica que la IL-5 también se relaciona con la estabilización de las placas de la lesión coronaria.

Estudios previos mostraron que una proporción modificada de los linfocitos Th1/Th2 se relaciona con aparición de aterosclerosis/EC^{43,44}. Los factores de transcripción FOXP3 + Treg son fundamentales para mantener la homeostasis inmunitaria, ya que

responden a los estímulos del entorno permitiendo o inhibiendo la inflamación⁴⁵. Por otro lado, los valores tanto de Th1/Treg como de Th17/Treg son altos en los pacientes con EC y en modelos animales de aterosclerosis^{45,46}. Estas pruebas demostraron que el desequilibrio entre Th1/Th2 y Th17/Treg es crucial en la aparición de aterosclerosis/EC.

Teniendo en cuenta la función principal de Th1, Th17 y Treg, y para investigar los mecanismos de la IL-5 que intervienen en la aterosclerosis/EC, se estudió el efecto de la IL-5 en la diferenciación *in vitro* de Th1, Th17 y Treg. Los resultados mostraron que el tratamiento con rIL-5 inhibe la diferenciación de Th1 y Th17 y la concentración de ARNm de la citocina relacionada. Estos datos indican que la IL-5 tiene una función protectora en el entorno de la aterosclerosis.

Limitaciones del estudio

Primero, se requiere un modelo experimental de enfermedad cardiaca isquémica o infarto en animales para mostrar el efecto

