



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA

**Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas**

**TESIS DOCTORAL: INTERVENCIÓN DE LOS  
MONOCITOS Y DE SU RECEPTOR PARA LA  
QUIMIOTAXIS, CCR2, EN EL DESARROLLO DE LA  
ATEROSCLEROSIS CORONARIA.**

**PROGRAMA: AVANCES EN MEDICINA INTERNA.**

AUTOR: José María Medina Gil

TUTORES: Efrén Martínez Quintana.

Antonio Tugores Cester.



**TESIS DOCTORAL: INTERVENCIÓN DE LOS  
MONOCITOS Y DE SU RECEPTOR PARA LA  
QUIMIOTAXIS, CCR2, EN EL DESARROLLO DE LA  
ATEROSCLEROSIS CORONARIA.**

José María Medina Gil.

Efrén Martínez Quintana.

Antonio Tugores Cester.



# **AUTORIZACIÓN DIRECTORES DE TESIS.**

Efrén Martínez Quintana y Antonio Tugores Cester,

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral: “Intervención de los monocitos y de su receptor para la quimiotaxis, CCR2, en el desarrollo de la aterosclerosis coronaria”, presentada por José María Medina Gil, para aspirar al grado de Doctor en Medicina, ha sido realizada bajo nuestra dirección.

En Las Palmas de Gran Canaria, a 9 de octubre de 2015.

Fdo: Dr. Efrén Martínez Quintana.

Fdo: Dr. Antonio Tugores Cester.



*Para mi familia, a la que cada día quiero más.*

*Para María, porque consigue que cada momento con ella sea especial.*





## **AGRADECIMIENTOS.**

*Para Efrén por ayudarme en mi formación como médico y por su apoyo para desarrollar esta tesis.*

*Para Antonio, por abrirme el apetito investigador y por enseñarme el valor de procrastinar.*

*Para Paloma, que tanto ha trabajado en esta tesis.*

*Para el Dr. Saavedra y el Dr. Limiñana, por su inestimable ayuda con el análisis estadístico.*

*Para Pablo, Rayco, Hector, Laura y demás compañeros de Cardiología de Hospital Insular, que me siguen enseñando a ser mejor cardiólogo.*

*Para mi maestra Vicky, porque parte de este trabajo también es suyo.*



# ÍNDICE.

1. Introducción.....	15
1.1 Los monocitos.....	19
1.2 El receptor CCR2 y sus ligandos.....	21
1.3 Evidencia sobre la intervención de CCR2 en la aterosclerosis primaria..	25
1.4 Evidencia sobre la intervención de CCR2 en la hiperplasia neointimal...	28
2. Hipótesis.....	31
3. Objetivos.....	32
4. Material y método.....	33
4.1 Recogida de datos clínicos y de laboratorio.....	33
4.2 Análisis estadístico.....	38
4.3 Análisis genético .....	39
4.4 Análisis bioinformático.....	41
5. Resultados.....	42
5.1 Descripción de la población estudiada.....	42
5.2 El tipo de evento cardiológico influye en la respuesta inflamatoria .....	54
5.3 Búsqueda de variantes genéticas en los genes CCR2, CCL2 y CCL7...	59
5.4 Repercusión de la SNP rs17735770 de CCL7.....	62
5.5 Análisis de casos jóvenes frente a controles jóvenes.....	66
5.6 Impacto de la variante rs17735770 en la estructura del mRNA en la zona 3'UTR .....	71
6. Discusión .....	75
6.1 Descripción de la población estudiada.....	75
6.2 Relación entre la cardiopatía isquémica y la inflamación .....	78
6.3 Influencia de la SNP rs17735770 de CCL7 en la cardiopatía isquémica	79
7. Conclusiones .....	87
8. Bibliografía.....	89



# 1. INTRODUCCIÓN.

La aterosclerosis, con sus manifestaciones clínicas como el infarto agudo de miocardio, el ictus y la enfermedad vascular periférica, se está convirtiendo en una de las causas principales de muerte en el mundo<sup>(1)</sup>. En su desarrollo influyen factores de riesgo clásicos como el tabaco, la hipertensión arterial, la diabetes mellitus, la dislipemia o los antecedentes familiares de cardiopatía isquémica precoz. En las últimas décadas se ha puesto de manifiesto que la inflamación es un proceso clave en el desarrollo de la ateromatosis interviniendo desde el inicio, la maduración y hasta las complicaciones de las placas ateroscleróticas<sup>(2,3,4)</sup>.

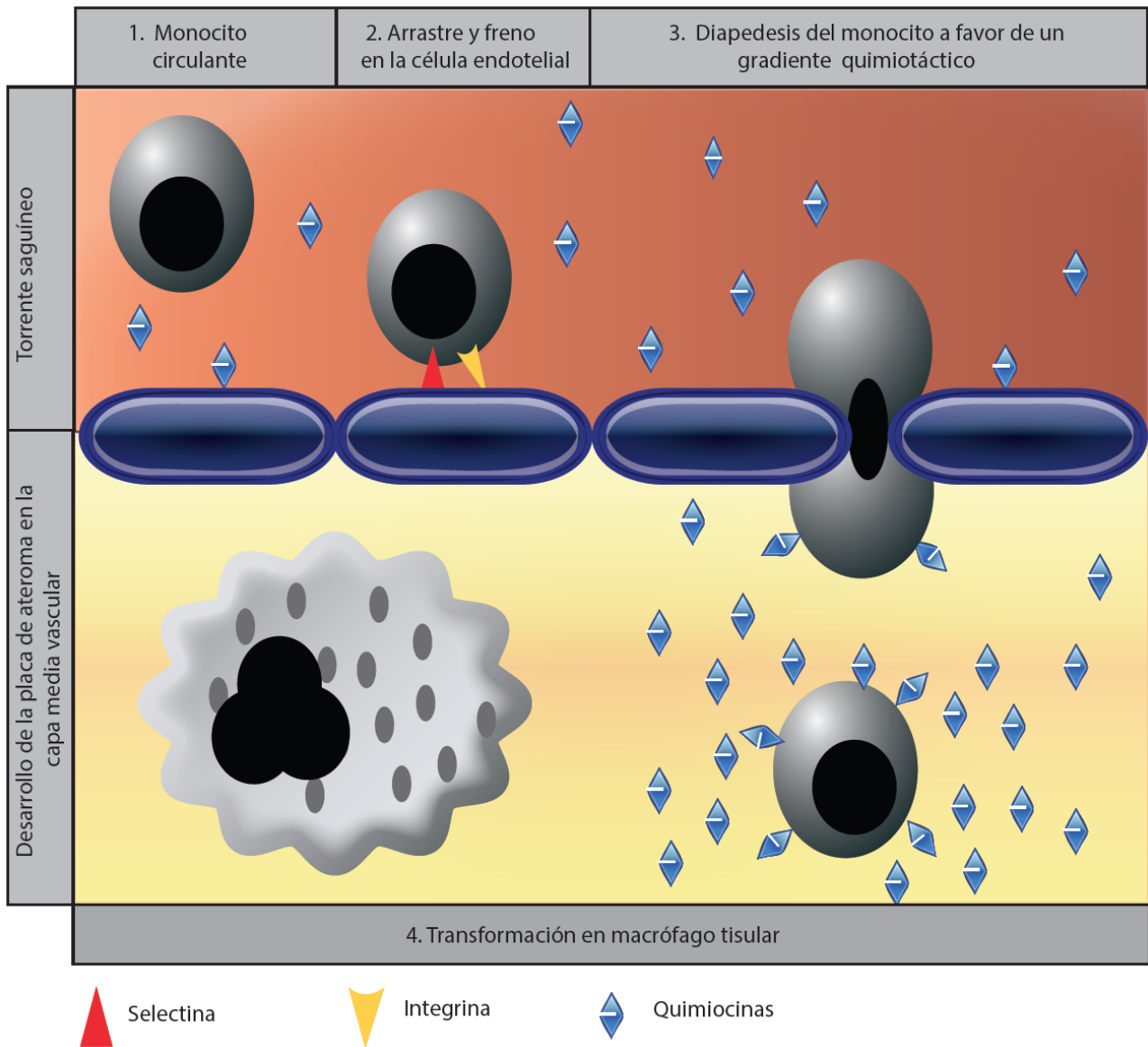
El punto de vista tradicional, en el que el crecimiento de la lesión está dirigido por una constante división y migración de las células musculares lisas ha sido sustituido por modelos en los que el proceso inflamatorio juega un papel central en la iniciación y progresión de la placa de ateroma<sup>(5)</sup>, así como en la inestabilización de la misma, interviniendo citoquinas y proteasas producidas por las propias células inflamatorias y que contribuyen directamente al crecimiento y rotura de las placas. Un ejemplo de esto es el hecho de que los niveles de proteína C reactiva en la fase aguda presentan una mayor fuerza de predicción de eventos cardiovasculares que los niveles elevados de LDL-c<sup>(6)</sup>. En este proceso, el monocito juega un papel fundamental desde el inicio<sup>(2,3,4)</sup>, ya que será el que se transforme una vez dentro del endotelio en macrófago y célula espumosa promoviendo la formación de la placa<sup>(7)</sup>.

Los monocitos circulan libremente por el torrente sanguíneo. En respuesta a una señal inflamatoria local (producida por mastocitos, terminaciones nerviosas, plaquetas y glóbulos blancos tras a una agresión), se produce un aumento de la adhesión de las células endoteliales a los monocitos a través de la activación de selectinas inicialmente y que se refuerza posteriormente por integrinas, así como una disminución de la adhesión entre las células endoteliales que favorece el paso de las células y la permeabilidad a los componentes lipídicos del plasma tal como las lipoproteínas de baja densidad (LDL)<sup>(1,7)</sup>. Una vez detenidos los monocitos en la pared vascular, se produce el paso a la capa media guiado por un gradiente de moléculas quimiotácticas liberadas en el lugar de la agresión<sup>(4, 8, 9)</sup>.

Las quimiocinas intervienen en este proceso de diferentes formas, desde los estadios iniciales aumentando la adhesividad de las integrinas (lo cual facilita la detención del leucocito) y produciendo un gradiente de concentración de citocinas, denominado gradiente quimiotáctico, que favorece el desplazamiento de células a la pared del vaso, proceso denominado diapedesis. Además también pueden proveer importante acción anti-apoptótica <sup>(10)</sup> .

Una vez dentro del endotelio, el monocito se transforma en macrófago tisular expresando receptores *scavenger* que se fijan a lipoproteínas modificadas (por oxidación o glicación), lo cual da lugar a la célula espumosa, producida por la acumulación en el interior de su citoplasma de gotas lipídicas, y que es el origen de la formación de la estría grasa intimal. En la íntima arterial el macrófago contribuye a muchas funciones relacionadas con la aterosclerosis y sus complicaciones, entre ellas la secreción de citoquinas proinflamatorias que amplifican la repuesta inflamatoria local<sup>(5)</sup> . La continua acumulación e hipertrofia celular inducida por este *feed back* positivo entre células resultan en un progresivo estrechamiento de la luz arterial.

El macrófago activado es la llave también en las complicaciones trombóticas de la aterosclerosis puesto que contribuye tras la muerte de la célula, a veces mediante apoptosis, a la formación del núcleo necrótico de la placa de ateroma <sup>(3)</sup> , además de que produce activamente proteasas como metaloproteinasas y catepsinas que desestabilizan la placa dañando la matriz extracelular y adelgazando la cápsula fibrosa <sup>(5, 4, 11)</sup> . La vulnerabilidad de la placa de ateroma está determinada por un gran núcleo necrótico, una cápsula fibrosa fina e infiltración por células inflamatorias. Cuando esta cápsula se rompe, se pone en contacto a la sangre con otro producto derivado de los macrófagos, como es la potente proteína procoagulante factor tisular, que favorece la trombosis coronaria y la aparición del SCA <sup>(10,12)</sup> .



**Figura 1. Diapedesis del monocito en la placa de ateroma.** El aumento de los niveles de quimioquinas en sangre induce la expresión de moléculas que detienen a los monocitos en la pared vascular. Posteriormente, el monocito se desplaza a través de las células endoteliales guiado por un gradiente quimiotáctico hasta alcanzar la capa media vascular donde se diferenciará a macrófago y células espumosa.

Las moléculas de LDL oxidadas son también un punto clave en el proceso aterosclerótico y necesarias en la formación de la célula espumosa, dado que estimulan la expresión por el macrófago de moléculas quimioatrayentes, como la citocina CCL2 entre otras, promoviendo el reclutamiento de más células monocíticas durante proceso de aterogénesis <sup>(13-16)</sup>.

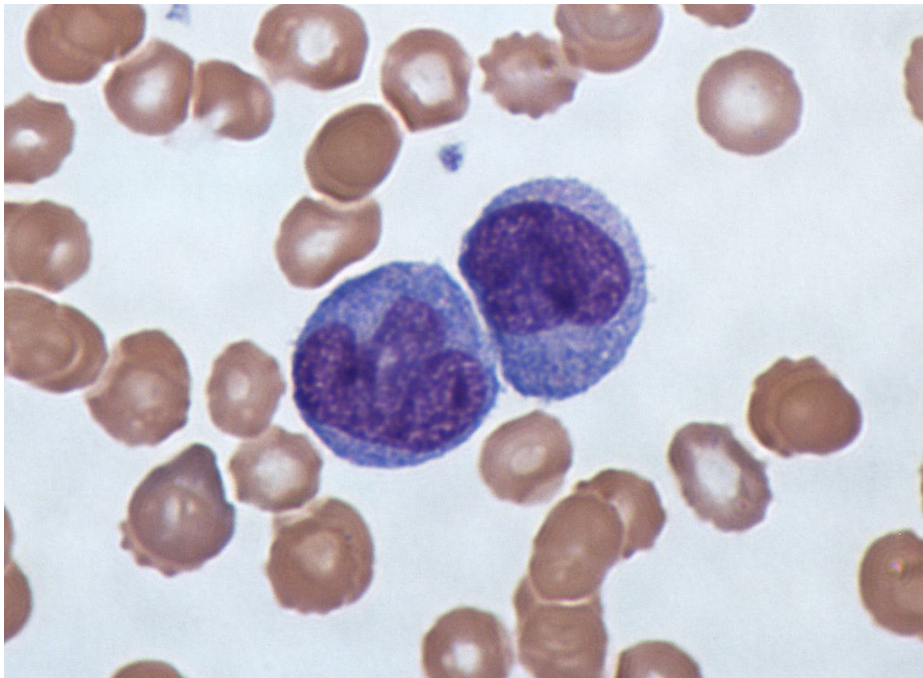
En oposición a la aterosclerosis primaria descrita anteriormente, el daño agudo de la pared vascular, por ejemplo en relación con una angioplastia, desencadena mecanismos diferentes y significativamente más rápidos. Estos vienen iniciados por una erosión endotelial aguda y adhesión plaquetaria a los componentes de la matriz extracelular, así como la apoptosis masiva de células musculares lisas en la capa media de la pared. La acumulación posterior de células musculares lisas en la capa íntima para restaurar la integridad de la pared arterial consiguientemente lleva a hiperplasia intimal y a la progresiva estenosis del vaso <sup>(17)</sup> . En un estudio en el que se realizó angioplastia con balón a conejos alimentados con dieta rica en colesterol, se mostró que la infiltración temprana de monocitos en la íntima precedía a la acumulación de células musculares lisas, lo cual sugiere que el reclutamiento precoz de monocitos desencadena una respuesta inflamatoria crónica y más sostenida probablemente por liberación de citoquinas y factores de crecimiento llevando a un flujo continuo de monocitos y acumulación de células musculares lisas durante el crecimiento neointimal <sup>(18)</sup> .

Por consiguiente, la aterosclerosis tanto en forma primaria como la secundaria a una agresión endotelial, es una enfermedad inflamatoria promovida por la interacción de los leucocitos migratorios, principalmente monocitos, con las células del endotelio vascular, las células musculares lisas y los fibroblastos. A nivel molecular, la interacción entre estos tipos celulares están regulados por las citoquinas, las moléculas de adhesión y los quimioatrayentes <sup>(3,19,20)</sup> .



## 1.1 Los monocitos.

Los monocitos son un grupo heterogéneo de glóbulos blancos que se caracterizan por ser el tipo de leucocito más grande, poseer un núcleo de gran tamaño arriñonado, lobulado o cerebriforme y no poseer vesículas granulares en su interior (es un leucocito agranulocítico al igual que los linfocitos). Se generan en la médula ósea y después de permanecer alrededor de 24 horas en el torrente sanguíneo, lo abandonan y atraviesan el endotelio de los capilares hacia el tejido conectivo inflamado donde se diferencian a macrófagos.



**Figura 2.** Imagen de microscopio óptico de una muestra de sangre periférica con tinción de hematoxilina-eosina en la que se observa un monocito. Extraído de <https://es.wikipedia.org/wiki/Monocito>

Existen dos subtipos principales de monocitos reconocidos en humanos y en ratas, diferenciados en base a la expresión de los receptores de quimioquinas en su superficie, CCR2 y CX3CR1 (receptor de fractalkina). Los monocitos CCR2<sup>+</sup> son conocidos como “monocitos clásicos”, los cuales comprenden la mayoría de los monocitos humanos (>92%) y se caracterizan por su respuesta, fundamentalmente, a la proteína quimioatrayente del monocito 1 (CCL2 o MCP1) <sup>(10, 21, 22)</sup>.

Los monocitos clásicos provienen de la médula ósea, siendo los niveles circulantes de sus ligandos CCL2 (antes llamado MCP1, *monocyte chemoattractant protein-1*) y CCL7 (antes conocida como MCP3, *monocyte chemoattractant protein-3*) los principales que intervienen en mantener unos niveles homeostáticos de monocitos en circulación <sup>(21,23)</sup> . Posteriormente, se establecen selectivamente en los sitios con inflamación (a diferencia de los no clásicos que los encontramos en tejidos linfoides y no linfoides bajo condiciones no-inflamatorias). Los monocitos clásicos (CCR2+) son los que se acumulan en las placas ateroscleróticas, necesitando para entrar en la misma de la activación de CCR2 entre otros receptores <sup>(10,24)</sup> . De hecho, se ha observado que estos monocitos clásicos están aumentados de forma muy importante en ratones hipercolesterolémicos (ApoE -/-) que consumen una dieta con alto contenido en grasa, siendo el principal subtipo que se adhiere al endotelio activado, infiltra las lesiones y se convierte en macrófago <sup>(25)</sup> . Además, los monocitos clásicos constituyen un factor clave en la inestabilización de la placa de ateroma mediante la inducción de la reacción inflamatoria que finaliza con mayor producción de metaloproteinasas que adelgazan la cápsula fibrótica y aumento del core necrótico <sup>(21)</sup> habiéndose descrito en humanos que los niveles elevados de monocitos clásicos en sangre predicen el desarrollo de un evento coronario agudo <sup>(26)</sup> .

## 1.2 El receptor CCR2 y sus ligandos.

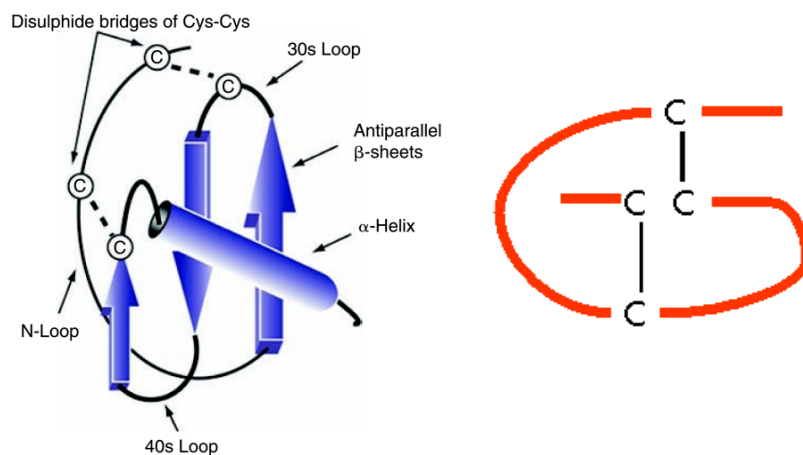
Desde 1986, un amplio número de citoquinas han sido estudiadas, clonadas y secuenciadas. Hoy en día se sabe que cumplen funciones importantes en la inflamación, proliferación o apoptosis de diferentes células, en la morfogénesis tisular, hematopoyesis, angiogénesis y en el desarrollo de respuesta inmune específica induciendo el tráfico de células del sistema inmune <sup>(27)</sup>.

Las quimioquinas son una potente familia de citoquinas quimiotácticas que regulan el tráfico de leucocitos hacia la zona de lesión, en este caso, el lugar de la inflamación vascular. Su estructura se caracteriza por presentar dos puentes de cisteína en su extremo N terminal. Estos residuos están bien conservados (ver figura 3), estableciéndose la nomenclatura de las quimioquinas en base a la posición que tengan (CC, CXC, C, CX3C), por lo que la denominación CCL es debida a que poseen dos residuos de cisteína adyacentes <sup>(28)</sup>.

```

hMCP-1 QFDAINAPVT CC YNFTNRKISVQRLASYRRITSSK C PKEAVIFKTIVAKEI C ADPKQKVVQDSMDHLDKQTQTPKT
hMCP-2 QFDSNSSPT CC NNNRKIPRQRLSYRITNMD C PKEAVIFKTRRGEKEV C ADPKEWVVDSMHHLDQIFQNIKP
hMCP-3 QPVINTSTT CC YFNKIPRQRLSYRRTSSH C PREAVIFKTRLDEKEI C ADPRQKVQDMHLDKTQTPKL
hMCP-4 QPDA NPT CC PTFSSKKISSQRLSYRITS C PREAVIFRTRLGEKEI C ADPKKWVQMHLGRKAHTKT
  
```

**Figura 3. Estructura primaria de CCL2 Y CCL7 humano.** Las secuencias de aminoácidos de ambos están alineadas. Los residuos de cisteína conservados están alineados <sup>(28)</sup>.



**Figura 4. Estructuras terciaria y secundaria de la quimioquinas.** A la izquierda vemos una representación esquemática de la estructura tridimensional de las quimioquinas, donde se muestra la lámina  $\alpha$  y  $\beta$  además de los residuos de cisteína en los bucles 30 y 40. Todas las quimioquinas comparten una estructura típica de llave griega (reflejada en la figura de la derecha) que se estabiliza por enlaces de residuos de cisteína bien conservados. Obtenido de Deshmane et al, 2009 <sup>(28)</sup>.

## CCR2.

El receptor de quimioquinas CCR2 (*C-C chemokine receptor type 2*) es una proteína con 5 dominios transmembrana acoplada a proteína G. La expresión de CCR2 está restringida a relativamente pocas células (monocitos principalmente, células musculares lisas, neutrófilos, linfocitos *NK*) y su función principal es inducir la atracción de estas células hacia las zonas de lesión <sup>(5,28)</sup>. El gen que codifica para este receptor se localiza en el cromosoma 3p21.3 y entre sus ligandos se han descrito múltiples proteínas, destacando las proteínas de quimioatracción de monocitos -1 (MCP-1 o CCL2) y 3 (MCP-3 o CCL7). Hay dos isoformas de CCR2, denominadas CCR2A y CCR2B, que sólo difieren en su cola C terminal <sup>(29)</sup>, a pesar de lo cual, su mecanismo de acción es diferente. Por ejemplo, la quimiotaxis de células CCR2A+ ocurre sin la movilización del calcio intracelular, pero éste sí se induce en las células CCR2B <sup>(30)</sup>, que es el inductor más potente de la quimiotaxis y el que se expresa mayormente en los monocitos <sup>(28)</sup>.

## CCL2 / MCP-1.

CCL2, también llamada MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) es una citoquina pequeña (13 kDa) cuyo gen en humanos se localiza en el cromosoma 17 q11.2-12 <sup>(5,31)</sup>. Las principales células que lo liberan son los monocitos y sus derivados (macrófagos y células dendríticas) aunque lo producen todas las células que intervienen en la placa de ateroma (células endoteliales, células musculares lisas además de los macrófagos). A diferencia de otras quimiocinas, muestra afinidad exclusivamente a un receptor, CCR2.

A nivel de la placa de ateroma, CCL2 interviene a través de diferentes funciones:

- Regula de forma local la expresión de moléculas de adhesión, así como de otras citoquinas (IL1, IL6) y metaloproteinasas <sup>(32)</sup>.
- Induce la diapedesis desde la circulación de los monocitos con receptor CCR2 (CCR2+) <sup>(29)</sup>.

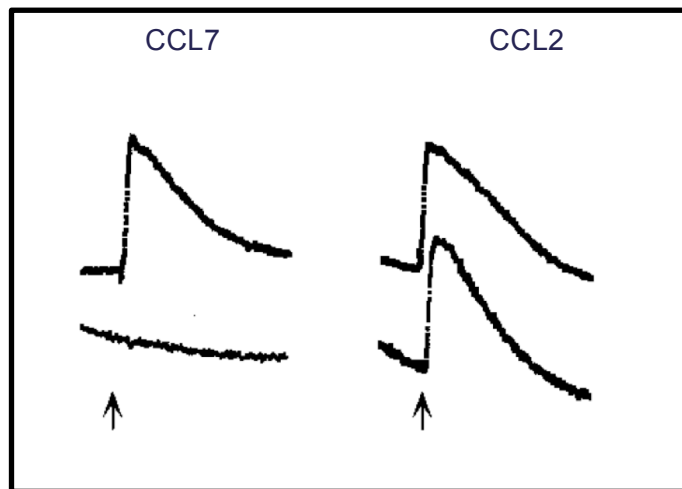
- Promueve la diferenciación de los monocitos a macrófagos cargados de lípidos, además de contribuir a la proliferación de las células musculares lisas, promoviendo por tanto, el desarrollo del componente celular de la placa de ateroma <sup>(5)</sup> .
- Además, aumenta la expresión de factor tisular en células musculares lisas y linfocitos T colaboradores, lo cual sugiere que CCL2 tiene también una función procoagulante <sup>(32)</sup> .
- Interviene también en la inestabilización de la placa de ateroma habiéndose encontrado concentraciones mayores de CCL2 así como niveles mayores de RNA de CCL2 en los pacientes con placas inestables <sup>(33-35)</sup> .

### CCL7 / MCP-3.

Por su parte, CCL7 cuyo gen se localiza en la región 17q11.2-q12 <sup>(36)</sup> , no se une específicamente a CCR2, por lo que podemos encontrar receptores que responden a CCL7 en diferentes células: monocitos (CCR1 y CCR2), eosinófilos (CCR3), linfocitos TH2 (CCR3, CCR4 y CCR8), basófilos (CCR3) y células dendríticas inmaduras (CCR1 y CCR2), lo cual subraya la importancia del papel jugado por CCL7 para regular en tráfico de células y la respuesta inmune. En el caso de CCR2, CCL7 se une a la isoforma CCR2B <sup>(37)</sup> .

En condiciones normales, CCL7 libre se une a los receptores de leucocitos CCR-1, 2 y 3, induciendo un aumento del calcio intracelular con lo que promueve la migración del leucocito hacia la zona de inflamación. Sin embargo, en el caso de la placa de ateroma establecida, hay algunas diferencias que afectan a su función, puesto que en el interior de la placa encontramos gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) y metaloproteinasa 7 (MMP7) producidas por células del tejido conectivo, que producen la proteólisis de CCL7 <sup>(38)</sup> escindiéndola de su extremo N terminal que resulta fundamental para que active al receptor CCR2 <sup>(39)</sup> . El resultante de la degradación de CCL7 continúa uniéndose a CCR2 pero ya no induce flujo de calcio ni promueve la quimiotaxis, y en su lugar, actúa como quimioquina antagonista que modera la reacción inflamatoria. De esta manera, a diferencia de su acción agonista sistémica,

en el ambiente proinflamatorio de la placa de ateroma, el CCL7 actuaría como antagonista sobre el receptor CCR2 <sup>(38)</sup> .



**Figura 5. Respuesta del calcio intracelular a CCL7 fraccionado frente a CCL2 fraccionado.** Observamos la pérdida de la movilización del calcio intracelular por CCL7 fraccionado por gelatinasa A (28) y que no se produce en CCL2. Además, se ha observado en estudios in vivo en ratones que al inyectar CCL7 completo frente a CCL7 fraccionado por gelatinasa A, que el CCL7 completo, pero no el fraccionado, induce la infiltración mononuclear inflamatoria con degradación asociada de la matriz celular a las 18 horas <sup>(38)</sup> .

### **1.3 Evidencia sobre la intervención de CCR2 en el desarrollo de la aterosclerosis primaria.**

La evidencia experimental sobre la contribución de las quimioquinas en la aterosclerosis deriva de dos modelos de roedores con predisposición al desarrollo de aterosclerosis por hiperlipidemia severa causada por deficiencia en el receptor de LDL (LDLr -/-) o en la apolipoproteína E (apoE -/-).

Respecto a la evidencia publicada en cuanto a la intervención de CCR2 y sus ligados en la placa de ateroma encontramos que:

- CCL2 y CCR2 se expresan en las células que conforman la placa de ateroma: células endoteliales, células musculares lisas y macrófagos <sup>(40)</sup> .
- CCR2 es crucial en la formación de la lesión aterosclerótica y en la infiltración de los macrófagos <sup>(41)</sup> .
- La sobre-expresión de CCL2 en leucocitos de ratones dio como resultado el incremento del tamaño de la placa a través de un aumento del número de macrófagos y de la acumulación de lípidos <sup>(42,43)</sup> .
- Los ratones que carecen del receptor para CCL2 (CCR2) presentan defectos en la adhesión leucocitaria y de reclutamiento de monocitos <sup>(44)</sup> .
- Los ratones hipercolesterolémicos a los que se les provoca una delección en el gen de CCL2 son resistentes al efecto de una dieta rica en colesterol y tienen de forma marcada menos aterosclerosis <sup>(45,46,47)</sup> .
- De la misma forma, la delección genética del receptor CCR2 en ratones hiperlipidémicos, deficientes en ApoE, y alimentados con dieta rica en grasa también protege frente al desarrollo de lesiones ateroscleróticas alcanzándose una reducción de hasta el 85% en el tamaño de la placa además de producirse una reducción de la infiltración macrofágica <sup>(41,47-51)</sup> , lo cual corrobora la

importancia de CCR2 en las células monocíticas desde los estadios iniciales de desarrollo de la placa aterosclerótica.

Todos estos hallazgos se encuentran en relación con la hiperlipidemia, puesto que existe una clara asociación entre la intervención de CCL2-CCR2 y los niveles elevados de lipoproteínas de baja densidad (LDL), encontrándose un aumento de 2,4 veces de la expresión de CCR2 en monocitos aislados de pacientes con niveles altos de LDL (no se ha observado ninguna variación con los niveles de triglicéridos), frente a monocitos de controles normales y que los niveles de LDL actúan también aumentando la producción de CCL2 por las células musculares lisas <sup>(52)</sup>. Este efecto se ve revertido por niveles elevados de lipoproteínas de alta densidad (HDL) <sup>(42)</sup>.

En el caso de humanos, la evidencia publicada al respecto señala:

- Se ha observado una alta expresión de CCL2 en las placas ateroscleróticas humanas <sup>(53)</sup>.
- A pesar de que poco se sabe del papel que juegan los niveles de CCL2 en las enfermedades cardíacas en la población en general, niveles elevados de CCL2 se han asociado con un incremento del riesgo de desarrollar infarto miocárdico, muerte súbita, angioplastia coronaria y reestenosis de los stents <sup>(54)</sup>.
- También se ha observado que niveles elevados de CCL2 en plasma se asocian con factores de riesgo clásico en el desarrollo de la aterosclerosis, soportando la hipótesis de que el CCL2 podría modular algunos de estos factores en el desarrollo de la enfermedad <sup>(55,56)</sup>.
- Además de haberse encontrado en animales hipercolesterolémicos que la activación de CCL2-CCR2 induce la expresión de citoquinas proinflamatorias y metaloproteinasas acelerando el proceso aterosclerótico <sup>(40)</sup>, en células musculares lisas de arterias humanas se ha encontrado que su activación induce la expresión de factor tisular, reforzando la hipótesis de que CCL2 no solamente



contribuye a la inflamación vascular sino a la desestabilización de la placa y trombosis, que resulta en eventos coronarios agudos <sup>(40)</sup> .

- Se ha planteado que un polimorfismo frecuente en CCR2 (Val64Ile, sustitución de valina por isoleucina en posición 64) se asocia a menor calcificación coronaria objetivada por TAC coronario sugiriendo la intervención de CCR2 en la aterosclerosis humana<sup>(57)</sup>, si bien no parece haber acuerdo en estudios posteriores <sup>(58-60)</sup> .
- La evidencia del efecto de este polimorfismo en la función de CCR2 también proviene de estudios en HIV (CCR2 es necesario para la entrada del virus de la inmunodeficiencia humana en los linfocitos). En pacientes que presentan el polimorfismo Val64Ile y están infectados por HIV, presentaron una progresión a SIDA entre 2 y 4 años más tarde que los individuos sin él <sup>(61)</sup> .
- En CCL2 se han descrito otros polimorfismos como A2518 G y A2076T también con resultados no concluyentes <sup>(57,62-64)</sup> .

## 1.4 Evidencia de la intervención de CCR2 en la hiperplasia neointimal.

La hiperplasia neointimal es la causa de la reestenosis después del intervencionismo coronario percutáneo. Diversos estudios realizados con modelos de daño vascular a través de la colocación de un manguito periarterial o la erosión endotelial con un catéter, balón o implante de *stent*, muestran que también existe una reacción inflamatoria local con reclutamiento de monocitos que desencadena una respuesta inflamatoria crónica y más sostenida a través de la liberación de citoquinas y factores de crecimiento que aumentan el flujo de monocitos y la acumulación de células musculares lisas durante el crecimiento neointimal <sup>(18)</sup>. Esta infiltración de monocitos precisa de la intervención de CCR2-CCL2 además de su interacción con las plaquetas <sup>(65)</sup> :

- Se ha observado que ante una agresión vascular, existe una reacción inflamatoria que precede a la hiperplasia neointimal de los estadios tardíos, siendo este proceso de menor intensidad en los ratones que carecen de CCR2 <sup>(66)</sup> .
- Las carótidas de los ratones hipercolesterolémicos a las que se causa un daño con catéter presentan un pico de expresión de CCL2 en la pared del vaso a las 24 horas del daño, mientras que el pico de CCL2 sérico sólo se mantiene 6 horas <sup>(67)</sup> .
- Al administrar un inhibidor de CCR2 se observa una reducción de la respuesta inflamatoria (infiltración monocítica, expresión CCL2 y citoquinas inflamatorias) y de la hiperplasia neointimal posterior <sup>(66)</sup> .
- En ratones hipercolesterolémicos que carecen del receptor CCR2 (CCR2<sup>-/-</sup>; ApoE<sup>-/-</sup>), el área neointimal estaba reducida un 47% respecto a los que sí tenían CCR2 (CCR2<sup>+/+</sup>; ApoE<sup>-/-</sup>) <sup>(67)</sup> .
- La delección de CCR2 se asoció a una marcada reducción del contenido de macrófagos neointimales mientras que aumentaba el contenido en células musculares lisas <sup>(67,68)</sup> .

- También se ha estudiado la proliferación neointimal en los injertos venosos en varios modelos animales, en los que la presencia de un antagonista de CCR2 reduce de forma significativa el engrosamiento de injertos<sup>(22)</sup>. Aunque el mecanismo de esta reducción de la intima en injertos venosos permanece incierta, la inhibición de CCR2 reduce la hiperplasia intimal y el reclutamiento de macrófagos dependiente de CCR2 en injertos arteriales<sup>(69)</sup>.

Además, se han mostrado diferencias en función del mecanismo de agresión endotelial encontrándose que en una misma arteria se observa mayor implicación de CCL2 en el reclutamiento de los monocitos en la pared erosionada frente a la no lesionada en distintos segmentos de la misma arteria<sup>(67)</sup>. De esta forma, en estudios realizados con tinción con inmunofluorescencia se ha observado una alta concentración de CCL2 en las células musculares lisas y asociado a la superficie de las plaquetas adheridas a la superficie erosionada a las 24 horas de la lesión, mientras que no se encontraba CCL2 en regiones de endotelio inflamado no erosionado, en donde sí intervienen otras quimioquinas como GRO-/CXCL1 y CXCR2, dado que CCL2 induce la transmigración endotelial pero no el enganche de monocitos circulantes en las células endoteliales<sup>(67)</sup>.

Esta diferencia en el tejido erosionado frente al inflamado sin erosión proviene de que las células endoteliales carecen de una superficie para inmovilizar CCL2, lo cual es necesario para una adhesión estable inducida por quimioquinas, mientras que CCL2 sí se adhiere a las plaquetas que se acumulan en el lugar de la erosión endotelial y a las concentraciones a las que se libera en ese punto<sup>(69)</sup>.

Basalmente, las plaquetas no tienen CCL2, pero en las primeras horas tras una erosión de la pared endotelial, se genera un pico plasmático de CCL2 y aumento de su secreción local, tras lo cual sí encontramos CCL2 en la superficie de las plaquetas. Dado que las plaquetas no expresan CCR2, la unión se produce a través de proteoglicanos de la pared, un enlace con menor afinidad que el del receptor CCR2<sup>(67,70)</sup>. Esto implica que el CCL2 secretado localmente es retenido y presentado por

las plaquetas que se adhieren al lugar de la lesión <sup>(68)</sup> . Además, las plaquetas activadas pueden inducir la secreción de CCL2 por células musculares lisas, por lo que además de evitar que se disuelva en el torrente sanguíneo, se produce un *feed-back* positivo que aumenta la respuesta local <sup>(67)</sup> .

En resumen, la aterosclerosis es una patología inflamatoria crónica, en la que además de factores metabólicos y de agresión vascular, intervienen múltiples tipos celulares entre los que los monocitos juegan un papel esencial. Estas células actúan inducidos por niveles elevados de colesterol LDL en sangre iniciando la formación de la estructura de la placa de ateroma con su diferenciación a célula espumosa, desarrollan además sistemas de retroalimentación con otras células que potencian la reacción inflamatoria local y la hiperplasia celular y finalmente intervienen en la inestabilización de la placa promoviendo el crecimiento del núcleo necrótico con su muerte celular y el adelgazamiento de la cápsula fibrosa induciendo de la secreción de metaloproteinasas.

Aunque a través de un mecanismo diferente, también intervienen en el desarrollo de la hiperplasia neointimal que se produce tras una agresión vascular aguda como es el implante de un stent coronario, precisando en este caso de la intervención de las plaquetas y favoreciendo el crecimiento y la hiperplasia de las fibras musculares lisas. El sistema de CCR2 y sus ligandos juega un papel central en la atracción de los monocitos a la placa de ateroma actuando CCL2 como promotor y CCL7 escindido por proteasas de la placa de ateroma como inhibidor. Esta intervención se ha demostrado en modelos murinos y en humanos habiéndose encontrado diferentes polimorfismos que afectan a su función. El estudio la intervención del monocito y de su diapédesis dentro de la placa de ateroma abre una puerta a posibles aproximaciones terapéuticas para la aterosclerosis.

## 2. HIPÓTESIS.

- La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria en la que los monocitos juegan un papel central.
- El estudio del perfil clínico y analítico de los pacientes ingresados por cardiopatía isquémica puede aportar características concretas de la reacción inflamatoria según el tipo de evento que han sufrido y su impacto.
- El receptor para la quimiotaxis de los monocitos CCR2, y sus ligandos CCL2 y CCL7 constituyen un paso esencial para la entrada de estas células en la placa de ateroma y por tanto, para el desarrollo e inestabilización de la misma.
- El estudio de variantes genéticas en el sistema de CCR2-CCL2-CCL7 puede ayudar en el estudio de la cardiopatía isquémica con un componente hereditario importante, pudiendo constituir una base para la intensificación del control de los factores de riesgo cardiovascular o como posible diana terapéutica.

### **3. OBJETIVOS.**

1. Realizar un análisis descriptivo de los pacientes ingresados por un evento coronario, incluyendo los factores de riesgo cardiovascular clásicos, la características del evento y parámetros analíticos.
2. Realizar un seguimiento prospectivo de los pacientes considerando el reingreso, la causa del mismo y la mortalidad.
3. Estudiar la implicación de los monocitos en el desarrollo de un evento coronario agudo.
4. Búsquedas de polimorfismos en los genes que codifican para el receptor de la quimiotaxis del monocito CCR2 y sus ligandos CCL2 y CCL7.
5. Valorar la repercusión clínica y la funcionalidad, si fuera pertinente, de los cambios genéticos encontrados.

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS.**

Realizamos un estudio de casos y controles, prospectivo, en el que los casos fueron pacientes ingresados por un evento coronario en el Servicio de Cardiología del Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil entre el año 2006 y el 2012 mientras que los controles fueron extraídos de la base de datos del Estudio Telde <sup>(71)</sup> que es un estudio observacional en población general sana de entre 30 y 80 años y considerado como representativo del conjunto de la población de Gran Canaria.

Los criterios de inclusión fueron: (i) personas con edad comprendida entre los 25 y 90 años, (ii) con ingreso en el Servicio de Cardiología del Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil por un evento coronario, (iii) que aceptaran su inclusión en el estudio y que firmaran el consentimiento informado para la realización de estudios genéticos conforme a las guías éticas de la declaración de Helsinki de 1975 y aprobado por el Comité de Ética del Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil de Gran Canaria. Se excluyeron: (i) los pacientes en los que no se confirmara al alta el diagnóstico de evento coronario, (ii) que rechazaran su participación en el estudio o (iii) que presentaran una neoplasia activa o enfermedad inflamatoria conocida.

### **4.1 Recogida de datos clínicos y de laboratorio.**

Los datos fueron recogidos a partir del informe de alta hospitalaria y de la analítica extraída al ingreso en la planta de Cardiología. Se realizó un seguimiento de todos los pacientes en Junio de 2013 a través de la historia clínica electrónica y mediante entrevista telefónica con el paciente o su familia cuando fue necesario. Las variables fueron registradas en una base de datos en SPSS Statistics (IBM®, versión 20, Nueva York, USA), incluyéndose:

- Factores de riesgo cardiovascular.

Se registró la edad al ingreso en años, el sexo y los antecedentes familiares de cardiopatía isquémica precoz recogidos en la historia clínica y definidos como familiares de primer grado varones < 55 o mujeres < 65 años <sup>(72)</sup>. Se determinó el índice de masa corporal según la fórmula de Quetelet ( $IMC = \text{peso}/(\text{talla})^2$ ) <sup>(73)</sup>. Se clasificó al paciente como hipertenso si presentaba cifras de tensión arterial superiores a 140/90 mmHg en reposo o se encontraba bajo tratamiento con fármacos antihipertensivos. El diagnóstico de diabetes se estableció según los criterios de la ADA (American Diabetes Association) de 2014 (glucemia  $\geq 126$  mg/dl en ayunas,  $\geq 200$  mg/dl en el test de sobrecarga oral de glucosa, HbA1c  $\geq 6.5\%$  o  $\geq 200$  mg/dl en cualquier momento asociado a sintomatología cardinal de diabetes mellitus) o si tomaban previamente tratamiento antidiabético. En cuanto al tabaquismo se diferenció entre no fumador, fumador, y exfumador si habían pasado dos años desde el abandono del hábito tabáquico. Se clasificó como dislipémico según las cifras lipídicas en función del riesgo cardiovascular de acuerdo a las guías de dislipemia ATP III <sup>(74)</sup> o si tomaban previamente un tratamiento hipolipemiante.

- Descripción del evento coronario.

Los diagnósticos clínicos se codificaron como angina estable (AE), angina inestable (AI), infarto sin elevación del ST (IAMSEST) e infarto con elevación del ST (IAMCEST). Consideramos como angina estable aquella en la que los síntomas se desencadenaban solamente con los esfuerzos moderados y con un tiempo de evolución mayor a 2 meses. Se catalogó como angina inestable si el paciente presentaba progresión de los síntomas o si se inició en los últimos 2 meses, con o sin cambios dinámicos de la repolarización, pero sin presentar elevación de marcadores de necrosis miocárdica. El infarto sin elevación del ST (IAMSEST) se definió en los pacientes con síndrome coronario agudo sin objetivarse elevación persistente del ST y que realizaron curva de marcadores de necrosis miocárdica (troponina I). El infarto con elevación persistente del ST (IAMCEST) incluía a pacientes con síndrome coronario agudo y elevación del segmento ST en electrocardiograma durante más de



20 minutos ( $\geq 0.1$  mV en derivaciones que no fueran V1-V2, en las que el punto de corte es  $\geq 0.2$  mV en hombres mayores de 40 años;  $\geq 0.25$  mV en hombres menores de 40 años o  $\geq 0.15$  mV en mujeres) y desarrollo de curva de marcadores de necrosis miocárdica <sup>(75)</sup> .

La localización del infarto se definió por la alteración la repolarización en forma de ascenso del segmento del ST en el electrocardiograma de 12 derivaciones, siendo anterior si se registró en V1-V4, lateral en V5-V6, I y aVL e inferior en II, III y aVF. Se consideró no localizable en caso de no presentar elevación del segmento ST, de que tuviera QRS ancho por presencia de bloqueo de rama izquierda o por estimulación ventricular por marcapasos.

Por su parte, la clasificación de Killip-Kimball establece cuatro estadios en los que se correlaciona la clínica de insuficiencia cardíaca con el pronóstico del paciente <sup>(76)</sup> . Se clasificó como Killip I si el paciente no presentaba datos de insuficiencia cardíaca, Killip II si presentaba crepitantes bibasales, tercer tono cardíaco o aumento de la presión venosa yugular, Killip III si presentaba crepitantes por encima de campos medios o edema agudo de pulmón y Killip IV si se encontraba en situación shock cardiogénico, presión sistólica  $< 90$  mmHg y datos de hipoperfusión periférica.

En relación al tratamiento al ingreso, se catalogó como médico si el paciente recibía tratamiento con doble antiagregación y heparina; como fibrinólisis si al tratamiento previo se le sumaba la pauta de un fibrinolítico (tenecteplasa ajustada al peso según ficha técnica), angioplastia primaria si el tratamiento revascularizador del infarto agudo de miocardio era percutáneo (angioplastia con balón y/o implante de stent) y fibrinólisis + angioplastia de rescate si se administró la fibrinólisis y posteriormente el cateterismo urgente por no presentar criterios clínicos y electrocardiográficos de reperfusión.

Respecto a las características angiográficas, se registró el tipo de stent implantado (convencional o recubierto), número de vasos afectados o la extensión de la enfermedad coronaria definida por el hemodinamista según las características del angiograma (focal o difusa).