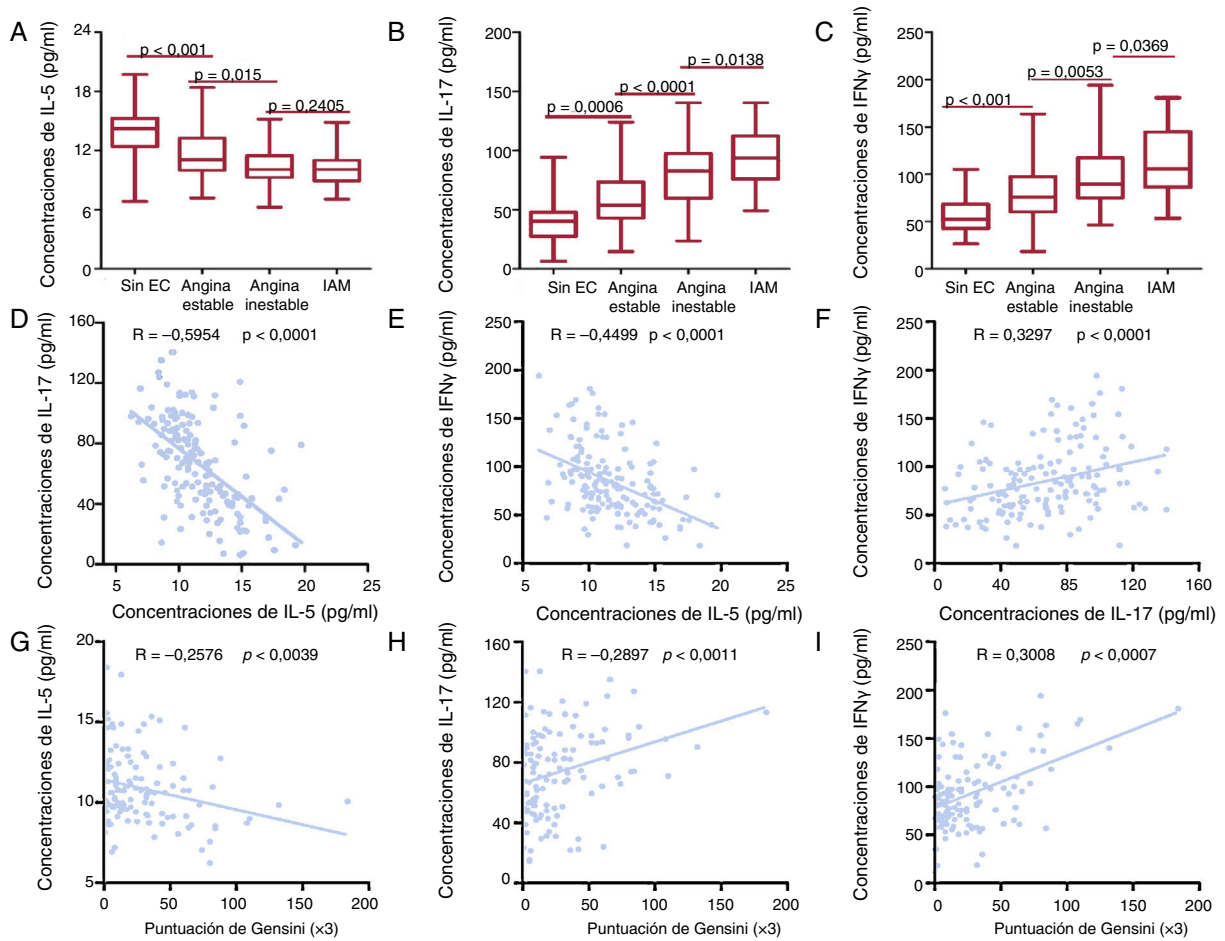


Figura 2. Citocinas en pacientes con enfermedad coronaria. Concentraciones plasmáticas de IL-5 (A), IL-17 (B) e IFN γ (C) en los grupos sin EC y con EC. Correlaciones entre las concentraciones de IL-5 (D), IL-17 (E) e IFN γ (F). Correlaciones entre la puntuación de Gensini y las concentraciones plasmáticas de IL-5 (G), IL-17 (H) e IFN γ (I). EC: enfermedad coronaria; IAM: infarto de miocardio; IFN γ : interferón gamma; IL: interleucina.

Tabla 4
Variables asociadas con la presencia de enfermedad coronaria

Variables	Lineal simple			Lineal binaria		
	β	IC95%	p	β	IC95%	p
IL-5	-0,528	-0,662 a -0,395	< 0,001	-0,273	-0,455 a -0,091	0,003
IL-17	0,470	-0,331 a 0,609	< 0,001	0,228	0,068 a 0,388	0,006
IFN γ	0,445	0,305-0,586	< 0,001	0,232	0,081 a 0,382	0,003
Tncl	0,300	0,150-0,450	< 0,001	0,017	-0,132 a 0,166	0,822
CT	0,286	0,136-0,437	< 0,001	0,000	-0,147 a 0,146	0,998
LDL	0,265	0,113-0,416	0,001	0,047	-0,094 a 0,189	0,510
Glu	0,250	0,036-0,402	0,021	0,001	-0,143 a 0,145	0,992
Sexo	0,077	-0,079 a 0,234	0,331			
Edad	0,118	-0,038 a 0,274	0,137			
Fumar	0,137	-0,018 a 0,293	0,083			
Beber	0,075	-0,082 a 0,232	0,346			
TG	0,049	-0,108 a 0,206	0,535			
PCR	0,141	-0,015 a 0,296	0,076			

CT: colesterol total; Glu: glucosa en ayunas; IC95%: intervalo de confianza del 95%; IFN γ : interferón gamma; IL: interleucina; LDL: lipoproteínas de baja densidad; PCR: proteína C reactiva; TG: triglicéridos totales; Tncl: troponina cardiaca I.

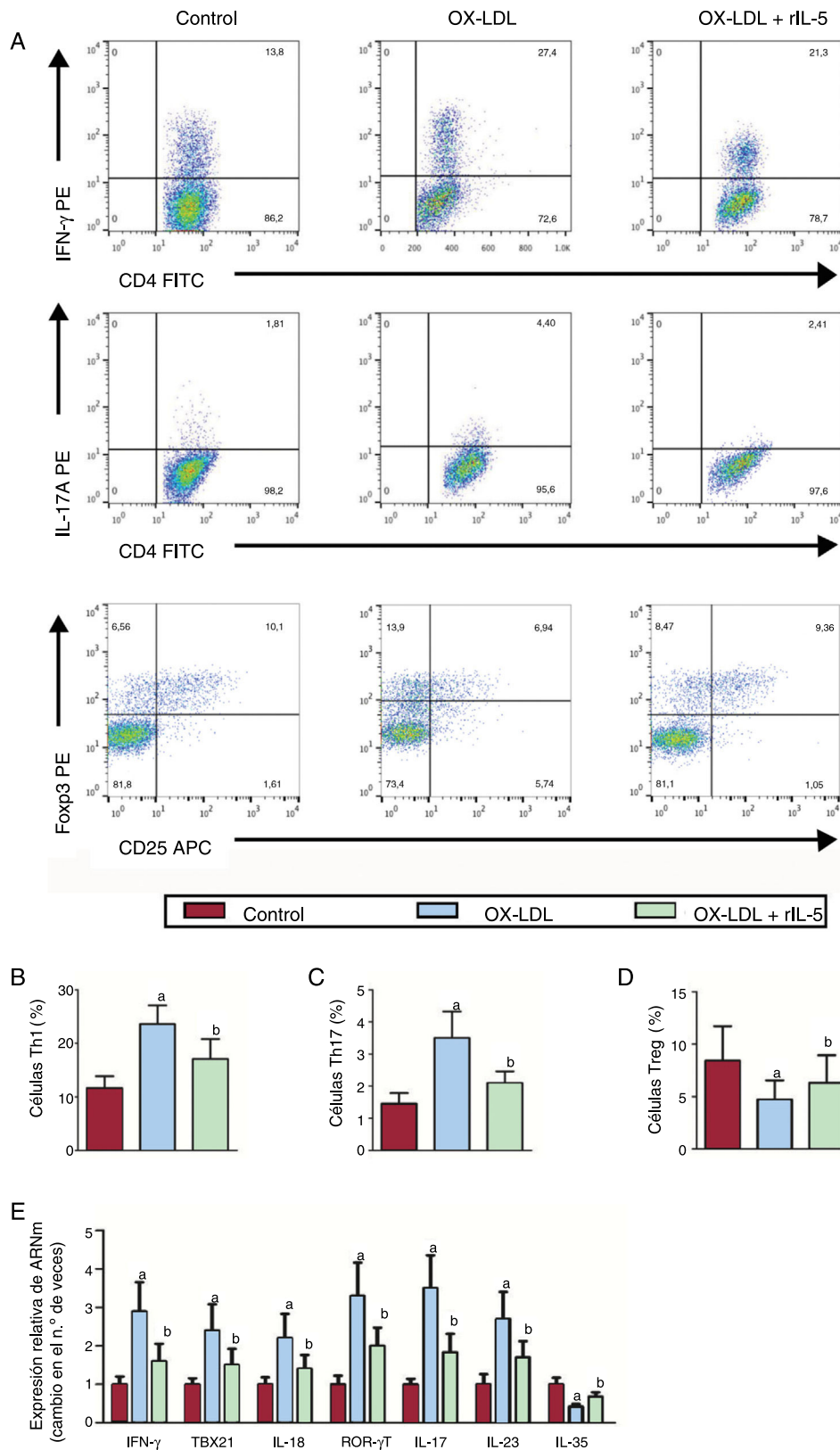


Figura 3. Efecto de la IL-5 en la diferenciación *in vitro* de Th1, Th17 y Treg. A: se identificaron células Th1 y Th17 entre las CD4⁺Th en función de su expresión de CD4⁺IFN- γ ⁺ y CD4⁺IL-17⁺ respectivamente. Valores de Th1 (B), Th17 (C) y Treg (D) en los grupos de control, OX-LDL y OX-LDL + rIL-5. E: las concentraciones de ARNm de IFN- γ , TBX21, IL-18, ROR- γ T, IL-17, IL-23 e IL-35 en los 3 grupos se determinaron mediante RT-qPCR. CD: antígeno CD o de diferenciación; IFN- γ : interferón gamma; IL: interleucina; OX-LDL: lipoproteínas de baja densidad oxidadas; PE: ficoeritrina; rIL-5: IL-5 recombinante de ratón; ROR- γ : receptor huérfano gamma relacionado con el receptor de ácido retinoico; RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa tras transcriptasa inversa; TBX: factor de transcripción caja T; Th: células T *helper*; Treg: célula T reguladora. ^ap < 0,05 frente a grupo control. ^bp < 0,05 frente a grupo OX-LDL.

deletéreo de la IL-5KO o el efecto positivo de la estimulación *in vivo* de IL-5. Segundo, el tamaño de la muestra del estudio es insuficiente y se requieren más pacientes para validar los resultados. Tercero, los pacientes hospitalarios que participaron en el estudio pueden haber causado sesgo de selección, ya que en general se considera que su enfermedad es más grave. Por último, se constató una falta de visitas de seguimiento en los pacientes con EC.

CONCLUSIONES

Este estudio es el primero que demuestra una fuerte relación negativa entre la EC y la concentración plasmática de IL-5. El posible mecanismo es que la IL-5 atenúa la aterosclerosis/EC inhibiendo la inflamación. En resumen, se observó que la IL-5 se relaciona de forma negativa con la presencia de EC y que inhibe la diferenciación *in vitro* de Th1 y Th17.

CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

¿QUÉ SE SABE DEL TEMA?

- Aunque hay muchos métodos que sirven para diagnosticar EC, siguen siendo necesarios marcadores plasmáticos específicos para los pacientes con bajo riesgo y conveniencia, en especial para aquellos que no pueden someterse a una angiografía coronaria. La relación entre la concentración de IL-5 y la EC sigue sin estar clara.

¿QUÉ APORTA DE NUEVO?