La función ventricular izquierda ventricular izquierda se determinó por el método de Simpson biplanar en apical 4 y 2 cámaras <sup>(77)</sup> en el ecocardiograma transtorácico realizado previo al alta (equipo Phillips® iE33, Koninklijke, Holanda).

También se registró la terapia final que se recibió de cara al alta hospitalaria definiéndose como tratamiento sólo farmacológico, percutáneo cuando se realizó revascularización mediante angioplastia/implante de stent o quirúrgico cuando se derivó a cirugía de revascularización coronaria. En cuanto al tratamiento farmacológico al alta se distinguió: ácido acetil salicílico 100 mg/24h, clopidogrel 75 mg/24h, acenocumarol o warfarina según controles del índice de coagulación normalizado recomendado (INR) , betabloqueantes (fundamentalmente bisoprolol 2,5-10 mg/24h, carvedilol 6,25-25 mg/12h y atenolol 50-100 mg/24h), inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs) (fundamentalmente ramipril 2.5-10 mg/24h, enalapril 5-20 mg/12h), antagonistas del receptor de la angiotensina tipo 2 (fundamentalmente losartan 12,5-100 mg/24h), estatinas (fundamentalmente atorvastatina 20-80 mg/24h, rosuvastatina 10-20 mg/24h, simvastatina 20-40 mg/24h), calcioantagonistas (amlodipino 5-10 mg/24h, nifedipino 30-60 mg/24h, diltiazem 90-240 mg/24h), espironolactona (25 -100 mg/24h), eplerenona (25-50 mg/24h) y nitratos (nitroglicerina en parche transdérmico 5-15 mg c/24h o mononitrato de isosorbida oral (20-40 mg dos veces al día).

- Determinación analítica.

Se realizó una extracción de muestra sanguínea en ayunas, el día del ingreso del paciente en el servicio de Cardiología, determinándose el hemograma con recuento celular, creatinina, ácido úrico, perfil metabólico (glucosa plasmática, hemoglobina glicosilada, insulina, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos y lipoproteína A), transaminasas (GPT, GOT), parámetros de inflamación incluyendo la velocidad de sedimentación glomerular (VSG) y la proteína C reactiva (PCR), homocisteína, fibrinógeno y parámetros de afectación miocárdica (NT-pro BNP y pico máximo de troponina I).

Se utilizó un analizador automático (AU 5800 de Beckman Coulter®, California, USA) para la determinación de parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos, GPT, GOT y PCR). La insulina plasmática se determinó en un UniCel ® Dxl 800 de Beckman Coulter®, California, USA. El NT-proBNP se obtuvo en un analizador Stratus de Dade Behring-Siemens®, Berlin, Alemania. La troponina I fue determinada en un equipo VIDAS® de bioMerieux®, Marcy-l'Étoile, Francia. Para la hemoglobina glicosilada se utilizó un ARXRAY Adams A1c HA-818V de Menarini®, Florencia, Italia. El hemograma se realizó con el autoanalizador UniCel ® DxH 800 de Beckman Coulter®, California, USA. La VSG se determinó en el Test 1TH de RAL®, Barcelona, España. El fibrinógeno se obtuvo en un ACLTOP 500 de Instrumentation Laboratory ®, Massachusetts, USA.

- Evolución clínica.

Se realizó un seguimiento de todos los pacientes en Junio de 2013 mediante la historia clínica electrónica o por contacto con el paciente o la familia por vía telefónica, quedando registrado además el tiempo de seguimiento. En caso de que el paciente presentara un reingreso, se inscribió también el diagnóstico clínico con la misma definición clínica que en el primer episodio (angina estable, angina inestable, infarto sin elevación del ST y con elevación del ST) añadiéndose además la muerte por causa cardiológica, insuficiencia cardíaca, arritmias ventriculares e ictus.

En los pacientes a los que se llevó a cabo un cateterismo cardíaco en el reingreso, registramos si la lesión causante del evento era una trombosis, reestenosis de stent previo o una lesión de novo.

Si el paciente había fallecido, también se tuvo en cuenta si la muerte fue de origen cardiológico dentro del hospital, si fue de causa cardiológica extrahospitalaria, si fue causada por complicaciones del tratamiento o si fue de origen no cardiológico.

## 4.2 Análisis estadístico.

Las variables se registraron en una base de datos en SPSS Statistics (IBM®, versión 20), distinguiéndose variables categóricas que se codificaron de forma numérica con valores nominales asignados y variables continuas según el valor específico con dos decimales. Las variables categóricas se expresaron como frecuencias y porcentajes y las variables continuas como medias y desviaciones standard (SD) cuando los datos siguieron una distribución normal o como media y rango intercuartil (percentil 25-75) cuando la distribución se salía de la normal. Se compararon los porcentajes utilizando el test de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ), las medias con t de Student y las medianas con el test de Wilcoxon para datos independientes. Con la finalidad de identificar los factores que tienen una asociación independiente con la enfermedad coronaria, se utilizó un análisis logístico multivariable en el que se incluyeron las variables que mostraron significación en los dos análisis univariantes. El análisis de varianza (ANOVA) de un factor se utilizó para comparar una variable cuantitativa en más de dos grupos.

También se incluyó en el análisis una variable que expresara interacción entre sexo y el alelo TT, lo cual permitió obtener asociación entre enfermedad coronaria y el alelo TT en hombres y mujeres separadamente. Se llevó a cabo una selección de las variables utilizando el método más adecuado y el criterio AIC <sup>(78)</sup>. Se exploraron los efectos no-lineales de las variables numéricas en la enfermedad coronaria por medio de modelos aditivos. El modelo resultante resume los valores de p y odds ratio ajustados para otros factores de riesgo, que fueron estimados usando intervalos de confianza del 95%. Se estableció que la asociación estadística fuera significativa cuando su valor p fuera inferior a 0,05.

### 4.3 Análisis genético.

Realizamos la extracción de DNA a partir de una muestra de sangre periférica (10 ml de sangre venosa periférica en tubo con EDTA como anticoagulante, conservada a 5°C) en todos los pacientes recogidos y previa firma de un consentimiento informado para la realización de estudios genéticos, de acuerdo a la declaración de Helsinki.

La extracción del DNA a partir de sangre periférica se realizó utilizando una variante del método de precipitación con sales descrito originalmente por Miller y cols<sup>(79)</sup>, tal y como se presenta en el producto comercial de extracción de DNA de sangre de QIAGEN® (Hilden, Alemania).

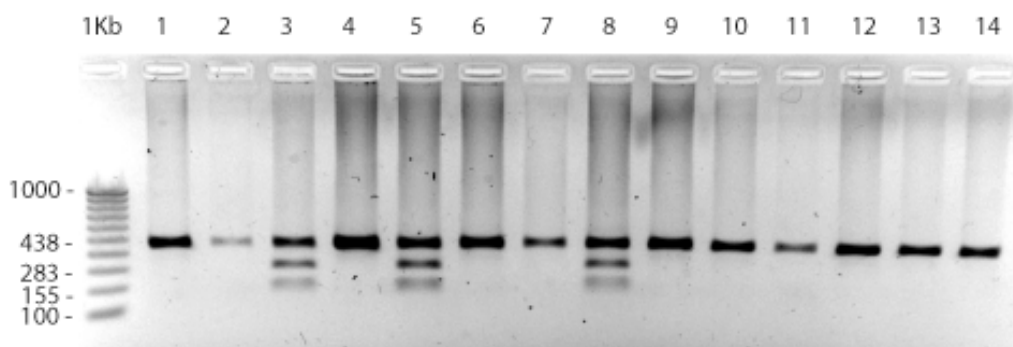
Para la búsqueda de variantes genéticas en el sistema del receptor CCR2 y los ligandos CCL7 y CCL2 se secuenciaron todos los exones y secuencias flanqueantes en la empresa Secugen® SL (Madrid, España) en un muestreo inicial con 70 pacientes y 30 controles sanos. Para el análisis de los resultados se utilizaron los programas Sequence Scanner V1.0 para Windows (Applied Biosystems®, California, USA) y/o 4Peaks para MacOS X (Nucleobytes Inc., Holanda), identificándose distintas variantes SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), que fueron contrastadas en la base de datos dbSNP alojada en el Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI<sup>80</sup>). En el informe para cada SNP ya encontrada previamente, se pueden encontrar las frecuencias alélicas de las variantes en el proyecto de los 1000 Genomas<sup>(81)</sup>.

Para detectar la variante rs17735770 se comprobó, en primer lugar, si la variante alteraba la secuencia de reconocimiento de alguna enzima de restricción. Para ello, se utilizó el programa WebCutter<sup>(82)</sup>.

Alelo silvestre            TTTATGTAA

Alelo mutante            TTTACGTAA

El cambio de T a C genera un sitio de restricción para la enzima *Sna*BI. Tras la identificación del cambio, se diseñaron oligonucleótidos cebadores para amplificar un fragmento que contuviera la variante utilizando el programa Primer3<sup>(83)</sup> y, posteriormente, se verificó la especificidad de los oligonucleótidos para amplificar exclusivamente, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la zona de interés utilizando el programa BLAST<sup>(84)</sup> contra el genoma humano de referencia GRCh37. El resultado de este análisis seleccionó a los cebadores CCL7\_B1\_1F (5'-CCCAGGCTGAACCCTCAAGGTG-3') y CCL7\_B1\_1R (5'-AGAAGGGAGGAGCATCCCACAGT-3'). Los cebadores anteriormente indicados fueron utilizados para amplificar la zona de interés del gen CCL7 humano en muestras de DNA genómico tal y como se ha descrito previamente<sup>(85)</sup>. Brevemente, 50 ng de ADN genómico se amplificaron mediante PCR en un termociclador siguiendo las recomendaciones del fabricante de la Taq polimerasa (Promega Biotech®, Madison, WI, EEUU). Tras 35 ciclos de amplificación (95 °C, 1 min; 55 °C, 1min; 72 °C, 1min) se obtuvo un fragmento de 438 pares de bases que, tras la digestión con *Sna*BI, produciría 2 fragmentos de 155 y 283 pares de bases en el caso de que la variante C estuviera presente, mientras que el alelo más frecuente (T) no se vería afectado. Para la obtención de los resultados del análisis, las reacciones de digestión se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en 1xTBE (89 mM Tris borate, 2 mM EDTA, pH 8.2) y el resultado se visualizó con luz ultravioleta ( $\lambda = 254$  nm) tras la tinción con bromuro de etidio. El resultado de uno de estos análisis se muestra en la figura 6.



**Figura 6. Detección de la variante rs17735770 mediante la técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism).** Se muestra el resultado de la resolución electroforética de un análisis de presencia de la variante en diferentes muestras. El procedimiento se explica en el texto. La calle de los marcadores (1Kb) muestra las longitudes de los fragmentos, en pares de bases (bp), obtenidos durante la PCR (438 bp) y tras la digestión con *Sna*BI (283 y 155 bp). El análisis indica que las muestras 3, 5 y 8 contienen un alelo silvestre y otro alelo portador de la variante rs17735770. La fotografía que se muestra es un negativo de la original.

## 4.4 Análisis bioinformático

La comparación de las secuencias de la región 3'UTR en mamíferos se realizó con el programa BLAST <sup>(84)</sup>.

Para detectar la presencia de secuencias potencialmente reguladoras en la zona que contiene la variante rs17735770, se sometió al escrutinio de la aplicación TargetScanHuman® v. 5.1 <sup>(86)</sup> tal y como se presenta en el UCSC Genome Browser <sup>(87)</sup>. Las secuencias reconocidas por miRNAs son identificadas utilizando fragmentos de siete nucleótidos de todas las familias de miRNAs conocidas en mamíferos y buscadas en todos los extremos 3'UTR de todos los transcritos RefSeq y CDS anotados en NCBI. Las regiones 3' fueron escrutadas para identificar secuencias conservadas <sup>(88)</sup> y se les asignó un valor (de 0 a 100) de acuerdo a su contexto <sup>(89)</sup>.

Para evaluar si una variante, presente un el mRNA en una zona no codificante, supone un cambio en la estructura del RNA, utilizamos el algoritmo SNPfold <sup>(90)</sup>, que evalúa la consecuencia estructural de la sustitución calculando un coeficiente entre tener el tipo silvestre o la sustitución en una posición determinada. Cuanto menor es la correlación, mayor es el cambio estructural predicho.

## 5. RESULTADOS.

### 5.1 Descripción de la población estudiada.

Recogimos un total de 519 casos ingresados en el Servicio de Cardiología del Complejo Universitario Insular-Materno Infantil de Gran Canaria y 771 controles de población general.

Con la finalidad de hacer un análisis descriptivo de la población estudiada buscamos diferencias desde 3 puntos de vista: se compararon los datos en función de la presencia de enfermedad cardiovascular (casos frente a controles), se realizó un análisis descriptivo del tipo de evento y manejo clínico durante el ingreso en los casos y finalmente se compararon los casos en función del sexo (hombres frente a mujeres).

Comparando casos frente a controles (datos mostrados en la tabla 1), observamos que no hubo diferencias significativas en cuanto al índice de masa corporal (controles:  $28.3 \pm 5.1 \text{ kg/m}^2$  vs casos  $29.5 \pm 5.4 \text{ kg/m}^2$ ,  $p = 0.980$ ) pero, como era de esperar, los casos fueron más frecuentemente hombres (72.4% vs. 45.5%,  $p < 0.001$ ), mayores ( $61.4 \pm 12.2$  años vs.  $48.4 \pm 12.1$  años  $p < 0.001$ ), fumadores (41.4% vs 24.4%,  $p < 0.001$ ), hipertensos (65.7% vs. 23.6%,  $p < 0.001$ ), diabéticos (40.3%, vs 27.5%,  $p < 0.001$ ), dislipémicos (50.48% vs. 17.9%,  $p < 0.001$ ), con cardiopatía isquémica previa (28.5% vs. 4.5%,  $p < 0.001$ ) y con niveles más altos de triglicéridos (casos: 131 mg/dl, controles 106 mg/dl,  $p < 0,001$ ). Llamativamente encontramos cifras de colesterol total (controles:  $212.1 \pm 40.1 \text{ mg/dl}$  vs casos:  $163.5 \pm 44.5 \text{ mg/dl}$ ,  $p < 0.001$ ) y LDL ( $132.3 \pm 35.9 \text{ mg/dl}$  vs.  $93.3 \pm 34.6 \text{ mg/dl}$ ,  $p < 0.001$ ) más bajas entre los casos, lo cual lo atribuimos a que en fase aguda de un infarto está descrito un importante descenso de las concentraciones lipídicas observadas en sangre <sup>(91)</sup> y a que prácticamente a todos los casos (95.1% vs. 16.9%) se les administraba tratamiento con estatinas durante el ingreso independientemente de las cifras de lípidos que tuvieran.



**Tabla 1.**

	Controles N = 771	Casos N = 519	P
Edad, años	48.4 ± 12.1	61.4 ± 12.2	<0.001
Hombres / Mujeres, %	45.5 / 54.5	72.4 / 27.6	< 0.001
IMC, Kg/m <sup>2</sup>	28.3±5.1	29.5±5.4	0.980
Tabaquismo, n (%)			< 0.001
No fumador	471 (61.1)	198 (38.2)	
Ex-fumador	112 (14.5)	106 (20.4)	
Fumador actual	188 (24.4)	215 (41.4)	
Hipertensión arterial, n (%)	182 (23.6)	341 (65.7)	< 0.001
Diabetes mellitus, n (%)	212 (27.5)	209 (40.3)	< 0.001
Antecedente de dislipemia, n (%)	138 (17.9)	262 (50.48)	< 0.001
Antecedentes personales de Cardiopatía isquémica, n (%)	35 (4.5)	148 (28.5)	<0.001
Colesterol total, mg/dL	212.1 ± 40.1	163.5 ± 44.5	< 0.001
Colesterol LDL, mg/dL	132.3 ± 35.9	93.3 ± 34.6	< 0.001
Triglicéridos, mg/dL	106 (76 ; 149)	131 (100 ; 169)	< 0.001
Estatinas, n (%)	130 (16.9)	481 (95.1)	< 0.001
Leucocitos x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	7.25 (6.10 ; 8.55)	8.60 (7.00 ; 10.4)	0.291

**Tabla 1. Perfil de riesgo cardiovascular de los pacientes estudiados frente a los controles.** Observamos que los casos son mayormente hombres, con más edad y con mayor frecuencia de los factores de riesgo cardiovascular clásicos. Destaca que presentan niveles más bajos de colesterol total y LDL al ingreso, lo cual se expone en la discusión, siendo atribuido a la reducción de los niveles de LDL colesterol en la fase aguda de un evento coronario agudo y a que prácticamente todos los pacientes estaban tratados con estatinas independientemente de las cifras de lípidos.

IMC: índice de masa corporal (kg/m<sup>2</sup>). LDL: low density lipoprotein cholesterol (mg/dl).

Los datos son frecuencias (%), medias ± desviación standard y medianas y cuartiles (25-75%)

Separamos los casos en función del diagnóstico al ingreso, desglosados en angina estable (AE), angina inestable (AI), infarto sin elevación del ST (IAMSEST) y e infarto con elevación del ST (IAMCEST), destacando que los pacientes con infarto transmural eran los más jóvenes ( $59.3 \pm 12.8$  años) y que los que sufrían un infarto sin elevación del ST eran los mayores ( $64.1 \pm 12$  años) ( $p < 0.001$ ). La patología coronaria aguda, especialmente el infarto con elevación del ST encuentra una relación significativa con el hábito tabáquico (50.3% eran fumadores activos,  $p = 0.009$ ) existiendo un descenso progresivo en el número de fumadores en infarto sin elevación del ST (38.3%), angina inestable (34.6%) y angina estable (22.2%) ( $p = 0.009$ ). Los pacientes con IAMCEST también tuvieron más frecuente niveles de HDL bajo (HDL  $< 35$  mg/dl) (IAMCEST: 81.2%, IAMSEST: 71.7%, AI: 72.3%, AE: 70%) aunque en este caso las diferencias no fueron significativas ( $p = 0.224$ ). Por el contrario la patología coronaria que implica un desarrollo más progresivo de las lesiones ateroscleróticas (angina e infarto sin elevación del ST) encuentra relación significativa con la presencia de diabetes (IAMSEST: 49.1%, AI: 42%, AE: 48.1%, vs. IAMCEST: 28.9%,  $p < 0.001$ ), hipertensión arterial (IAMSEST: 72.4%, AI: 74.1%, AE: 81.5%, vs. IAMCEST: 52.8% IAMCEST,  $p < 0.001$ ), niveles elevados de colesterol total (angina estable:  $171.5 \pm 41.3$  mg/dl, angina inestable:  $177.8 \pm 50.3$  mg/dl, IAMSEST:  $160.1 \pm 39.3$  mg/dl, IAMCEST:  $160.6 \pm 47.0$  mg/dl,  $p = 0.017$ ), LDL Colesterol (AE: 98.5 (74.7 ; 120) mg/dl, AI: 96.7 (71.7 ; 123) mg/dl, IAMSEST: 89.5 (71.8 ; 106) mg/dl, IAMCEST: 84.4 (63.6 ; 116) mg/dl,  $p = 0.213$ ) y triglicéridos (AE: 136 (112 ; 185) mg/dl, AI: 155 (123 ; 198) mg/dl, IAMSEST: 126 (107 ; 161) mg/dl, IAMCEST: 121 (91 ; 164) mg/dl ,  $p = 0.001$ ).

El porcentaje de pacientes con disfunción sistólica de ventrículo izquierdo (FEVI  $< 40\%$ ) fue mayor en el infarto con el elevación del ST (IAMCEST 27.1%, IAMSEST: 17%, AI: 14.1, AE: 10%,  $p < 0.001$ ) lo cual se correspondió con un mayor número de pacientes en insuficiencia cardíaca, definida por clase killip-kimball al ingreso de III-IV, que es factor determinante en el pronóstico ya previamente establecido<sup>(93)</sup>. En el infarto transmural, la enfermedad coronaria fue principalmente monovaso (51.2%) y focal (77.8%) mientras que el resto de diagnósticos tendían a tener más enfermedad multivaso (AE: 64.4%, AI: 57.4%, IASEST: 63.9%.  $p = 0.002$ ) y

difusa. La localización más frecuente de la isquemia en el infarto intramural fue la inferior (53.7%)

En cuanto a la estrategia terapéutica al alta (ver tabla 3), el tratamiento fue principalmente mediante implante de stents (IAMCEST 82.3%, IAMSEST 66.1%, AI: 61.5%, AE 43.3%,  $p < 0.001$ ). La cirugía de bypass coronario se llevó a cabo principalmente en la patología coronaria más crónica (AE: 13.3%, AI: 11.5%, IAMSEST: 10.1% vs IAMCEST: 2.9%,  $p < 0.001$ ). El tratamiento farmacológico se realizó de acuerdo a las guías de práctica clínica vigentes, destacando un mayor porcentaje de pacientes con IECA y fármacos antialdosterónicos entre los pacientes con infarto con elevación del ST (el IECA fue utilizado en AE: 23.3%, AI: 39.7%, IAMSEST: 54.6%, IAMCEST: 66.5%,  $p < 0.001$ ; antialdosterónicos: AE: 6.7%, AI: 3.8%, IAMSEST: 9.2%, IAMCEST: 19.2%,  $p = 0.002$ ) de acuerdo a la mayor cantidad de pacientes con disfunción ventricular izquierda.