- En pacientes con un diagnóstico establecido de EC, se halló que la concentración plasmática de IL-5 había disminuido y que la IL-5 se relacionaba negativamente con citocinas proinflamatorias.
- La IL-5 recombinante inhibe la diferenciación *in vitro* de Th1 y Th17 inducida por lipoproteínas de baja densidad oxidadas.
- La inflamación se relaciona con aparición de aterosclerosis/EC, y se ha probado que Th1 y Th17 son dos células inmunitarias importantes que favorecen la aparición de aterosclerosis/EC. En este estudio, la IL-5 inhibió la diferenciación de Th1 y Th17 inducida por lipoproteínas de baja densidad oxidadas. Esto indica que la aparición de aterosclerosis/EC puede estar relacionada con una incapacidad de inhibir con eficacia la diferenciación de Th1 y Th17 causada por deficiencia de IL-5, lo que intensifica la inflamación. La IL-5 será definitivamente útil para la prevención y el tratamiento de la aterosclerosis/EC en la práctica clínica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Khera AV, Kathiresan S. Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation. *Nat Rev Genet*. 2017;18:331–344.
2. Li Q, Kuang Y, Qiu J, Zhang X, Ruan Y, Li Z. The correlation between plasma tissue factor and interleukin 18 and their significance in patients with acute coronary syndrome. *Cardiovasc Toxicol*. 2015;15:276–282.
3. Kamari Y, Shaish A, Shemesh S, et al. Reduced atherosclerosis and inflammatory cytokines in apolipoprotein-E-deficient mice lacking bone marrow-derived interleukin-1 alpha. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;405:197–203.
4. Simon TG, Trejo M, McClelland R, et al. Circulating Interleukin-6 is a biomarker for coronary atherosclerosis in nonalcoholic fatty liver disease: Results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Int J Cardiol*. 2018;259:198–204.
5. Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. Interleukin-18 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E(-/-) mice through release of interferon-gamma. *Circ Res*. 2002;90:E34–E38.
6. Mallat Z, Besnard S, Duriez M, et al. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res*. 1999;85:e17–e24.
7. Ishigami T, Abe K, Aoki I, et al. Anti-interleukin-5 and multiple autoantibodies are associated with human atherosclerotic diseases and serum interleukin-5 levels. *FASEB J*. 2013;27:3437–3445.
8. Xu J, Ehrman B, Graham LM, Eagleton MJ. Interleukin-5 is a potential mediator of angiotensin II-induced aneurysm formation in apolipoprotein E knockout mice. *J Surg Res*. 2012;178:512–518.
9. Umemoto S, Suzuki N, Fujii K, et al. Eosinophil counts and plasma fibrinogen in patients with vasospastic angina pectoris. *Am J Cardiol*. 2000;85:715–719.
10. Nadimi AE, Ahmadi J, Mehrabian M. Peripheral eosinophil count and allergy in patients with coronary artery disease. *Acta Med Indones*. 2008;40:74–77.
11. Takatsu K, Kouro T, Nagai Y. Interleukin 5 in the link between the innate and acquired immune response. *Adv Immunol*. 2009;101:191–236.
12. Zhang G, Rowe J, Kusel M, et al. Interleukin-10/interleukin-5 responses at birth predict risk for respiratory infections in children with atopic family history. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179:205–211.
13. Hall LR, Mehlotra RK, Higgins AW, Haxhiu MA, Pearlman E. An essential role for interleukin-5 and eosinophils in helminth-induced airway hyperresponsiveness. *Infect Immun*. 1998;66:4425–4430.
14. Zaynagetdinov R, Sherrill TP, Gleaves LA, et al. Interleukin-5 Facilitates Lung Metastasis by Modulating the Immune Microenvironment. *Cancer Res*. 2015;75:1624–1634.
15. Akilimali NA, Chang CC, Muema DM, et al. Plasma But Not Cerebrospinal Fluid Interleukin 7 and Interleukin 5 Levels Pre-Antiretroviral Therapy Commencement Predict Cryptococcosis-Associated Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome. *Clin Infect Dis*. 2017;65:1551–1559.
16. Liu CL, Wang Y, Liao M, et al. Allergic Lung Inflammation Aggravates Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysms in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36:69–77.
17. Cappuzzello C, Di Vito L, Melchionna R, et al. Increase of plasma IL-9 and decrease of plasma IL-5, IL-7, and IFN-gamma in patients with chronic heart failure. *J Transl Med*. 2011;9:28.
18. Lasser EC, Berry C, Kortman K. Diminished atherosclerotic arterial calcifications in asthma. A possible role for elevated endogenous heparin-like material. *Allergy*. 1987;42:549–552.
19. Lin Y, Huang Y, Lu Z, et al. Decreased Plasma IL-35 Levels Are Related to the Left Ventricular Ejection Fraction in Coronary Artery Diseases. *PLoS One*. 2012;7:e5249012.
20. Inoue T, Komoda H, Nonaka M, Kameda M, Uchida T, Node K. Interleukin-8 as an independent predictor of long-term clinical outcome in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol*. 2008;124:319–325.
21. Schlitt A, Blankenberg S, Yan D, et al. Further evaluation of plasma sphingomyelin levels as a risk factor for coronary artery disease. *Nutr Metab (Lond)*. 2006;3:5.
22. Ye J, Wang M, Xu Y, et al. Sestrins increase in patients with coronary artery disease and associate with the severity of coronary stenosis. *Clin Chim Acta*. 2017;472:51–57.
23. Li Y, Zhang C, Wu Y, et al. Interleukin-12p35 deletion promotes CD4 T-cell-dependent macrophage differentiation and enhances angiotensin II-induced cardiac fibrosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:1662–1674.
24. Yin L, Wu X, Gong Y, et al. OX-LDL up-regulates the vascular endothelial growth factor-to-pigment epithelium-derived factor ratio in human retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res*. 2011;36:379–385.
25. Ohmatsu H, Hummel D, Gonzalez J, et al. IL-32 induces indoleamine 2,3-dioxygenase⁺ dendritic cells and indoleamine 2,3-dioxygenase⁺CD163⁺ macrophages: Relevance to mycosis fungoides progression. *Oncoimmunology*. 2017;6:e1181237.
26. Kuo H, Wang C, Liang CD, et al. Association of lower eosinophil-related T helper 2 (Th2) cytokines with coronary artery lesions in Kawasaki disease. *Pediatr Allergy Immunol*. 2009;20:266–272.
27. Collot-Teixeira S, Martin J, McDenno-Roe C, Poston R, McGregor JL. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2007;75:468–477.
28. Kain D, Amit U, Yagil C, et al. Macrophages dictate the progression and manifestation of hypertensive heart disease. *Int J Cardiol*. 2016;203:381–395.
29. Sager HB, Hulsmans M, Lavine KJ, et al. Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure. *Circ Res*. 2016;119:853–864.
30. Fujii K, Shibata M, Nakayama Y, et al. A heart-brain-kidney network controls adaptation to cardiac stress through tissue macrophage activation. *Nat Med*. 2017;23:611–622.
31. Amaki T, Suzuki T, Nakamura F, et al. Circulating malondialdehyde modified LDL is a biochemical risk marker for coronary artery disease. *Heart*. 2004;90:1211–1213.
32. Yamada Y, Doi T, Hamakubo T, Kodama T. Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*. 1998;54:628–640.
33. Taleb S. Inflammation in atherosclerosis. *Arch Cardiovasc Dis*. 2016;109:708–715.
34. Taleb S, Tedgui A, Mallat Z. IL-17 and Th17 cells in atherosclerosis: subtle and contextual roles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:258–264.