**Tabla 2.**

	AE N= 30	AI N = 78	IAMSEST N = 218	SCACEST (N = 203)	
Edad, años	62.3 ± 10.5	61.4 ± 10.3	64.1 ± 12.1	59.3 ± 12.8	0.001
Hombres / Mujeres, %	85.2 / 14.8	67.9 / 32.1	71.5 / 28.5	73.6 / 26.4	0.353
Tabaquismo, n (%)					0.009
No fumador	15 (55.6)	30 (37.0)	83 (38.8)	20 (35.5)	
Ex-fumador	6 (22.2)	23 (28.4)	49 (22.9)	28 (14.2)	
Fumador actual	6 (22.2)	28 (34.6)	82 (38.3)	99 (50.3)	
Hipertensión arterial, n (%)	22 (81.5)	60 (74.1)	155 (72.4)	104 (52.8)	< 0.001
Glucemia, mg/dL	109 (96 ; 155)	109 (91 ; 162)	112 (94 ; 155)	104 (92 ; 141)	0.328
Diabetes mellitus, n (%)	13 (48.1)	34 (42.0)	105 (49.1)	57 (28.9)	< 0.001
Colesterol total, mg/dL	171.5 ± 41.3	177.8 ± 50.3	160.1 ± 39.3	160.6 ± 47.0	0.017
Colesterol LDL, mg/dL	98.5 (74.7 ; 120)	96.7 (71.7 ; 123)	89.5 (71.8 ; 106)	84.4 (63.6 ; 116)	0.213
Bajo HDL, n (%)	14 (70.0)	47 (72.3)	129 (71.7)	112 (81.2)	0.224
Triglicéridos, mg/dL	136 (112 ; 185)	155 (123 ; 198)	126 (107 ; 161)	121 (91 ; 164)	0.001
Lipoproteína A, mg/dL	34 (20 ; 61)	37 (13 ; 70)	32 (12 ; 60)	33 (14 ; 54)	0.775
Insulinemia, mcU/mL	8.10 (4.61 ; 18.2)	9.40 (6.37 ; 16.9)	7.45 (5.34 ; 11.7)	7.19 (5.15 ; 10.2)	0.077
HbA1C%	5.6 (5.4 ; 5.6)	5.7 (5.4 ; 6.5)	6.0 (5.6 ; 7.5)	5.8 (5.5 ; 6.5)	0.170
Uso de estatinas, n (%)	20 (76.99)	74 (94.9)	201 (96.2)	186 (96.4)	< 0.001
Creatinina, mg/dL	1.05 (0.93 ; 1.27)	0.98 (0.91 ; 1.16)	1.04 (0.92 ; 1.29)	1.03 (0.92 ; 1.18)	0.222
FEVI<40%, n (%)	3 (10)	11 (14.1)	37 (17)	55 (27.1)	<0.001
Clase killip al ingreso, n (%)					0.002
I	27 (90)	71 (91)	185 (84.9)	166 (81.8)	
II	1 (1.3)	4 (5.1)	12 (5.5)	12 (5.9)	
III	2 (6.7)	2 (2.6)	15 (6.9)	15 (7.4)	
IV	0 (0)	1 (1.3)	5 (2.3)	10 (4.9)	
Número de vasos, n (%)					0.002
0 vasos	5 (17.9)	9 (12)	12 (5.8)	9 (4.4)	
1 vaso	5 (17.9)	23 (30.7)	63 (30.3)	104 (51.2)	
2 vasos	5 (17.9)	20 (26.7)	55 (26.4)	45 (22.2)	
3 vasos	8 (28.6)	15 (20)	60 (28.8)	29 (14.3)	
TCI	5 (17.9)	8 (10.7)	18 (8.7)	7 (3.4)	
Localización n (%)					<0.001
No localizable	30 (100)	75 (96.2)	185 (84.9)	2 (1)	
Anterior	0 (0)	1 (1.3)	15 (6.9)	81 (39.9)	
Lateral	0 (0)	1 (1.3)	0 (0)	11 (5.4)	
Inferior	0 (0)	1 (1.3)	18 (8.3)	109 (53.7)	
Características de la placa, n (%)					<0.001
Focal	15 (65.2)	47 (70.1)	134 (66.7)	158 (77.8)	
Difusa	8 (34.8)	20 (29.9)	67 (33.3)	30 (14.8)	

**Tabla 2. Descripción de los casos según el diagnóstico al ingreso.** Los pacientes con infarto transmural (IAMCEST) son los más jóvenes y los que presentaron un infarto sin elevación del ST los mayores. El IAMCEST encuentra una relación significativa con el hábito tabáquico existiendo un descenso progresivo en el número de fumadores en IAMSEST, angina inestable y angina estable. El HDL bajo también es más frecuente en el IAMCEST aunque estas diferencias no son significativas. Por el contrario la patología coronaria más crónica (IAMSEST y angina) se relaciona con la presencia de diabetes, hipertensión arterial, niveles elevados de colesterol total, LDL y triglicéridos. Los pacientes con IAMCEST tuvieron mayor porcentaje de disfunción ventricular izquierda, y por tanto, una peor clase killip al ingreso. En el IAMCEST, la enfermedad coronaria fue principalmente monovaso y focal aumentando el porcentaje de mientras que en el resto.

AE: angina estable. AI: Angina inestable. IAMSEST: Infarto sin elevación del ST. IAMCEST: Infarto con elevación del ST. Clasificación Killip-kimball: I: sin datos clínicos de insuficiencia cardíaca, II: crepitantes bibasales, tercer tono cardíaco o aumento de la presión venosa yugular, III: crepitantes por encima de campos medios o edema agudo de pulmón, IV: shock cardiogénico, presión sistólica <90 mmHg y datos de hipoperfusión periférica. Bajo HDL: HDL < 35 mg/dl. Los datos son medias (± SD), medianas (IQR) o frecuencias

**Tabla 3.**

	AE N = 29	AI N = 75	IAMSEST N=216	IAMCEST N= 203	
Tratamiento recibido al alta:					<0.001
Sólo farmacológico	13 (43.3)	21 (26.9)	52 (23.9)	30 (14.8)	
Implante de stent	13 (43.3)	48 (61.5)	144 (66.1)	167 (82.3)	
Cirugía de bypass	4 (13.3)	9 (11.5)	22 (10.1)	6 (2.9)	
Tratamiento farmacológico al alta					
Aspirina	25 (83.3)	67 (85.9)	200 (91.7)	192 (94.3)	0.018
Clopidogrel	16 (53.3)	55 (66.7)	172 (78.9)	169 (83.3)	<0.001
Betabloqueante	26 (86.7)	67 (85.9)	189 (86.7)	178 (87.7)	0.962
IECA	7 (23.3)	31 (39.7)	119 (54.6)	135 (66.5)	<0.001
ARA-II	9 (30)	21 (26.9)	48 (22)	28 (13.8)	0.024
Estatinas	22 (73.3)	72 (92.3)	204 (93.6)	191 (94.1)	<0.001
Anticoagulantes orales	2 (6.7)	8 (10.3)	25 (11.5)	11 (5.4)	0.132
Calcioantagonistas	83 (28)	21 (26.9)	62 (28.4)	26 (12.8)	<0.001
Antialdosteronicos	2 (6.7)	3 (3.8)	20 (9.2)	39 (19.2)	0.002
Nitratos	9 (30)	16 (20.5)	55 (25.2)	16 (7.9)	<0.001

**Tabla 3. Comparación entre el tratamiento recibido al alta según el diagnóstico del ingreso.** Se realiza una descripción del tratamiento recibido al alta hospitalaria siendo la más frecuente en todos los grupos el implante de stent y se describe el tratamiento médico prescrito al alta hospitalaria.

AE: angina estable. AI: Angina inestable. IAMSEST: infarto sin elevación del ST. IAMCEST: infarto con elevación persistente del ST. IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. ARA-II: antagonistas del receptor de la angiotensina II. Los datos son frecuencias, n (%)

Dado que la terapia de reperfusión urgente se lleva a cabo solamente en el infarto con elevación del ST, comparamos nuestros datos con el registro español MASCARA (Manejo Actualizado del Síndrome Coronario Agudo. Registro Actualizado <sup>92</sup>) y del EHC.ACS III (European Heart Survey. Acute coronary síndrome III <sup>94</sup>) (ver tabla 4). El porcentaje de pacientes a los que se realizó una terapia de reperfusión urgente fue similar en los 3 estudios, si bien en nuestro caso hay una mayor cantidad de pacientes que recibieron fibrinólisis puesto que en el Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil no existe programa de angioplastia primaria las 24 horas.

**Tabla 4.**

Tratamiento recibido al ingreso	IAMCEST. N = 202, % (N).	MASCARA (2004-2005) IAMCEST N = 3034	EHS.ACS III 2006-2008 IAMCEST N= 7655
Sin terapia de reperfusión urgente	69 (34)	970 (32)	2442 (31.9)
Fibrinólisis	61 (30)	1304 (43)	1014 (13.2)
Fibrinólisis y angioplastia de rescate	36 (17.7)		337 (4.4)
Angioplastia primaria	36 (17.7)	785 (25)	3862 (59.6)

**Tabla 4. Comparación de la terapia de reperfusión urgente recibida en los pacientes con infarto con elevación del ST de nuestro estudio frente los del registro MASCARA<sup>92</sup> y EHS.ACS III<sup>94</sup>.** Dada la imposibilidad para comparar los datos de la reperfusión urgente con el resto diagnósticos sindrómicos, se analizan en esta tabla los datos de nuestro estudio con el registro español MASCARA (Manejo Actualizado del Síndrome Coronario Agudo. Registro Actualizado) y del EHC. ACS III (European Heart Survey. Acute coronary síndrome III). El porcentaje de pacientes a los que se realizó una terapia de reperfusión urgente fue similar en los 3 estudios, si bien en nuestro caso hay una mayor cantidad de pacientes que recibieron fibrinólisis puesto que en el Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil no existe programa de angioplastia primaria las 24 horas

El tiempo de seguimiento medio (ver tabla 5) fue de  $3.3 \pm 2.2$  años, durante el cual reingresó un 23.1% de los pacientes, siendo el diagnóstico más frecuente el mismo que el del ingreso inicial ( $p = 0.036$ ). En cuanto a la lesión objetivada en el reingreso, la más frecuente fue la progresión de la enfermedad coronaria en la arteria no tratada (lesión de novo). La trombosis de stent fue más frecuente en los pacientes con infarto con y sin elevación del ST (IAMCEST 2%, IAMSEST 1.8%, AI: 1.3%, AE: 0%) y la reestenosis en los pacientes con angina (IAMSEST: 2.5%, IAMSEST: 2.3%, AI: 7.7%, AE: 3.3%), siendo las diferencias encontradas no significativas dado el escaso número de eventos. Durante el desarrollo del estudio (2006-2013) falleció un 19.5% de los pacientes, destacando que la mortalidad en IAMCEST es principalmente intrahospitalaria (4.4%) y las debida a IAMSEST es más frecuentemente extrahospitalaria (6.4%) aunque estas diferencias tampoco son significativas.

**Tabla 5.**

	AE N = 30	AI N = 78	IAMSEST N = 218	IAMCEST N = 203	p
Tiempo medio de seguimiento (años)	3.78 ± 1.99	3.6 ± 2.23	3.06 ± 2.13	3.39±2.39	
Motivo de reingreso (N =120, 23.1% del total de pacientes válidos)					0.036
Angina estable	3 (10)	2 (2.6)	7 (3.2)	4 (2)	
Angina inestable	0	10 (12.8)	8 (3.7)	6 (3)	
IAMSEST	2 (6.7)	6 (7.7)	21 (9.6)	7 (3.4)	
IAMCEST	0	2 (2.6)	1 (0.5)	9 (4.4)	
Insuficiencia cardíaca	2 (6.7)	5 (6.4)	15 (6.9)	5 (2.5)	
Arritmia ventricular	0	0	1 (0.5)	0	
Ictus	0	1 (1.3)	2 (0.9)	3 (1.5)	
Lesión objetivada en el reingreso					0.630
Trombosis de stent	0	1 (1.3)	4 (1.8)	4 (2)	
Reestenosis de stent	1 (3.3)	6 (7.7)	5 (2.3)	5 (2.5)	
Lesión de novo	4 (13.3)	8 (10.3)	13 (6)	13 (6.4)	
Otro	0	3 (3.8)	9 (4.1)	4 (2)	
Exitus total, n (%)	3 (11.5)	14 (17.7)	41 (19.5)	28 (14.9)	0.553
Fallecidos al final del seguimiento 2006-2013 (N = 88, 19.5% del total de pacientes validos, 504)					0.946
Cardíaca intrahospitalaria	1 (3.3)	4 (5.1)	10 (4.6)	9 (4.4)	
Cardíaca extrahospitalaria	0	4 (5.1)	14 (6.4)	7 (3.4)	
Iatrogenia	0	0	1 (0.5)	3 (1.5)	
No cardiológica	2 (6.7)	6 (7.7)	16 (7.3)	9 (4.4)	

**Tabla 5. Evolución clínica y mortalidad según el tipo de evento al ingreso**

Durante el seguimiento obtuvimos un 23.1% de reingreso siendo el motivo más frecuente el mismo que en ingreso inicial. La lesión más frecuentemente objetivada en la coronariografía fue la progresión de la enfermedad coronaria en la arteria no tratada (lesión de novo). La trombosis de stent fue más frecuente en los pacientes con infarto (con y sin elevación del ST) y la reestenosis en los pacientes con angina, siendo las diferencias encontradas no significativas. Durante el desarrollo del estudio (2006-2013), falleció un 19.5% de los pacientes, destacando que la mortalidad en IAMCEST es principalmente intrahospitalaria y las debida a IAMSEST es más frecuente extrahospitalaria aunque las diferencias encontradas no son significativas.

AE: angina estable. AI: angina inestable. IAMSEST: infarto sin elevación del ST. IAMCEST: infarto con elevación del ST. Los datos son frecuencias, n (%) y media ± desviación estándar,

Respecto al análisis por sexos (ver detalles en tablas 6, 7 y 8), destaca que las mujeres son mayores (67 (56; 76) años vs. 59 (50; 70) años,  $p < 0.001$ ), más diabéticas (53% vs. 35.3%  $p = 0.001$ ) e hipertensas (79% vs. 60.6%,  $p < 0.001$ ) mientras que los hombres son más fumadores (50.8% vs. 16.8%,  $p < 0.001$ ) como se puede ser de forma gráfica en la figura 1. No se obtuvieron diferencias en cuanto a los antecedentes familiares, el diagnóstico previo de enfermedad cardiovascular (cardiopatía isquémica o vasculopatía cerebral) ni de dislipemia. El tipo de evento clínico del ingreso, la localización de la isquemia y la clasificación Killip-Kimball en la admisión en urgencias fueron similares en ambos sexos (tabla 7) a pesar de lo cual, las mujeres recibieron más frecuentemente manejo conservador con tratamiento sólo farmacológico al alta respecto a los varones (33.5% vs. 16%,  $p < 0.001$ , ver figura 2), concordante con la presencia de mayor enfermedad difusa en la coronariografía que presentaba el sexo femenino (32% vs 24%,  $p = 0.09$ ). Además, las mujeres tendían a recibir más tratamiento con stents recubiertos (64.5% vs. 48.6%,  $p = 0.002$ ) de acuerdo también con la mayor tasa de diabetes. No hubo diferencias significativas en cuanto a la fracción de eyección al alta.

En cuanto a las diferencias obtenidas en el motivo de reingreso (no significativas) (tabla 8), los varones tienden a reingresar más por todas las causas (angina estable, angina inestable, infarto transmural, insuficiencia cardíaca, arritmia o ictus) excepto por infarto sin elevación del ST, siendo en este grupo más frecuentes las mujeres (8.4% vs 6.4%,  $p = 0.763$ ). No hubo diferencias significativas en cuanto a la presencia de reestenosis o trombosis de stent (reestenosis de stent: 3.5% en varones vs. 2.8% en mujeres y trombosis de stent: 1.6% en varones vs. 2.1% en mujeres,  $p = 0.870$ ) ni en las causas de mortalidad (cardíaca extrahospitalaria en varones 3.9%, en mujeres 6.3% y cardíaca intrahospitalaria en varones 4.5%, en mujeres 5.6%,  $p = 0.567$ ).

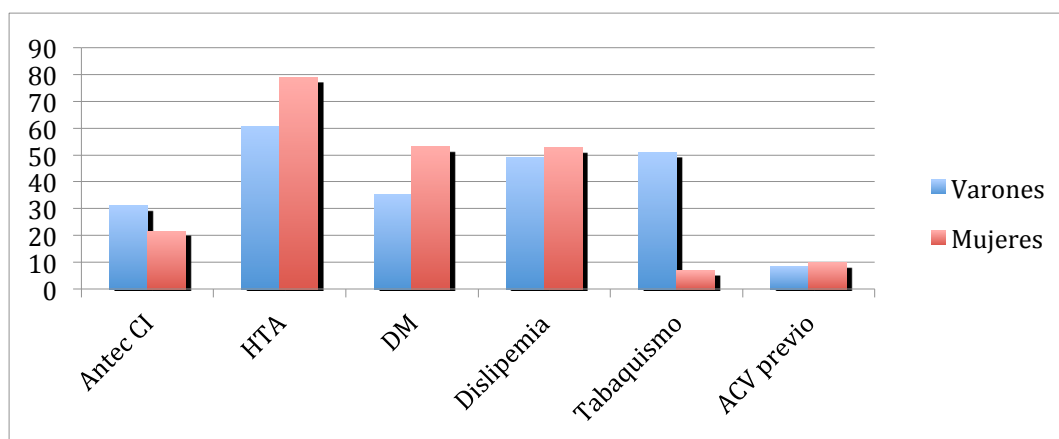


**Tabla 6.**

Datos demográficos	Hombres (376)	Mujeres (143)	p
Edad (años)	59 (50; 70)	67 (56; 76)	<0.001
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	29.82 ± 3.8	28.78 ± 8.3	
Antecedentes familiares, n (%)	35 (9.3)	18 (12.6)	0.270
Antecedentes de cardiopatía isquémica, n (%)	117 (31)	31 (21.6)	0.083
Hipertensión arterial, n (%)	228 (60.6)	113 (79)	<0.001
Diabetes mellitus, n (%)	133 (35.3)	76 (53)	0.001
Dislipemia, n (%)	185 (49.2)	77 (52.8)	0.344
Tabaquismo, n (%)	191 (50.8)	24 (16.8)	<0.001
Consumo de cocaína, n (%)	8 (2.1)	1 (0.7)	0.345
Cirugía previa de bypass coronario, n (%)	1 (0,2)	0 (0)	0.656
ACV previo, n (%)	32 (8.5)	14 (9.8)	0.747

**Tabla 6. Datos demográficos y factores de riesgo cardiovascular clasificados por sexos en los casos.** Observamos que las mujeres tienen un debut más tardío y que son más frecuentemente diabéticas e hipertensas. La dislipemia está presente en ambos grupos por igual y los hombres son más frecuentemente fumadores. ACV: accidente cerebrovascular.<sup>3</sup> Los datos son frecuencias (%), medias ± desviación estándar y mediana con intervalo intercuartílico (25;75).

**Figura 7.** Presencia de factores de riesgo cardiovascular por sexos.



**Tabla 7.**

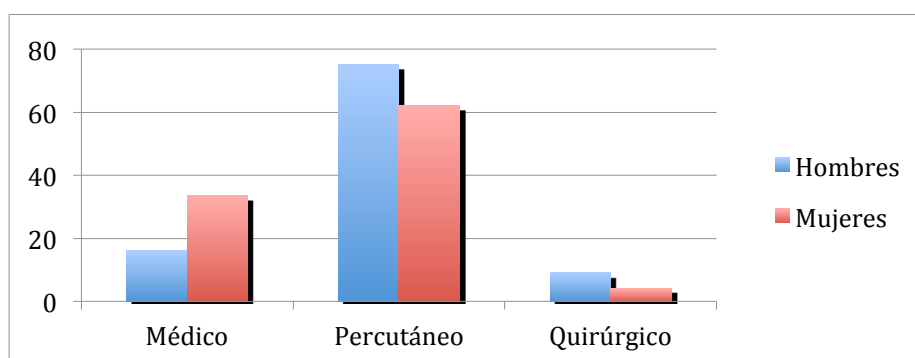
Datos clínicos	Hombres (376)	Mujeres (143)	p
Tipo de evento, n (%)			0.353
Angina estable	23 (6.1)	4 (2.8)	
Angina inestable	55 (14.6)	26 (18.2)	
IAMSEST	153 (40.7)	61 (42.6)	
IAMCEST	145 (38.5)	52 (36.3)	
Localización, n (%)			0.148
No localizable	206 (54.7)	79 (55.2)	
Anterior	64 (17)	34 (23.7)	
Lateral	9 (2.5)	1 (0.7)	
Inferior	97 (25.8)	29 (20.3)	
Killip al ingreso hospitalario, n (%)			0.933
I	321 (85)	120 (84)	
II	19 (5)	9 (6.3)	
III	24 (6.4)	10 (7)	
IV	12 (3.2)	4 (2.8)	
Tratamiento al ingreso dentro de los pacientes con IAMCEST, n (%)			0.200
Sin terapia de reperfusión urgente	46 (31.5)	21 (40.4)	
Fibrinólisis	47 (32.2)	12 (23.1)	
Fibrinólisis + ACTP rescate.	30 (20.5)	6 (11.5)	
Angioplastia primaria (ACTP)	23 (15.8)	13 (25)	
Tratamiento al alta, n (%)			<0.001
Solamente farmacológico	60 (16)	48 (33.5)	
Implante de stent coronario	282 (75)	89 (62)	
Cirugía de revascularización coronaria	34 (9)	6 (4.2)	

**Tabla 7. Perfil del evento de ingreso definido por el diagnóstico, su localización, clase killip-kimball al ingreso y tratamiento recibido en el momento del ingreso y previo al alta, analizados por sexos.** No se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al diagnóstico al ingreso, localización de la isquemia o insuficiencia cardíaca al ingreso. Destaca que al alta las mujeres recibieron más frecuentemente tratamiento sólo farmacológico y en los hombres fueron tratados con stent o cirugía de bypass más frecuentemente.

IAMSEST: Infarto sin elevación del ST. IAMCEST: Infarto con elevación del ST. Clasificación Killip-kimball al ingreso (I: sin datos clínicos de insuficiencia cardíaca, II: crepitantes bibasales, tercer tono cardíaco o aumento de la presión venosa yugular, III: crepitantes por encima de campos medios o edema agudo de pulmón, IV: shock cardiogénico, presión sistólica <90 mmHg y datos de hipoperfusión periférica). ACTP: angioplastia coronaria transluminal percutánea.

Los datos son frecuencias n, (%).

**Figura 8.** Porcentaje de tratamiento recibido al alta hospitalaria: médico, percutáneo o quirúrgico. Diagrama de columnas agrupadas.



**Tabla 8.**

	Hombres (376)	Mujeres (143)	p
Causa del reingreso			0.763
Angina estable, n (%)	13 (3)	3 (2,1)	
Angina inestable, n (%)	19 (5)	5 (3,5)	
IAMSEST, n (%)	24 (6,4)	12 (8,4)	
IAMCEST, n (%)	9 (2,4)	3 (2,1)	
Insuficiencia cardíaca, n (%)	21 (5,6)	6 (4,2)	
Arritmias ventriculares, n (%)	2 (0,5)	0 (0)	
ACV, n (%)	5 (1)	1 (0,7)	
Lesión objetivada en el reingreso.			0.870
Reestenosis de stent, n (%)	13 (3,5)	4 (2,8)	
Trombosis de stent, n (%)	6 (1,6)	3 (2,1)	
Lesión de novo, n (%)	30 (8)	8 (5,6)	
Otro, n (%)	11 (2,9)	5 (3,5)	
Mortalidad. Causas.			0.567
Cardíaca extrahospitalaria, n (%)	15 (3,9)	9 (6,3)	
Cardíaca intrahospitalaria, n (%)	17 (4,5)	8 (5,6)	
Iatrogenia, n (%)	3 (0,8)	1 (0,7)	
No cardíaca, n (%)	27 (7,18)	6 (1,6)	

**Tabla 8. Evolución clínica tras el alta hospitalaria, clasificada por sexos.** No se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a las causas de reingreso y mortalidad en ambos grupos.

IAMSEST: Infarto sin elevación del ST. IAMCEST: Infarto con elevación del ST. ACV: accidente cerebrovascular. Los datos son frecuencias (%).

## 5.2 El tipo de evento cardiológico influye en la respuesta inflamatoria.

Cuando comparamos los parámetros de respuesta inflamatoria (ver tabla 9) en función del evento coronario agudo que se trate (leucocitos totales, recuento de monocitos, PCR y fibrinógeno), observamos se encuentran en niveles similares en la angina estable e inestable, presentando un aumento progresivo en los pacientes con infarto sin elevación del ST y que es máximo en los pacientes con infarto con elevación del ST en los que existe un mayor daño tisular con elevación de troponina correspondiente. En la figura 9 podemos ver de forma gráfica este aumento progresivo del número de monocitos en función del tipo de evento.