35. Eid RE, Rao DA, Zhou J, et al. Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2009;119:1424–1432.
36. Chen Y, Duan Y, Kang Y, et al. Activation of Liver X Receptor Induces Macrophage Interleukin-5 Expression. *J Biol Chem*. 2012;287:43340–43350.
37. Zhao W, Lei T, Li H, et al. Macrophage-specific overexpression of interleukin-5 attenuates atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Gene Ther*. 2015;22:645–652.
38. Sämpi M, Ukkola O, Päiväsalo M, Kesäniemi YA, Binder CJ, Hörkkö S. Plasma Interleukin-5 Levels Are Related to Antibodies Binding to Oxidized Low-Density Lipoprotein and to Decreased Subclinical Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:1370–1378.
39. Oka T, Yamamoto H, Ohashi N, et al. Association between epicardial adipose tissue volume and characteristics of non-calcified plaques assessed by coronary computed tomographic angiography. *Int J Cardiol*. 2012;161:45–49.
40. Geng YJ, Henderson LE, Levesque EB, Muszynski M, Libby P. Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:2200–2208.
41. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber D, Virmani R. Morphological predictors of arterial remodeling in coronary atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:297–303.
42. Li X, Cao X, Zhang X, et al. MEK1/2 inhibitors induce interleukin-5 expression in mouse macrophages and lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;473:939–946.
43. Cheng X, Chen Y, Xie JJ, et al. Suppressive oligodeoxynucleotides inhibit atherosclerosis in ApoE(-/-) mice through modulation of Th1/Th2 balance. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;45:168–175.
44. Xie JJ, Wang J, Tang TT, et al. The Th17/Treg functional imbalance during atherogenesis in ApoE(-/-) mice. *Cytokine*. 2010;49:185–193.
45. Butcher MJ, Filipowicz AR, Waseem TC, et al. Atherosclerosis-Driven Treg Plasticity Results in Formation of a Dysfunctional Subset of Plastic IFNgamma + Th1/Tregs. *Circ Res*. 2016;119:1190–1203.
46. Cheng X, Yu X, Ding YJ, et al. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol*. 2008;127:89–97.