**Tabla 9.**

	Angina		IAM		P
	Estable N = 27	Inestable N = 81	IAMSEST N = 214	IAMCEST N = 197	
Hemoglobina, g/dL	13.6 (13.1 ; 14.3)	13.8 (12.5 ; 15.0)	13.1 (12.0 ; 14.4)	13.2 (11.6 ; 14.4)	0.025
Leucocitos x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	7.4 (6.1 ; 8.3)	7.8 (5.9 ; 9.9)	8.4 (7.2 ; 10.0)	9.6 (7.4 ; 11.0)	< 0.001
Monocitos	0.6 (0.5 , 0.89)	0.6 (0.5 , 0.79)	0.7 (0.6 ; 0.9)	0.8 (0.6 ; 1.0)	< 0.001
Plaquetas x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	202 (167 ; 246)	221 (187 ; 256)	225 (186 ; 277)	255 (204 ; 314)	< 0.001
Fibrinógeno, gr/L	4.10 (3.54 ; 5.04)	3.82 (3.45 ; 4.22)	3.95 (3.54 ; 4.54)	4.79 (4.15 ; 5.35)	< 0.001
PCR, mg/L	0.60 (0.20 ; 2.14)	0.48 (0.20 ; 1.40)	1.39 (0.50 ; 3.61)	2.89 (1.50 ; 7.00)	< 0.001
Troponina > 0.1, n (%)	0	11 (13.4)	192 (96.0)	163 (97.0)	< 0.001

**Tabla 9. Parámetros analíticos y de inflamación según el tipo de evento.** Los parámetros de respuesta inflamatoria (leucocitos totales, recuento de monocitos, PCR, y fibrinógeno) se encuentran progresivamente aumentados en infarto con elevación del ST y sin elevación del ST respecto a los pacientes con angina.

LDL: Low density lipoprotein (mg/dl), HDL: High density lipoprotein, HDL bajo: < 35 md/dl, Fibrinógeno, medido por método de Clauss (gr/L). Los datos son medias ( $\pm$  SD), medianas (IQR) o frecuencias (%)

Figura 9.

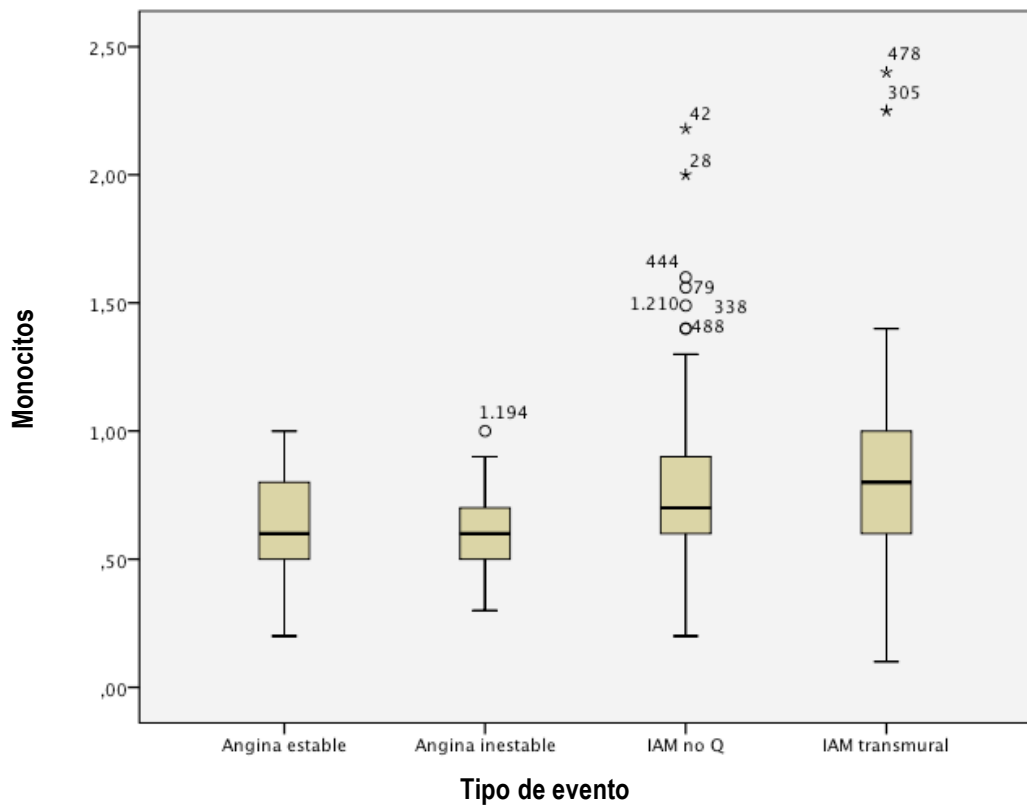


Figura 9. Diagrama de cajas simples del número de monocitos en función del tipo de evento coronario.

Podemos ver de forma gráfica el aumento progresivo del número de monocitos en función del tipo de evento.

Además, en la tabla 10 comparamos los controles sanos frente a los casos agrupados en pacientes con angina estable o inestable (sin elevación de marcadores de necrosis miocárdica) y a los que habían sufrido un infarto tanto con elevación del ST como sin elevación del ST (agrupados por tanto como pacientes con elevación de marcadores de necrosis miocárdica). Observamos un incremento significativo del recuento total de leucocitos en los pacientes infarto, en los que existía un daño tisular (8.9 (7.3 ; 10.6) leucocitos/ml) frente a los que no (controles: 7.5 (6.1 ; 8.5) leucocitos/ml, y pacientes con angina: 7.5 (5.9 ; 9.4) leucocitos /ml,  $p < 0.001$ ), siendo esta diferencia a expensas del aumento de los monocitos circulantes, mientras que en los pacientes con angina permanecen en valores similares (angina: 0.60 (0.50 ; 0.70) monocitos/ml, controles: 0.55 (0.40 ; 0.70) monocitos/ml, infarto (0.71 (0.60 ; 0.90),  $p < 0.001$ ). No se objetivaron diferencias en los niveles de hemoglobina y plaquetas y sí un incremento progresivo en los niveles de PCR y fibrinógeno en los controles frente a angina y a infarto (PCR en controles: 0.34 (0.32 ; 0.5) mg/dl, en angina: 0.47 (0.2 ;

1.52) mg/dl, en IAM 2.15 (0.78 ; 4.42) mg/dl,  $p < 0.001$ ; fibrinógeno en controles: 3.15 (2.76 ; 3.63) gr/L, en angina: 3.90 (3.47 ; 4.35) gr/L, en IAM: 4.29 (3.72 ; 4.95) gr/L,  $p < 0.001$ ).

En la figura 10 realizamos un diagrama de cajas simples con el número de monocitos, observándose de forma gráfica que los monocitos en la angina, es decir, con isquemia pero sin necrosis tisular presentaban niveles similares de monocitos que los controles, aumentándose de forma importante en los pacientes que tenían un infarto con desarrollo de necrosis tisular.

Realizamos también un gráfico de dispersión en la figura 11 agrupando niveles de PCR y recuento de monocitos en el que se puede ver un claro aumento de estos dos parámetros de forma simultánea en los casos de infarto frente a los que no habían presentado necrosis tisular, lo cual señala la intervención del sistema inflamatorio en este proceso.

**Tabla 10.**

	Controles	Angina	IAM	P
Leucocitos x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	N = 23 7.5 (6.1 ; 8.5)	N = 101 7.5 (5.9 ; 9.4)	N = 376 8.9 (7.3 ; 10.6)	< 0.001
Monocitos	N = 16 0.55 (0.40 ; 0.70)	N = 52 0.60 (0.50 ; 0.70)	N = 225 0.71 (0.60 ; 0.90)	< 0.001
Plaquetas x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	N = 23 221 (184 ; 248)	N = 103 217 (180 ; 255)	N = 380 237 (191 ; 292)	0.011
Hemoglobina, g/dL	N = 23 13.3 (12.5 ; 14.6)	N = 100 13.8 (12.6 ; 15.0)	N = 379 13.1 (11.7 ; 14.4)	0.019
Fibrinógeno	N = 750 3.15 (2.76 ; 3.63)	N = 46 3.90 (3.47 ; 4.35)	N = 183 4.29 (3.72 ; 4.95)	< 0.001
PCR	N = 752 0.34 (0.32 ; 0.50)	N = 68 0.47 (0.20 ; 1.52)	N = 272 2.15 (0.78 ; 4.42)	< 0.001
Troponina	N = 21 0.01 (0.01 ; 0.01)	N = 112 0.01 (0.01 ; 0.01)	N = 368 3.24 (0.85 ; 11.1)	< 0.001

**Tabla 10. Enfermedad cardiovascular, monocitos e inflamación.** Observamos un incremento significativo del recuento total de leucocitos en los pacientes infarto frente a los controles y pacientes con angina (sin necrosis tisular), siendo esta diferencia a expensas del aumento progresivo de los monocitos en angina frente a controles e infarto. No se objetivaron diferencias en los niveles de hemoglobina y plaquetas y sí un incremento progresivo en los niveles de PCR y fibrinógeno en los controles frente a angina y a infarto.

Angina incluye angina estable e inestable e IAM incluye infarto sin elevación del ST y con elevación del ST.

Los datos son medianas (IQR) y frecuencias (%). Para cada variable y grupo se indica el número de sujetos evaluados

Figura 10.

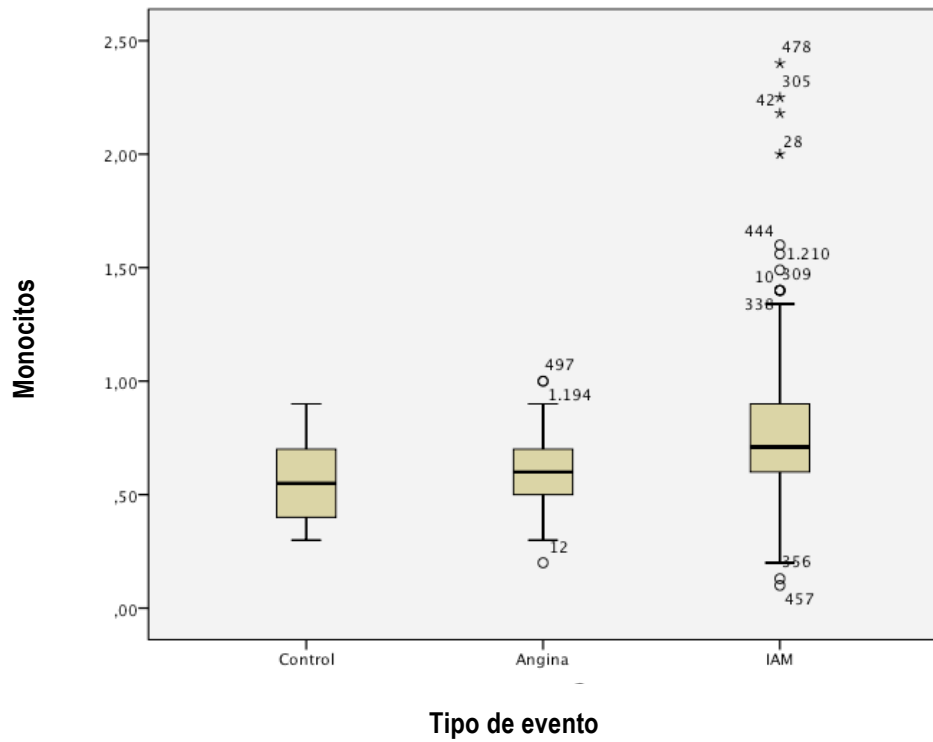


Figura 10. Diagrama de cajas simples del número de monocitos en controles frente a pacientes con angina o infarto.

Figura 11.

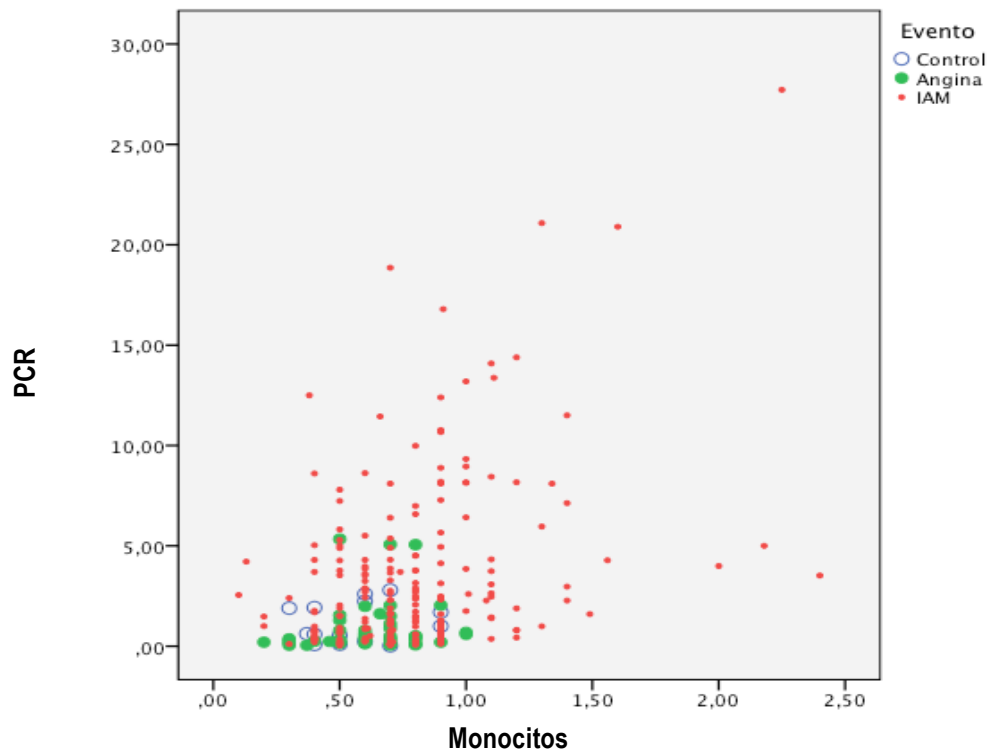


Figura 11. Grafico de dispersión del número de monocitos y valor de la PCR en función del tipo de evento.



### **5.3 Búsqueda de variantes genéticas en los genes CCR2, CCL2 y CCL7.**

La inflamación en general, y los monocitos/macrófagos en particular, tienen un papel central en el desarrollo de la aterosclerosis. Los receptores de quimiocinas son importantes en la regulación de la función de los monocitos, destacando el papel del receptor de quimiocinas CCR2 en el desarrollo de la aterosclerosis. Por ello, nos planteamos el estudio de variantes genéticas que pudieran afectar tanto a este receptor como a sus principales ligandos (CCL2 y CCL7) y la posibilidad de que representaran un factor de riesgo adicional para el desarrollo de la enfermedad cardiovascular.

Con la finalidad de buscar variantes genéticas en estos tres genes, secuenciamos los exones y las secuencias flanqueantes a partir del DNA genómico de 70 casos y 30 controles sanos <sup>(71)</sup> utilizando el método bidireccional de Sanger <sup>(95)</sup>. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 11.

Como se puede observar, la mayoría de las variantes se detectaron en el gen CCR2, 16 en total, y tres de las cuales no se habían descrito en las bases de datos públicas con fecha de septiembre de 2015. En la región del exón 1-5'UTR encontramos rs3749461 (A/G, 3:46353822), rs3092964 (G/A, 3:46354094) y rs3918376 (T/C 3:463541249). En el intrón encontramos: rs 140800049 (G/T, 3:46354226) y rs3918361 (G/A, 3:46354295). En el exón 2-ORF encontramos rs3918367 (G/T, 3:46357683), rs1799864 (G/A, 3:46357717) y rs3918386 (A/G, 3:46359752). En el exón 2-3'UTR encontramos rs140253702 (A/G 3:46360115), rs743660 (G/A, 3:46360527) y rs34138562 (T(G, 3:46360562). En la zona downstream sólo encontramos rs11575062 (A/T 3:46360940).

Encontramos también otra variante que está documentada en la base de datos de NCBI pero tiene muy poca información asociada ya que se ha encontrado en muy baja frecuencia o se ha secuenciado en muy pocas genomas: rs36225401 (3:46354020) en la región del exón 1-5'UTR.

Además, se han encontrado otras 3 SNPs de CCR2 no descritas en GenBank <sup>(96)</sup> y que no afectan a regiones codificantes: T/C en localización 3:46354176, T/C en localización 3:46354213 y –C/TGT en posición 3:46360034.

En la secuenciación de CCL2/MCP1 encontramos tan sólo 2 variantes asociadas a las secuencias codificantes y zonas flanqueantes del gen CCL2: rs4586 (T/C, 17:34256250) en la región ORF y rs13900 (C/T 17:34256892) en 3'UTR. Ambas son muy frecuentes en heterocigosis en la población general, y se han encontrado en un gran número de cromosomas representando a todas las razas. Ninguna de ellas afecta a la zona codificante.

Respecto a CCL7 encontramos cuatro variantes en el gen de CCL7 sobre las que hay muy pocos datos en NCBI y de las que ninguna afecta a la zona codificante: rs9901581 (C/T 17:34271039), rs70937036 (G/A, 17:34271319), rs16969398 (A/G, 17:34271356) y rs17735770 (T/C, 17:34271923).

Entre todas estas variantes, destaca la rs17735770 localizada en la región no traducida 3'UTR del exón 3 del gen CCL7 en donde la timina es sustituida por citosina (C/T o CC) estando presente en 2 de los casos (2,8%) y en 6 controles sanos (20,7%) ( $p= 0.003$ ). Si bien esta SNP se encuentra en una región no traducida, la región UTR sí que tiene gran importancia en la regulación de la expresión génica, por lo que nos planteamos la posibilidad de que tenga un papel protector en cuanto a la presencia de cardiopatía isquémica. Dadas estas diferencias, ampliamos el estudio analizando únicamente la presencia de la SNP rs17735770 de CCL7 en el resto de los 519 pacientes con enfermedad cardiovascular (angina o infarto) y 771 controles sanos.

**Tabla 11.**

Gen	Localización <sup>a</sup>	Alelos <sup>b</sup>	SNP ID <sup>c</sup>	Zona <sup>d</sup>	Efecto codificante <sup>e</sup>	MAF Global <sup>f</sup>	Casos (N=70) <sup>g</sup>			Controles (N=30)			p
							Ref	Het	Hom	Ref	Het	Hom	
CCR2	3:46353822	A/G	rs3749461	Exon1 - 5'UTR		G=0.0683/342	46	7	0	14	6	1	0,071
	3:46354020	-/T	rs36225401			ND	52	16	1	21	8	0	0,739
	3:46354094	G/A	rs3092964			G=0.1947/975	4	29	16	1	7	13	0,07
	3:46354124	T/C	rs3918376			C=0.0044/22	66	3	0	28	1	0	0,837
	3:46354176	T/C	nueva			ND	48	1	0	21	0	0	0,510
	3:46354213	T/C	nueva			ND	68	1	0	29	0	0	0,515
	3:46354226	G/T	rs140800049	Intron		T=0.0010/5	49	1	0	21	0	0	0,514
	3:46354295	G/A	rs3918361			A=0.1947/975	1	48	4	0	20	0	0,363
	3:46357683	G/T	rs3918367	Exon2 - ORF	NP_001116513.2:p.V52	T=0.0036/18	69	1	0	29	0	0	0,518
	3:46357717	G/A	rs1799864		NP_001116513.2:p.V64I	A=0.1538/770	61	8	1	22	7	0	0,233
	3:46359752	A/G	rs3918386		NP_001116513.2:p.P339	G=0.0711/356	65	5	0	29	0	0	0,140
	3:46360034	--C/TGT	nueva	Exon 2 - 3'UTR		ND	69	1	0	29	0	0	0,518
	3:46360115	A/G	rs140253702			G=0.0034/17	68	1	0	28	1	0	0,523
	3:46360527	G/A	rs743660			A=0.1949/976	23	44	3	18	10	1	0,026
	3:46360562	T/G	rs34138562			G=0.1667/835	62	8	0	22	7	0	0,108
3:46360940	A/T	rs11575062	Downstream		T=0.0683/342	61	9	0	21	7	1	0,102	
CCL2	17:34256250	T/C	rs4586	ORF	NP_002973.1:p.C35	T=0.4577/2292	23	44	3	18	9	3	0,015
	17:34256892	C/T	rs13900	3'UTR		T=0.3632/1819	43	26	1	22	6	1	0,249
CCL7	17:34271039	C/T	rs9901581	Intron		T=0.0549/275	69	1	0	29	0	0	0,525
	17:34271319	G/A	rs70937036			A=0.0044/22	68	2	0	29	0	0	0,366
	17:34271356	A/G	rs16969398			G=0.0070/35	70	0	0	27	1	0	0,112
	17:34271923	T/C	rs17735770	3'UTR		C=0.0156/78	68	2	0	23	6	0	0,003

**Tabla 11. Variantes genéticas encontradas en los genes CCR2, CCL2 y CCL7.**

Los exones y las zonas flanqueantes de los genes CCR2, CCL2 y CCL7 fueron secuenciados totalmente, en ambas direcciones, en 70 casos y 30 controles utilizando la técnica de Sanger. La selección y asignación de casos y controles se explica en el texto. **(a)** La localización de la variante es de acuerdo al genoma de referencia GRCh38.p2 (cromosoma:número de bases). **(b)** Alelos posibles en cada posición (alelo presente en el genoma de referencia / variante). **(c)** Identidad de la variante en la base de datos dbSNP<sup>(80)</sup>. **(d)** Zona del gen en la que se encuentra la variante; ORF: *Open Reading Frame* (secuencia codificante); 5'UTR: Región no traducida del extremo 5' del RNA mensajero (mRNA); 3'UTR: Región no traducida del extremo 3' del mRNA; Downstream: Más allá del extremo 3'. No forma parte del mRNA. **(e)** Se detalla la secuencia del péptido de referencia de GenBank<sup>(96)</sup> y la variante generada en el caso de que algún cambio afecte a la zona codificante: NP\_001116513.2:p.V64I significa que en la secuencia NP\_001116513.2 se produce un cambio en el aminoácido en posición 64 de Valina a Isoleucina. Si solo aparece un aminoácido es que la variante no resulta en un cambio de aminoácido. **(f)** Frecuencia alélica media (MAF: *Medium Allele Frequency*), tal y como aparece en dbSNP y proveniente de diversas fuentes, principalmente del proyecto HapMap (referencia) y del proyecto de los 1000 genomas (referencia). **(g)** Contaje de los individuos detectados en casos y controles para cada uno de los genotipos posibles: Ref (número de individuos homocigotos para el alelo de referencia); Het (individuos con variante en heterocigosis con el alelo de referencia); Hom (individuos homocigotos para la variante).

## 5.4 Repercusión de la SNP rs17735770 de CCL7.

Comparando a los individuos que presentaban ambos alelos T (TT, N = 1165) frente al cambio de la T por C (CT/CC, N = 125), no encontramos diferencias significativas entre ambas poblaciones en cuanto a edad, factores de riesgo cardiovascular ni recuento celular (ver tabla 12), con lo que podemos asumir que se trata de muestras homogéneas.

Con el mayor tamaño muestral (casos: 519, controles: 771), vemos que se minimiza la diferencia en la presencia de la SNP rs17735770 de CCL7 en los controles frente a los casos (controles: 10.9% vs. casos: 7.9%,  $p=0.075$ ). Tampoco se encontraron diferencias significativas de la SNP analizándola por sexos ni diagnóstico de ingreso (ver tabla 13).

Estudiamos la evolución de estos pacientes en función de la presencia de la SNP rs17735770 (tabla 14). Las diferencias obtenidas en cuanto a la presencia de reingreso hospitalario, con mayor frecuencia en el grupo con el alelo C (CT/CC: 31.8%, TT: 21.1%) no fueron significativas ( $p=0.101$ ) y el motivo del mismo tampoco, si bien los pacientes con el alelo C tenían una mayor incidencia de angina (CT/CC: AE: 21.4%, AI: 28.6% vs TT: AE: 12.1%, AI: 17.8%), sin elevación de marcadores de necrosis miocárdica, frente al grupo con el alelo T, que tenía más frecuentemente IAMSEST e IAMCEST (CT/CC: AE: IAMSEST 14.3%, IAMCEST: 7.1% vs TT: IAMSEST: 30.8%, IAMCEST: 9.3%) ( $p=0.49$ ). La lesión causante de este reingreso fue más frecuentemente una lesión de novo en ambos grupos, siendo la trombosis y la reestenosis más frecuentes en el grupo TT (trombosis 7.5% vs 0%, reestenosis 15% vs 7.1%,  $p=0.119$ ). Estos datos, aunque no son significativos, podrían sugerir un papel del alelo TT en la inestabilidad de la placa de ateroma.

Las tasas de mortalidad global fueron similares en ambos grupos (CT/CC: 15.9%, TT: 16.3%,  $p=0.938$ ) si bien el alelo TT tuvo una mortalidad de origen cardiológico (englobando intra y extrahospitalaria) que superó el doble de la que presentaban los pacientes con el alelo C/T (C/T: 4.5% vs TT: 9.5%,  $p= 0.274$ )

aunque esta diferencia no fue significativa dado el escaso número de eventos registrados.

**Tabla 12:**

	TT N = 1165	CT/CC N = 125	P
Edad, años	54.1 ± 13.4	53.8 ± 15.1	0.835
IMC, kg/m <sup>2</sup>	28.3 ± 5.0	28.9 ± 5.9	0.369
Hipertensión arterial, n (%)	476 (40.9)	47 (37.6)	0.481
Diabetes mellitus, n (%)	376 (32.3)	45 (36.0)	0.399
Glucemia, mg/dL	95 (86 ; 115)	94 (85 ; 114)	0.856
HbA1C%	5.2 (4.8 ; 5.7)	5.0 (4.7 ; 5.4)	0.100
Colesterol total, mg/dL	192.7 ± 48.4	199.5 ± 44.0	0.149
Colesterol LDL, mg/dL	118.5 ± 40.1	123.0 ± 38.8	0.253
HDL bajo, n (%)	424 (40.5)	41 (36.9)	0.348
Triglicéridos, mg/dL	117 (85 ; 157)	115 (80 ; 163)	0.897
Hemoglobina, g/dL	13.4 (12.0 ; 14.6)	12.9 (12.0 ; 14.0)	0.338
Leucocitos x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	8.5 (6.9 ; 10.4)	8.4 (6.9 ; 9.6)	0.707
Neutrófilos	5.0 (3.8 ; 6.5)	4.5 (3.7 ; 6.4)	0.830
Eosinófilos	0.2 (0.1 ; 0.3)	0.2 (0.1 ; 0.2)	0.762
Monocitos	0.7 (0.5 ; 0.9)	0.7 (0.6 ; 0.8)	0.903
Linfocitos	1.9 (1.6 ; 2.4)	1.8 ; 1.5 ; 2.4)	0.716

**Tabla 12. Diferencias demográficas y analíticas de las variables CT/CC frente a TT del CCL7 (Rs17735770).** No encontramos diferencias significativas entre ambas poblaciones en cuanto a edad, factores de riesgo cardiovascular ni recuento celular. Los datos son medias (± SD), medianas (IQR) o frecuencias (%)

**Tabla 13.**

	TT (%)	CT/CC (%)	p
Casos frente a controles totales			0.075
Controles N = 771	687 (89.1)	84 (10.9)	
Casos N = 519	478 (92.1)	41 (7.9)	
Diferencias por sexo dentro de los casos			0.325
Hombres N = 376	349 (93)	27 (7)	
Mujeres N = 143	129 (90)	14 (10)	
Diferencias según el diagnóstico del ingreso			0.458
Angina Estable N = 27	25 (92.6)	2 (7.4)	
Angina Inestable N = 81	74 (91.4)	7 (8.6)	
Infarto No Q N = 214	193 (90.2)	21 (9.8)	
Infarto Transmural N = 197	186 (94.4)	11 (5.6)	
Diferencias entre controles, evento isquémico sin daño tisular (angina) y con daño tisular (IAM)			0.207
Controles N = 762	679 (89.1)	83 (10.9)	
Angina N = 116	106 (91.4)	10 (8.6)	
IAM N = 412	380 (92.2)	32 (7.8)	

**Tabla 13. Presencia del alelo T o C de la SNP Rs17735770 de CCL7 en casos vs controles, según el sexo, según características del evento.** No se observan diferencias significativas por casos/controles, sexo ni evento del ingreso.

Los datos son frecuencias N (%).

**Tabla 14:**

	TT	CT/CC	p
<b>Reingreso</b>	107 (21.1)	14 (31.8)	0.101
Motivo de reingreso	N = 107	N= 14	0.49
Angina estable	13 (12.1)	3 (21.4)	
Angina inestable	19 (17.8)	4 (28.6)	
Infarto sin elevación del ST	33 (30.8)	2 (14.3)	
Infarto con elevación del ST	10 (9.3)	1 (7.1)	
Insuficiencia cardíaca	25 (23.4)	2 (14.3)	
Arritmia ventricular	2 (1.9)	0 (0)	
Ictus	4 (3.7)	2 (14.3)	
Lesión causante del reingreso			0.119
Trombosis	8 (7.5)	0 (0)	
Reestenosis	16 (15)	1 (7.1)	
Lesión de novo	29 (27.1)	8 (57.1)	
Otro	16 (15)	0 (0)	
<b>Mortalidad</b>			
Mortalidad por cualquier causa	81 (16.3)	7 (15.9)	0.938
Mortalidad desglosada:			0.482
No fallecido	414 (83.6)	37 (84.1)	
Mortalidad Cardíaca intrahospitalaria	23 (4.6)	1 (2.3)	
Mortalidad Cardíaca extrahospitalaria	24 (4.8)	1 (2.3)	
Mortalidad por complicaciones del tratamiento	5 (1)	0 (0)	
Mortalidad no cardiológica	29 (5.85)	5 (11.5)	
Mortalidad Cardíaca intra o extrahospitalaria	47 (9.5)	2 (4.5)	0.274

**Tabla 14. Datos evolutivos en función del alelo T o C de la SNP Rs17735770 de CCL7 .** No se obtuvieron diferencias significativas, si bien se observa que el grupo de pacientes con el alelo C tienen una tasa mayor de reingreso fundamentalmente a expensas de angina (estable e inestable), si bien la mortalidad de origen cardiológico es menor. No se observó ningún caso de trombosis de stent en el grupo con el alelo C.

Los datos son frecuencias, n (%).

## 5.5 Análisis de casos jóvenes frente a controles jóvenes.

Dado que los factores de riesgo cardiovascular tienen más peso en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica en edades avanzadas y que la carga genética es más importantes en los casos más precoces, decidimos seleccionar a los sujetos jóvenes (varones  $\leq 58$  años,  $n=429$  vs. mujeres  $\leq 65$  años,  $n=425$ ) quedando incluidos en este subestudio 854 individuos de los cuales 222 eran casos y 632 controles.

Encontramos que los casos eran mayores (controles:  $45.0 \pm 8.9$  vs. casos  $50.3 \pm 6.8$  años,  $p<0.001$ ), predominantemente hombres (controles: 41,8% vs casos: 74,3%,  $p<0.001$ ), fumadores (controles 25.6% vs. casos: 60.4%  $p<0.001$ ), hipertensos (controles: 17.4% vs. casos: 47.3%,  $p<0.001$ ), con niveles bajos de HDL (controles: 71.9% vs. casos: 20.7%,  $p<0.001$ ) y elevados de triglicéridos (casos: 140 (113 ; 183) mg/dl vs. controles: 102 (72 ; 148) mg/dl,  $p<0.001$ ). Destaca, al igual que en el estudio de la población completa, que los casos tenían niveles más bajos de LDL, atribuidos al tratamiento con estatinas a dosis alta independientemente de los niveles de LDL. Además presentaban niveles más elevados de parámetros de reacción inflamatoria como PCR (controles: 0.34 (0.32 ; 0.52) mg/l vs. casos: 1.22 (0.35 ; 2.92) mg/l.  $p<0.001$ ), leucocitos (controles  $7.55 (6.85 ; 8.85) \times 10^3 /\text{mm}^3$  vs. casos:  $9.50 (7.4 ; 10.9) \times 10^3 /\text{mm}^3$ ,  $p= 0.018$ ) y fibrinógeno (controles: 3.1 (2.7 ; 3.6) vs. casos: 4.2 (3.5 ; 5.0);  $p<0.001$ ) como era de esperar. En este caso el cambio del alelo T por C (TT frente a CT/CC) sí alcanzó la significación estadística siendo más frecuente TT en los casos (casos: 95% vs controles: 89.6%) y CT/CC en los controles (controles: 10.4% vs. casos: 5%,  $p=0.014$ ), como se puede observar de forma gráfica en la figura 12, sugiriendo una función protectora al cambio de la base nitrogenada.



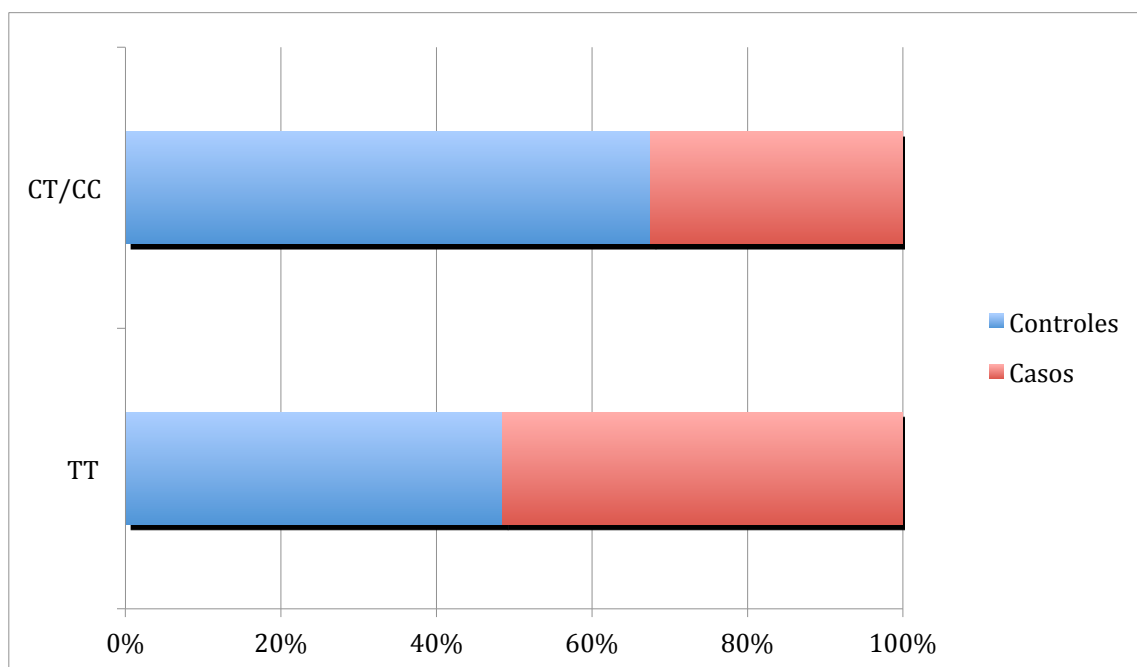
**Tabla 15.** (Pie de página a continuación)

		CONTROLES N = 632	CASOS N = 222	P
Edad, años		45.0 ± 8.9	50.3 ± 6.8	<0,001
Hombres/mujeres, %		41,8 / 58,2	74,3 / 25,7	<0,001
Indice de masa corporal, kg/m <sup>2</sup>		28 ±5,2	29,8±6,8	0,123
Tabaquismo, n (%)	No	389 (61.6)	52 (23.4)	<0,01
	Fumador	162 (25.6)	134 (60.4)	
	Exfumador	81 (12.8)	36 (16.2)	
Hipertensión arterial, n (%)		110 (17,4)	105 (47,3)	<0,001
Historia de dislipemia, n (%)		88 (13,8)	104 (46.8)	<0.001
HbA1c, %		4.9 (4.7 ; 5.3)	5.6 (5.4 ; 6.2)	<0.001
Glucemia, mg/dL		89 (82 ; 100)	99 (90 ; 122)	<0.001
Insulinemia		7.25 (4.7 ; 11.2)	7.69 (5.54 ; 11.3)	<0.181
Diabetes mellitus , n (%)		131 (20.7)	51 (23.0)	0.482
Colesterol total, mg/dL		0.2 (0.1 ; 0.3)	0.2 (0.1 ; 0.2)	<0.001
Colesterol LDL, mg/dL		132.6 ± 34.0	102 ± 39.1	<0.001
Triglicéridos, mg/dL		102 (72 ; 148)	140 (113 ; 183)	<0.001
HDL bajo, n (%)		130 (20.7)	115 (71.9)	<0.001
Estatinas, n (%)		85 (13.4)	207 (94.19)	<0.001
PCR (mg/L)		0.34 (0.32 ; 0.52)	1.22 (0.35 ; 2.92)	<0.001
Fibrinógeno		3.1 (2.7 ; 3.6)	4.2 (3.5 ; 5.0)	<0.001
Leucocitos x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>		7.55 (6.85 ; 8.85)	9.50 (7.4 ; 10.9)	0.018
GOT		23.9 (18.0 ; 37.0)	29.6 (22.4 ; 55.0)	0.139
GPT		29.1 (20.2 ; 53.1)	38.5 (25.1 ; 65.5)	0.361
Creatinina		0.80 (0.7 ; 0.9)	1.00 (0.88 ; 1.13)	<0.001
CCL7, n (%)	TT	566 (89.6)	211 (95)	0,014
	CT/CC	66 (10.4)	11 (5)	

**Tabla 15. Análisis de pacientes jóvenes (varones  $\leq 58$  años,  $n=429$  y mujeres  $\leq 65$  años,  $n=425$ ).** Los casos presentan mayor edad, son predominantemente hombres, fumadores, hipertensos, con niveles bajos de HDL y elevados de triglicéridos (destaca al igual que en el estudio de la población completa que los casos tenían niveles más bajos de LDL atribuidos al false descenso de las concentraciones observado durante la fase aguda del infarto y al tratamiento con estatinas a dosis alta independientemente de los niveles de LDL). Además presentan niveles más elevados de PCR, leucocitos y fibrinógeno. El cambio del alelo T por C (TT frente a CT/CC) es más frecuente TT en los controles de forma significativa.

Los datos son frecuencias (%), medias  $\pm$  desviación standard o medianas (IQR)

**Figura 12. Alelo T frente a C en casos y controles jóvenes.** (varones  $\leq 58$  años,  $n=429$  y mujeres  $\leq 65$  años,  $n=425$ ). Diagrama de barra 100% apilada.



Dada la presencia de múltiples factores de riesgo cardiovascular en la enfermedad aterosclerótica, realizamos una regresión logística multivariable (ver tabla 7) en la que obtuvimos significación estadística en cuanto a la edad, hipertensión arterial, antecedente descrito de dislipemia y tabaquismo activo como fuertes factores de riesgo cardiovascular ya demostrados en múltiples estudios, pero además se alcanzó la significación en la presencia de los alelos TT como factor de riesgo cardiovascular en los varones jóvenes ( $p:0.02$ ), sin llegar a serlo en el caso de las mujeres.

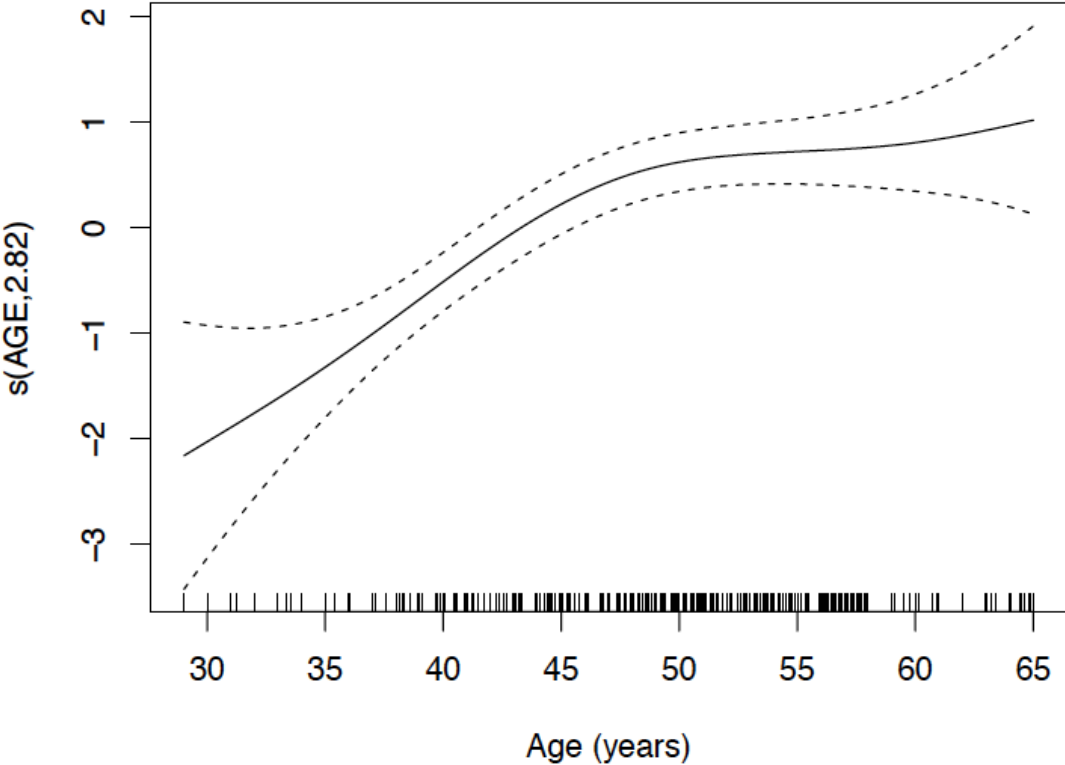
Es de destacar que no hemos observado un efecto lineal en cuanto a la relación de la edad con la presencia de enfermedad aterosclerótica sino que presenta una evolución sigmoidea con un aumento progresivo de la incidencias de la cardiopatía isquémica hasta los 45-50 años con estabilización en meseta hasta los 60-65 años en los que vuelve a aumentar progresivamente. Esta evolución se muestra de forma gráfica en la en la figura 13.

**Tabla 16.**

	P	OR (95% CI)
Edad	<0.001	Efecto no lineal (ver figura 13)
Hipertensión arterial	<0.001	2.82 (1.79 ; 4.44)
Historia de dislipemia	<0.001	3.69 (2.32 ; 5.87)
Fumador activo	<0.001	6.92 (4.49 ; 10.7)
Polimorfismo CCL7: alelo TT		
Hombres	0.020	3.97 (1.24 ; 12.7)
Mujeres	0.897	1.08 (0.33 ; 3.6)

**Tabla 16. Regresión logística multivariable.** Observamos que comparando múltiples factores continúan siendo significativos los factores de riesgo cardiovascular clásicos ya establecidos (edad, hipertensión, dislipemia, tabaquismo activo), así como la presencia del alelo TT de CCL7 en hombres jóvenes (no fue significativo en mujeres jóvenes, probablemente por el efecto protector del estradiol hasta la menopausia)

Figura 13. Efecto no lineal de la edad en la probabilidad de enfermedad coronaria.



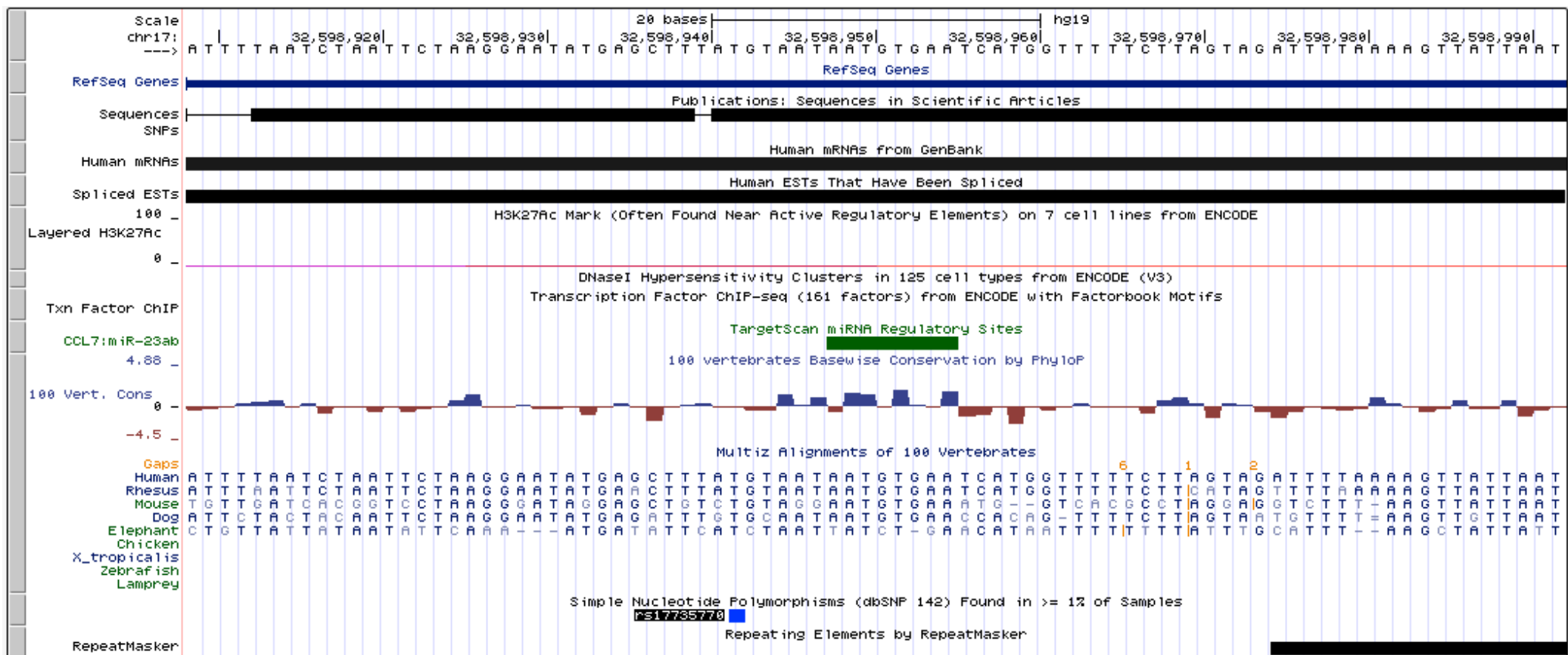
## 5.6 Impacto de la variante rs17735770 en la estructura del mRNA en la zona 3'UTR.

El gen de CCL7, tal y como revela un análisis de comparación de secuencias realizado con el programa BLAST®<sup>(97)</sup>, se encuentra exclusivamente en mamíferos. A pesar de encontrarse en el extremo 3' UTR del mRNA, una zona no codificante, el entorno inmediato de la variante rs17735770 se encuentra altamente conservado en diferentes especies (Tabla 17).

<b>NM_006273.3</b>	476	TCTAAGGAATATGAGCTTTA <b>T</b> GTAATAATGTGAATCATGGTTTTT	520
<b>XM_003278361.3</b>	470	TCTAAGGAATATGAGCTTTA <b>T</b> AATAATAATGTGAATCATGGTTTTT	514
<b>XM_002748371.3</b>	466	TCTAAGGAATATGAGCTTTA <b>T</b> GTAATAATGTGAATCATGGTTTTT	510
<b>XM_008695392.1</b>	535	-CTAAGGAATATGAGATTTG <b>T</b> GTAATAATGTGAATCATGGTTTTT	578
<b>XM_004747090.2</b>	457	TCTAAGGAATATGAGATTTG <b>T</b> GTAATAATGTGAATCATAGTTTTT	501
<b>XM_005597581.1</b>	466	TCTAAGGAATGTGAGTTTTG <b>T</b> GGAATAATGTGAATTATAGTTTTT	510
<b>Consenso</b>		TCTAAGGAAT*TGAG*TTT* <b>T</b> **AATAATGTGAAT*AT*GTTTTT	

**Tabla 17 . Conservación de la secuencia adyacente a la variante rs17735770 en el extremo 3'UTR del mRNA de CCL7 en diferentes especies de mamífero.** Los números indican la posición en el transcrito maduro (mRNA). NM\_006273.3: Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 7 (CCL7) mRNA; XM\_003278361.3 : Nomascus leucogenys chemokine (C-C motif) ligand 7 (CCL7) mRNA; XM\_002748371.3: Callithrix jacchus chemokine (C-C motif) ligand 7 (CCL7) mRNA; XM\_008695392.1: Ursus maritimus chemokine (C-C motif) ligand 7 (CCL7), mRNA; XM\_004747090.2: Mustela putorius furo C-C motif chemokine 2 (LOC101686339), mRNA; XM\_005597581.1: Equus caballus chemokine (C-C motif) ligand 7 (CCL7), mRNA. El nucleótido T correspondiente al alelo silvestre de la variante se muestra en rojo.

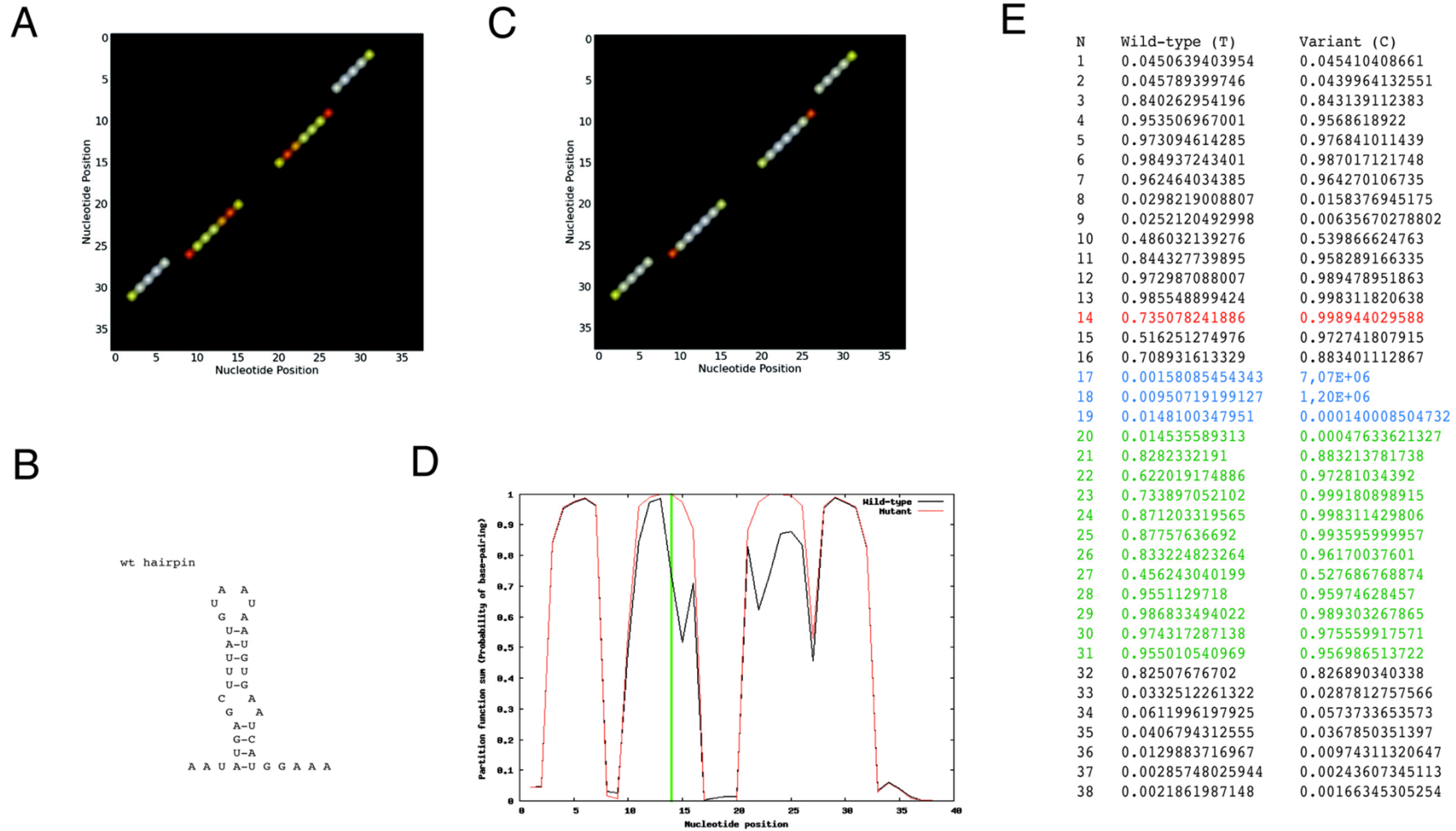
El escrutinio de esta zona en el UCSC Genome Browser, una base de datos genómicos de la Universidad de California Santa Cruz<sup>(87)</sup> predijo, mediante la utilización del software TargetScanHuman v. 5.1<sup>(86)</sup>, un sitio de unión para los microRNA miR-23a y b, genéricamente expresados como miR-23ab. Como se muestra en la figura 14, este sitio se encuentra entre las coordenadas 17: 32598948 – 32598955 (genoma de referencia GRCh37/hg19) y fué identificado por el programa de escrutinio tal y como se describe en la sección material y métodos. El programa asigna una puntuación centesimal de acuerdo a la fiabilidad de la predicción y al contexto, obteniéndose en este caso una puntuación de 98/100.



**Figura 14. Análisis genómico de la zona que contiene la variante rs17735770.** Captura de pantalla del UCSC Genome Browser, indicando de arriba a abajo la posición en el genoma de referencia hg19, la presencia de genes y transcritos registrados en RefSeq y otras fuentes (dbEST y GenBank), la presencia de sitios hipersensibles a DNasaI en cromatina, la presencia de secuencias de reconocimiento para miRNAs (miR-23ab en este caso), un alineamiento en 5 especies de mamífero con una apreciación del grado de conservación en su margen superior y, finalmente, la posición de la variante rs17735770.

Aunque la variante rs17735770 no afecta al sitio de unión de miR-23ab *per se*, se planteó la posibilidad de que esta variante pudiera afectar la estructura del RNA en esa zona. Por ello, utilizamos un algoritmo para calcular el efecto de la sustitución en la estructura del RNA próximo a la variante. El algoritmo utilizado, SNPfold, evalúa los efectos de una variante en la estructura secundaria de una molécula lineal de RNA, y lo expresa mediante un coeficiente de correlación que muestra el grado de accesibilidad de los nucleótidos en la estructura. Cuanto mayor es la participación del nucleótido en la estructura, menor es su accesibilidad, por lo que su coeficiente de correlación es también menor <sup>(90)</sup>.

El programa SNPfold predijo una estructura secundaria de tipo horquilla (*hairpin*) que es estabilizada por la presencia de la variante (Figura 15). Este hecho implica que la estructura secundaria en esta zona es más estable en presencia de la variante C que cuando está presente el alelo más frecuente, T. El coeficiente de correlación afecta, mayoritariamente, a los nucleótidos que se encuentran entre la variante y la secuencia de reconocimiento para miR-23ab, incluyendo también al primer nucleótido (en posición 20) de dicha secuencia (Figura 15, E).



**Figura 15.** La variante rs17735770 provoca, según el algoritmo SNPfold, un cambio en la estructura del RNA que afecta al sitio de unión de miR-23ab. (A) Predicción del apareamiento de bases en el alelo silvestre (T). Cuanto más claro es el color, más fuerte es la interacción. (B) Representación del gráfico anterior. (C) Predicción del apareamiento (D) Gráfico que representa el perfil de accesibilidad (E) Datos representados en D. En rojo se representa la variante rs17735770. Los nucleótidos que se representan en azul son los que, junto con el nucleótido en posición 20, ya en la secuencia de unión del miR-23ab, se encuentran más afectados en cuanto a un descenso muy significativo en la accesibilidad.



## 6. DISCUSIÓN.

En nuestro estudio, hemos buscado una influencia entre los factores genéticos (en concreto, cambios en la secuencia de ADN que codifica el sistema del receptor de CCR2 y sus ligandos CCL2 y CCL7), los inflamatorios y los factores de riesgo cardiovascular clásico frente al desarrollo y evolución de la cardiopatía isquémica.

Encontramos que el cambio de una timina por una citosina en posición 34271923 del cromosoma 17 (SNP rs17735770 de CCL7) se muestra como factor protector frente al desarrollo de cardiopatía isquémica, y preferentemente frente a la inestabilización de la placa de ateroma, en el subgrupo de pacientes jóvenes en los que tienen más importancia los factores genéticos frente a los factores de riesgo cardiovascular clásicos. De cara a analizar las conclusiones, discutimos primeramente los datos de la población estudiada y perfil clínico y analítico de los pacientes incluidos.

### 6.1 Descripción de la población estudiada.

Como era de esperar, los casos no son iguales que los controles. Son más hipertensos, mayores, varones, fumadores, diabéticos, dislipémicos y con cardiopatía isquémica previa, pero sin embargo, presentaron niveles más bajos de colesterol LDL. Atribuimos este hallazgo a que todos los pacientes recibían tratamiento con lípidos que presentaran. Además, en la fase aguda de un evento coronario agudo existe una reducción de las cifras de colesterol que se inicia en las primeras 24-48 horas y alcanza su máxima reducción en torno al 4º-5º día (hasta un 47% de los niveles previos de HDL y LDL) mientras que aumentan los niveles de triglicéridos. Estas alteraciones se normalizan a los dos meses del evento coronario <sup>(91)</sup>.

También es de destacar que observamos un efecto no lineal de la edad en la probabilidad de desarrollo de enfermedad coronaria presentando una meseta en torno a los 50-65 años en la que se estabiliza. Esta característica no se ha

observado en estudios previos coetáneos <sup>(98)</sup> en los que el efecto de la edad era progresivo. Entre las causas podría encontrarse la intervención médica con control de los factores de riesgo cardiovascular que se intensifica en personas de esa franja de edad.

Separando los pacientes en función del diagnóstico del ingreso, destaca que la principal relación con los factores de riesgo cardiovascular clásicos la encontramos entre el tabaco y el infarto con elevación del ST mientras que en los pacientes con angina o infarto sin elevación del ST el riesgo cardiovascular aumenta fundamentalmente a expensas de la diabetes, la hipertensión arterial y los niveles elevados de colesterol total, LDL y triglicéridos. Esto es debido a que los pacientes con un infarto sin elevación del ST tienen más frecuentemente enfermedad coronaria multivaso y con un desarrollo más progresivo y crónico en relación con la mayor incidencia de diabetes mellitus, dislipemia e hipertensión, favoreciendo el desarrollo de circulación colateral que evita la elevación del segmento ST en el electrocardiograma a pesar de la oclusión de la arteria.

Para analizar la estrategia terapéutica empleada, hemos comparado nuestros datos con un registro nacional de síndrome coronario agudo (MASCARA, MAnejo del Síndrome Coronario Agudo. Registro Actualizado<sup>92</sup>) que incluye a pacientes recogidos entre 2004-2005. En nuestro estudio, existe un mayor porcentaje de prescripción de tratamiento farmacológico de acuerdo a las guías de práctica clínica establecida y de pacientes revascularizados tanto de forma percutánea como quirúrgica aunque con tasas de angioplastia primaria menores.

En relación a la terapia de reperfusión observamos, aunque sin alcanzar diferencias significativa, que los hombres recibían este tratamiento con más frecuencia que las mujeres. Es el ya conocido como “sesgo terapéutico del género”, por el que encontramos diferencias en la administración del tratamiento en hombres frente a mujeres y que es atribuido fundamentalmente, en el caso de la cardiopatía isquémica, al infradiagnóstico en las mujeres porque tienden a presentar una clínica atípica, y por la consulta tardía con los

servicios de urgencias. En nuestro estudio hemos encontrado que un 40% de las pacientes mujeres con infarto con elevación del ST no recibieron terapia de reperfusión urgente frente al 30.8% de los pacientes varones. Estas diferencias ya eran conocidas en registros previos; por ejemplo en un estudio observacional sueco de 2004 en el que los varones tenían 1.5 veces más probabilidad de recibir terapia de revascularización <sup>(99)</sup> y también en un estudio observacional americano multicéntrico <sup>(100)</sup> en el que obtuvieron tasas de revascularización urgente por sexos similares a las nuestras aunque las diferencias resultaron significativas dado el mayor tamaño muestral (27% de los varones no recibieron terapia de reperfusión urgente frente al 44% de las mujeres que no la recibieron,  $p < 0.001$ ). Por el contrario, y a diferencia de estudios previos <sup>(100)</sup> en los que las mujeres tienen una menor tasa de infarto con elevación del ST (28.2% de la mujeres se presentaban con este diagnóstico al ingreso frente al 35.1% de los varones) en nuestra serie obtuvimos resultados similares (38% en hombres, 36.3% en mujeres).

## **6.2 Relación entre la cardiopatía isquémica y la inflamación.**

En 2009 Di Stefano et al. publicaron un estudio pequeño (n= 40) en el que analizaron las diferencias en el patrón de inflamación analítico encontrado en los pacientes con infarto transmural frente al infarto subendocárdico. Concluyen que los pacientes con SCACEST presentan niveles más elevados de parámetros de inflamación, existiendo una correlación entre los niveles de proteína C reactiva (PCR) y los de leucocitos con los de troponina <sup>(101)</sup> .

En nuestro caso hemos encontrado datos en la misma línea que correlacionan del perfil inflamatorio con el evento coronario. Observamos niveles más elevados de leucocitos, PCR y fibrinógeno en los pacientes con infarto, es decir, con elevación de troponina y por tanto con necrosis tisular que activaría la respuesta inflamatoria, frente a los pacientes con angina (estable o inestable), es decir, con isquemia pero sin necrosis. En nuestro caso también hemos analizado a controles sanos en los que los parámetros de reacción inflamatoria se encuentran en niveles similares a los pacientes con angina, lo cual indica que es la necrosis establecida y no la isquemia tisular la que desencadena la respuesta inflamatoria.

En estudios previos, también se apoyaba esta relación de la necrosis con la respuesta inflamatoria y el remodelado postinfarto a través de la activación de mecanismos específicos que estimulan la liberación de biomoléculas en el miocardio <sup>(101)</sup>. El efecto es progresivo habiéndose descrito incluso un aumento de la mortalidad por SCA en los pacientes con mayor elevación de biomarcadores de inflamación <sup>(102)</sup> .

### **6.3 Influencia de la SNP rs17735770 de CCL7 en la cardiopatía isquémica.**

En nuestro estudio, hemos encontrado 22 SNPs en el sistema del receptor CCR2 y sus ligandos. Tres de estas mutaciones no estaban descritas previamente y se localizan en el gen CCR2. Nos centramos en la SNP rs17735770 de CCL7 dado que los datos de la muestra inicial sugerían un papel como factor protector frente a la aterosclerosis, puesto que presentaba una mayor frecuencia en los controles frente a los casos. Aumentando el tamaño muestral (casos: 519, controles: 771) estas diferencias se minimizaron siendo no significativas (controles: 10.9% vs. Casos: 7.9%,  $p=0.075$ ). Sin embargo, excluyendo a los pacientes de mayor edad en los que los factores de riesgo cardiovascular clásicos tienen un mayor impacto y analizando únicamente el subgrupo de pacientes más jóvenes en los que los factores genéticos tienen mayor influencia en el desarrollo de la cardiopatía isquémica, sí obtuvimos diferencias significativas en cuanto la presencia de la SNP rs 17735770 tanto en análisis univariante (controles: 10.4% vs. casos: 5%,  $p=0.014$ ) como multivariante. Por el contrario, en mujeres no se alcanzó la significación en el análisis multivariante lo cual lo atribuimos a que las mujeres ya presentan un patrón hormonal protector en esta franja de edad (principalmente gracias a los niveles de estradiol) y que se disipa tras alcanzar la menopausia <sup>(103)</sup>.

En la disfunción endotelial avanzada se produce vasoconstricción y las células endoteliales incrementan la expresión de moléculas que facilitan la adhesión de los monocitos y las plaquetas a los vasos. Los mediadores inflamatorios causan apoptosis de las células endoteliales y las células musculares lisas, y producen proteínas como la metaloproteína 2 (MMP-2 o gelatinasa A) reguladas por las lipoproteínas oxidadas y las citocinas. La MMP-2 contribuye a la agregación/proliferación celular, a la degradación de la capa fibrosa y a la agregación plaquetaria, junto con los gránulos liberados por las propias plaquetas (TXA<sub>2</sub>, ADP y FG<sub>2</sub>) lo que favorece la aterotrombosis <sup>(104)</sup>. Sin embargo, la identificación de la función de la gelatinasa A en la

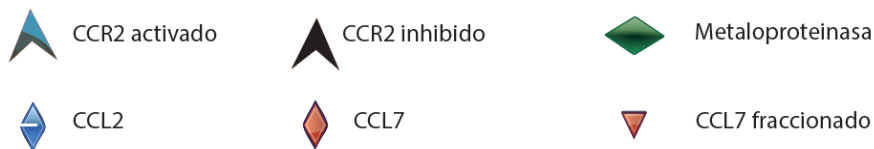
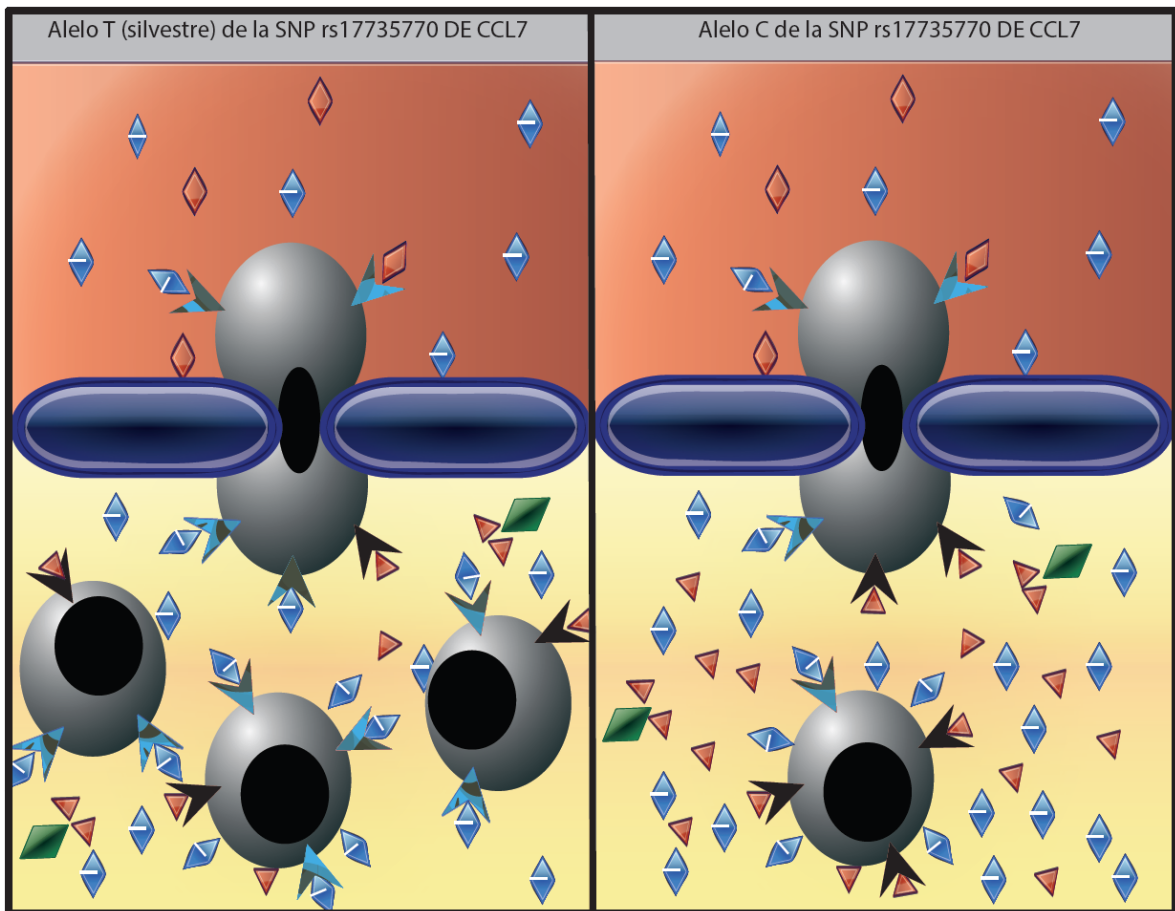
transformación del CCL7 pone de manifiesto la intersección de otro mecanismo que puede intervenir en la autoregulación del proceso inflamatorio.

El CCL7 se une a los receptores CCR1, CCR2 y CCR3 de los leucocitos movilizándolo el calcio intracelular y favoreciendo la migración celular dirigida de los leucocitos. El CCL7 es estructural y funcionalmente similar a CCL2 y es un potente quimioatrayente *in vitro* para los monocitos<sup>(105)</sup>, las células T<sup>(106)</sup> y las células NK<sup>(107)</sup>. Se ha demostrado en una cepa de ratón CCL7<sup>-/-</sup> que el CCL7 funciona como un ligando importante del CCR2 que mejora el reclutamiento *in vivo* de los monocitos a los lugares de inflamación<sup>(108)</sup>. Igualmente, se ha encontrado que los ratones que carecen del CCR2 (el receptor primario para CCL2 y CCL7) presentan de forma significativa una menor infiltración de monocitos y una mayor reducción de las metaloproteinasas y del TNF-alfa en la zona infartada<sup>(108)</sup>. Por tanto, la menor producción sistémica del CCR2 o sus ligandos (CCL2 y CCL7) favorecerían una menor respuesta inflamatoria<sup>(109)</sup>.

Sin embargo, en el caso de la placa de ateroma establecida, hay algunas diferencias que afectan a la función del CCL7, puesto que en el interior de la placa encontramos gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) y metaloproteinasa 7 (MMP7) producidas por células del tejido conectivo, que producen la proteólisis de CCL7<sup>(38)</sup> escindiéndola de su extremo N terminal que resulta fundamental para que active al receptor CCR2<sup>(39)</sup>. De hecho, debido a su ácido piroglutámico NH<sub>2</sub>-terminal, el CCL7 no puede ser escindido por la proteasa serina CD26/dipeptidil peptidasa IV (DPP IV), que elimina el dipéptido NH<sub>2</sub>-terminal de muchas quimiocinas<sup>(110)</sup>. Sin embargo, el CCL7 humano (1-76) es procesado por la gelatinasa A en CCL7 (5-76), lo que lleva a la pérdida de actividad<sup>(38)</sup>. Después de la escisión por esta metaloproteinasa, el CCL7 todavía se une a sus receptores, pero ya no induce el flujo de calcio de la célula ni por tanto la quimiotaxis. En consecuencia, el CCL7 escindido actúa como un antagonista de la quimiocina natural, a diferencia de su acción agonista sistémica, reduciendo la inflamación<sup>(111,112)</sup>. Adicionalmente, a la pérdida de la función agonista sobre el CCR, el CCL7 antagoniza la respuesta posterior no sólo para el CCL7, sino también para el CCL2. A este respecto, estudios previos han demostrado la relevancia fisiológica de la actividad

antagónica del CCL7<sup>(38)</sup>. De hecho, las cantidades relativas de CCL7 intacta y escindidas que están presentes después de la escisión fisiopatológica del CCL7 por parte de la gelatinasa A parecen regular la quimiotaxis y el grado de inflamación<sup>(109)</sup>. Además, se ha descrito que la producción de una proteína mutante de CCL2 que carece de su extremo N terminal (similar a la modificación que produce la MMP2 en CCL7) produce una inhibición de la actividad de CCR2 y por tanto, una reducción en la migración de los monocitos al lugar de inflamación<sup>(113)</sup>.

A esto se suma que durante la fase aguda del infarto de miocardio, aumenta la producción de varias citocinas, entre ellas el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleucina-6 (IL-6), la interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) y el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- $\beta$ 1)<sup>(114,115)</sup>. Estas citocinas no se encuentran constitutivamente expresadas en el corazón en condiciones normales; sin embargo ante un daño al miocardio, se presenta un gran aumento en sus niveles plasmáticos<sup>(116,117)</sup>. En modelos experimentales de infarto de miocardio se ha determinado un aumento de hasta 50 veces en los niveles de RNA mensajero para TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1  $\beta$  dentro de las primeras horas después de la isquemia en el área infartada y un aumento de hasta 15 veces en la zona del miocardio no infartado<sup>(118,119)</sup>. Debido a que el TGF- $\beta$ 1 es un factor de crecimiento que favorece la reparación de la herida y estimula la MMP2 reprimiendo otras MMP, la interacción de la MMP2 con el CCL7 puede ser un factor clave en el cese de la respuesta inflamatoria<sup>(120,132)</sup> en pacientes con placas proclives a la rotura y a la aparición de un síndrome coronario agudo.



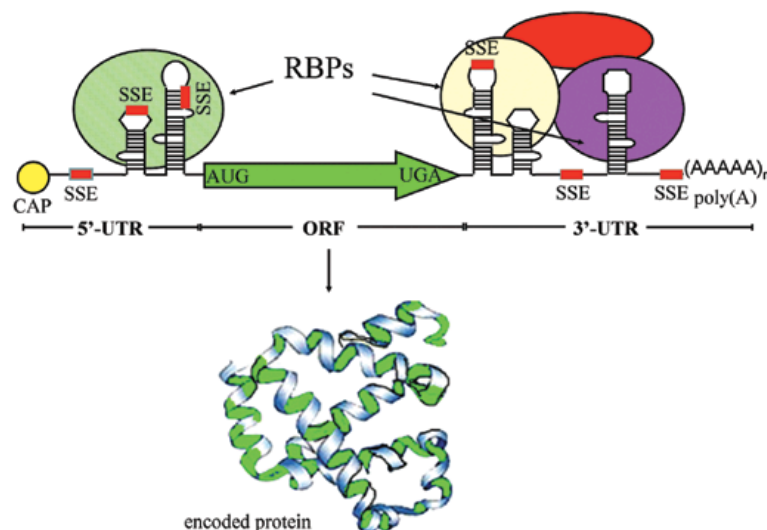
**Figura 16. Propuesta sobre la diferente infiltración de monocitos en la placa de ateroma en el alelo C de de la SNP rs 17735770 de CCL7.** En la imagen de la izquierda vemos la infiltración por monocitos en la placa de ateroma con el alelo silvestre. En la imagen de la derecha, con el alelo C de la SNP rs17735770 aumentaría la síntesis de CCL7 que a nivel de la placa de ateroma actúa como inhibidor de CCR2 y por tanto produciendo un menor contenido en células inflamatorias.

En relación a la presencia de modificaciones genéticas a nivel del CCL7, algunos investigadores han generado variantes que no se unen a los glicosaminoglicanos de la superficie celular, afectando esto a su función a la hora de inducir la migración transendotelial del leucocito <sup>(122)</sup>. Llamativamente, en nuestro estudio, el cambio de una timina por una citosina en posición 34271923 del cromosoma 17 (exón 3 del gen de CCL7, región 3' UTR) no codifica para un cambio de aminoácido, pero sí que se traduce en una



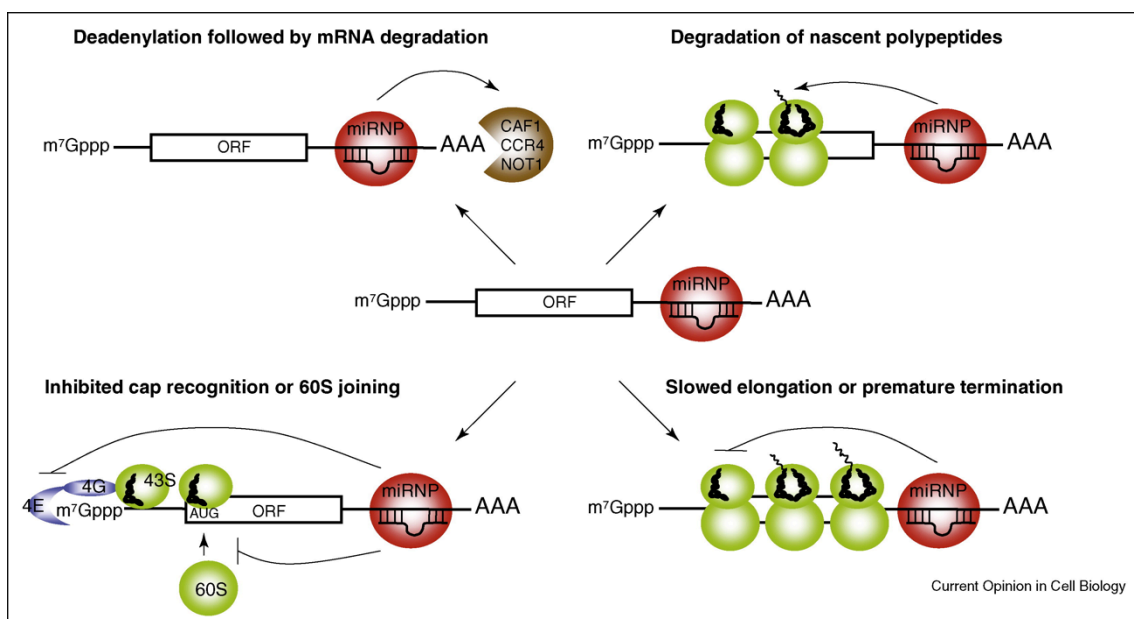
modificación en el RNA mensajero. Aunque no sean codificantes, las regiones 5' y 3' no traducidas de los mRNA tienen un papel estructural importante, ya que pueden determinar la traducción y la estabilidad de un mRNA. Como muestra la figura 17 las zonas 5' y 3' no traducidas a proteínas (UTR) contienen secuencias que, tras la formación de estructuras secundarias y terciarias específicas, ofrecen sitios de unión para complejos ribonucleoproteicos que pueden regular la traducción del mRNA, ofreciendo por tanto, un mecanismo de regulación post-transcripcional.

En el caso de la variante rs17735770, el cambio de T a C produce, de acuerdo al algoritmo empleado por el programa SNPfold, un cambio conformacional que refuerza la estabilidad de una estructura secundaria en forma de bucle. Esta característica adquiere una mayor importancia al coincidir con un lugar de unión para miR-23ab, un tandem de micro RNAs. El modelo predice que la estructura secundaria presente en la variante es más estable y, por tanto, menos accesible para hibridar con otros ácidos nucleicos como los miRNA.



**Figura 17. Elementos reguladores en las zonas no traducidas de los mRNA.** Los extremos 5' y 3' no traducidos de los mRNA contienen elementos estructurales que pueden ser reconocidos por diversos complejos nucleoproteicos. Estos elementos pueden aportar niveles de control a la traducibilidad y la estabilidad del mRNA. Tomado de Di Liegro et al <sup>(123)</sup>.

Los microRNAs son pequeñas moléculas de RNA que pueden participar en varios aspectos de regulación post transcripcional a través de su unión, principalmente, a las zonas 3' no traducidas de los mRNA eucariotas<sup>(124-126)</sup>. Aunque la función más conocida de los miRNAs parece ser el control de la estabilidad del mRNA, alterando su grado de poliadenilación o comprometiendo la integridad del CAP en el extremo 5', parece ser que también podrían influir en la accesibilidad del mRNA a la maquinaria de traducción y a la eficiencia del proceso de traducción *per se*. Una visión general sobre los aspectos que puede regular los miRNAs se muestra en la figura 18.



**Figura 18. Modelos de regulación post-transcripcional mediada por miRNAs.** Los miRNA, tras su unión, principalmente en los extremos 3'UTR del mRNA, pueden iniciar, tras el reclutamiento local de maquinaria específica, varios procesos de control en la productividad del mRNA afectado. Por un lado, pueden promover la deadenilación, que conduce a la degradación del mRNA por 3'exonucleasas. Por otro lado, puede afectar a varios procesos implicados en la iniciación, elongación y terminación de la traducción. Tomada de Chekulaeva et al<sup>(127)</sup>.

Así, en base a estas observaciones y conocimientos, es tentativo especular acerca de la implicación de estos hallazgos. Podríamos pensar que miR-23ab modula la expresión de CCL7 favoreciendo su degradación o su accesibilidad a la maquinaria de traducción. Este es un mecanismo ampliamente utilizado en numerosas moléculas de señalización que tienen unidades transcripcionales pequeñas: se transcriben rápido, se traducen, hacen su función y desaparecen<sup>(128)</sup>. Para que esto sea posible, tiene que haber

mecanismos que limiten la vida media del mRNA, como los miRNA. Al estabilizar la estructura circundante al sitio de unión del miRNA, podemos plantearnos la posibilidad de que el apareamiento intracatenario es mas fuerte en esa zona, por lo que dificultaría la unión de un miRNA. La presencia de menos moléculas de mRNA ocupadas por miRNAs puede suponer un aumento neto de CCL7 al estabilizar un número mayor de moléculas de mRNA. Como hemos visto en la introducción, el ambiente proinflamatorio de la placa de ateroma, donde se encuentra, entre otras proteasas, la gelatinasa A (MMP2 / EC 3.4.24.24) <sup>(38)</sup>, que proteoliza el CCL7 generando un nuevo ligando de CCR2 pero que, en este caso, se comporta como antagonista. Esta observación sugiere que la proteólisis de CCL7 por MMP2 es un mecanismo de regulación negativo para controlar la señalización via CCR2 y modular así la respuesta inflamatoria. Si además, añadimos que la expresión del RNA mensajero del CCL7, como ocurre con el CCL2, está aumentada en las zonas de infarto de miocardio <sup>(121,129)</sup> obtendríamos no solo un aumento de la vida media sino también un aumento de su expresión, lo que se traduciría en una mayor actividad antagónica sobre el CCR2 en la placa de ateroma. Esto explicaría, en parte, el porqué el CCL7 está transitoriamente aumentado en el tejido cardiaco tras un infarto de miocardio <sup>(130)</sup> y porqué nuestros pacientes varones más jóvenes con cardiopatía isquémica, portadores de un cambio de una timina (T) por una citosina (C) en el SNP rs17735770 de CCL7 (genotipos CT y CC), presentan de forma significativa una menor incidencia de cardiopatía isquémica. Igualmente, las estatinas, que tienen un efectos anti-inflamatorios independientemente de su intervención sobre los niveles de colesterol plasmático <sup>(131)</sup> pueden favorecer la estabilidad de la placa actuando a través de diferentes mecanismos pleiotrópicos entre los que se encuentra la reducción de la síntesis de quimioquinas (CCL2, CCL7, CCL13, CCL18, CXCL1) a nivel sistémico.

Este posible mecanismo fisiopatológico deducido de la evidencia publicada al respecto, podría explicar el papel de la SNP rs17735770 como factor protector en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica que hemos objetivado en nuestro estudio, si bien la ausencia de evidencia experimental

limita nuestras observaciones, planteándose el estudio funcional de la variante genética para investigaciones futuras.

## 7. CONCLUSIONES.

- Los monocitos juegan un papel central en el desarrollo de la cardiopatía isquémica y sus complicaciones siendo una de las claves su diapédesis al interior de la placa de ateroma inducida por el receptor CCR2 y sus ligandos.
- Se observa un aumento de los parámetros de inflamación en los pacientes con necrosis tisular frente a los pacientes con isquemia y los controles sanos.
- La presencia de la SNP rs 17735770 es un factor protector frente al desarrollo de cardiopatía isquémica exclusivamente en varones jóvenes, incluso ajustado por el resto de factores de riesgo cardiovascular clásicos.
- En mujeres no encontramos como significativa la intervención de la SNP rs 17735770 probablemente por el efecto protector en esta franja de edad de las concentraciones de estradiol.
- No hemos encontrado diferencias significativas en cuanto a la evolución clínica de los pacientes en función de la SNP rs 17735770 aunque los datos sugieren que podría tener una mayor protección frente a la hiperplasia neointimal y la trombosis aguda tras el implante de un stent.
- Es llamativo el efecto no lineal de la edad en la probabilidad de desarrollo de enfermedad coronaria que hemos observado en nuestra población con una meseta de estabilización en torno a los 50-65 años y que no se ha descrito en otras poblaciones coetáneas.



## 8. BIBLIOGRAFIA.

1. Go AS, Mozaffarian D., Roger VL, Benjamin E, Berry J. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics--2014 Update: A Report From the American Heart Association *Circulation*. 2014;129:399-410
2. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.
3. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002, 420:868-74
4. Leuschner F, Nahrendorf M. Molecular Imaging of Coronary atherosclerosis and myocardial infarction. *Circulation research* 2004, March 4 593-606
5. Charo, Israel F., Taubman, Mark B. Chemokines in pathogenesis of vascular disease. *Circ Res*, 2004, 95; 858-66
6. O'keefe JH. Coronary artery disease prognosis and C-reactive protein levels improve in proportion to percent lowering of low-density lipoprotein. *Am J Cardiol*, 2006, 98 (1): 135-9
7. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *N Engl J Med* 1996, 314:488-500
8. Weber C. Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines and junctional molecules. *J Mol Med*, 2003, 81:4-19
9. Laudanna C, Alon R. Right on the spot. Chemokine triggering of integrin-mediated arrest of rolling leukocytes. *Thromb Haemost.* 2006 Jan;95(1):5-11.

10. Zernecke A, weber C. Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. *Cardiovascular Research* 2010;86:192-201.
11. Idzkowska E, Eljaszewicz A, Miklasz P, Musial WJ, Tycinska AM, Moniuszko M. The Role of Different Monocyte Subsets in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes. *Scand J Immunol.* 2015 Sep;82(3):163-73.
12. Haft JI. Multiple atherosclerotic plaque rupture in acute coronary syndrome. *Circulation* , 2003, 107: e65–e66.
13. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-41
14. Wang GP, Deng ZD, Ni J, Qu ZL. Oxidized low density lipoprotein and very low density lipoprotein enhance expression of monocyte chemoattractant protein 1 in rabbit peritoneal exudate macrophages. *Atherosclerosis* 1997;133:31-6.
15. Kowala MC, Recce R, Beyer S et al. Characterization of atherosclerosis in LDL receptor knockout mice: macrophage accumulation correlates with rapid and sustained expression of aortic MCP-1/JE. *Atherosclerosis* 2000;149:323-30.
16. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM, Van Lenten BJ, Frank JS, Demer LL. Arterioecler. *Thromb. Vasc. Biol.* 16;1996,831-842.
17. Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC, Borst C. Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation* 2000;102:1186-1191
18. Schober A, Weber C. Mechanisms of monocyte recruitment in vascular repair after injury. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7:1249-1257
19. Schober A, Bernhagen J, Thiele M, Zeiffer U, Knarren S, Roller M, Bucala R, Weber C. Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of



macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2004; 109:380-5

20. Libby P, Ridker PM. Inflammation and atherosclerosis: Role of C-protein in risk assessment. *Am J Med* 2004; 116:9S-16S

21. E.L. Gautier, C. Jakubzick, G Randolph. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, Octobre 1

22. Schepers A, Eefting D, Bonta PI, Grimbergen JM, de Vries MR, van Weel V, de Vries CJ, Egashira K, van Bockel JH, Quaz PH. Anti-MCP-1 gene therapy inhibits vascular smooth muscle cells proliferation and attenuates vein graft thickening both in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2063-2069

23. Ingersoll MA, Platt AM, Potteaux S, Randolph GJ. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol*. 2011 Oct;32(10):470-7.

24. Zernecke A, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: proceedings resumed. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Apr;34(4):742-50.

25. Zernecke A, Shagdarsuren E, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: An Update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1897-1908

26. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, Seiler S, Binder N, Ege P, Große-Dunker G, Heisel I, Hornof F, Jeken J, Rebling NM, Ulrich C, Scheller B, Böhm M, Fliser D, Heine GH. CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Oct 16;60(16):1512-20.

27. Nickel R, Beck LA, Stellato C, Schleimer RP. Chemokines and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. (1999)104: 723-742

28. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009 Jun;29(6):313-26.
29. Charo, I. F.; Myers, S. J.; Herman, A.; Franci, C.; Connolly, A. J.; Coughlin, S. R.: Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91: 2752-2756, 1994.
30. Sanders SK, Crean SM, Boxer PA, Kellner D, LaRosa GJ, Hunt SW. Functional differences between monocyte chemotactic protein-1 receptor A and monocyte chemotactic protein-1 receptor B expressed in a Jurkat T cell. *J Immunol.* 2000 Nov 1; 165(9):4877-83.
31. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1991, 88:1121-1127
32. Liu X, Zhang P, Ding S, Wang Y, Zhang M, Zhao Y, Ni M, Zhang Y. Local Gene Silencing of Monocyte Chemoattractant protein-1 prevents vulnerable plaque disruption in apolipoprotein E-knockout Mice. *PLoS ONE* 7(3):e33497. Doi:10.1371/journal.pone.0033497
33. Li J, Guo Y, Luan X, Qi T, Li D, Chen Y, Ji X, Zhang Y, Chen W. Independent roles of monocyte chemoattractant protein-1, regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted and fractalkine in the vulnerability of coronary atherosclerotic plaques. *Circ J.* 2012;76(9):2167-73.
34. Qi TJ, Chen WQ, Jiang CL, Yang TH, Zhai MQ, Li DQ, You BA, An GP, Hu XB, Chen YG, Zhang Y, Li JF. Roles of monocyte chemoattractant protein-1, RANTES and Fractalkine on promoting vulnerability of atherosclerotic plaques. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* 2011 Sep;39(9):797-801.

35. Z.X. Zhong, B. Li, C.R. Li, Q.F. Zhang, Z.D. Liu, P.F. Zhang, X.F. Gu, H. Luo, M.J. Li, H.S. Luo, G.H. Ye, and F.L. Wen. Role of chemokines in promoting instability of coronary atherosclerotic plaques and the underlying molecular mechanism. *Braz J Med Biol Res.* 2015 Feb; 48(2): 161–166.
36. Opdenakker, G.; Van Damme. Chemotactic factors, passive invasion and metastasis of cancer cells. (Letter) *Immun. Today* 13: 463-464, 1992
37. Combadiere C, Ahuja SK, Van Damme J, Tiffany HL, Gao JL, Murphy PM. Monocyte chemoattractant protein-3 is a functional ligand for CC chemokine receptors 1 and 2B. *J Biol Chem.* 1995 Dec 15;270(50):29671-5.
38. McQuibban, G. A.; Gong, J.-H.; Tam, E. M.; McCulloch, C. A. G.; Clark-Lewis, I.; Overall, C. M. : Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science*, 2000, 289: 1202-1206.
39. Masure S, Paemen L, Proost P, Van Damme J, Opdenakker G. Expression of a human mutant monocyte chemotactic protein-3 in *Pichia pastoris* and characterization as an MCP-3 receptor antagonist. *J. Interferon Cytokine Res.* 1995, 15: 955.
40. Inoue S, Egashira K, Ni W, Kitamoto shiro. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 Gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout Mice. *Circulation.* 2002 Nov 19;106(21):2700-6.
41. Boring, L.; Gosling, J.; Cleary, M.; Charo, I. F. : Decreased lesion formation in CCR2 *-/-* mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998, 394: 894-897.
42. Han KH, Han KO, Green SR, Quehenberger O. Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor is increased in

hypercholesterolemia: Differential effects of lipoprotein on monocyte function. J Lipid Res,1999, 40:1053-63

43. Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Natolu E, Rollins BJ, et al: Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999, 19:1518-1525

44. Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K et al: Severe reduction in leucocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. Proc Natl Acad Sci USA 1997, 94:12053-12058

45. Peters, W.; Dupuis, M.; Charo, I. F. : A mechanism for the impaired IFN-gamma production in C-C chemokine receptor 2 (CCR2) knockout mice: role of CCR2 in linking the innate and adaptive immune responses. J. Immun. 2000, 165: 7072-7077.

46. Stein, O.; Dabach, Y.; Ben-Naim, M.; Halperin, G.; Charo, I. F.; Stein, Y. : In CCR2 <sup>-/-</sup> mice monocyte recruitment and egress of LDL cholesterol in vivo is impaired. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003, 300: 477-481.

47. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P et al: Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. Mol Cell 1998, 2:275-281

48. Boring L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Farese RV Jr, Broxmeyer HE, et al: Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. J Clin Invest 1997, 100:2552-2561

49. Dawson TC, Kuziel WA, Osahar TA, Maeda N: Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Atherosclerosis 1999, 143:205-211

50. Guo J, Van Eck M, Twisk K, Maeda N, Benson GM, Groot PH et al: transplantation of monocyte CC chemokine receptor 2 deficient bone marrow into ApoE3-Leiden mice inhibits atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23:447-453
51. Combadiere C, Potteaux S, Rodero M, Simon T, Pezard A, Esposito B, Merval R. Combined inhibition of CCL2, CXCR3 and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C (lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 2008;117:1649-1657
52. Tian J, Pei H, Sanders JM, Angle JF, Sarembock IJ, Matsumoto AH, Helm GA, Shi W. Hyperlipidemia is a major determinant of neointimal formation in LDL receptor-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jul 7;345(3):1004-9.
53. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN: Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 1991, 88:1121-1127
54. C. Gonzalez-Quesada, NG Frangogiannis. Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1)/CCL2 as a biomarker in Acute Coronary Syndromes. *Curr Atheroscler Rep.* Author manuscript; available in PMC 2010 March 1.
55. Van Royen N, Hofer I, Bushmann I, Pik JJ. Effects of local MCP-1 protein therapy on the development of the collateral circulation and atherosclerosis in Watanabe hyperlipidemic rabbits. *Cardiovasc Res*, 2003, 57:178-185.
56. McDermontt DH, Yang Q, Kathiresan S, Cupples A. CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattract protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham heart study. *Circulation*, 2005; 112; 1113-1120

57. Valdes AM, Wolfe ML, O'Brien EJ, Supr. NK. Val64Ile polymorphism in the C-C Chemokine receptor 2 is associated with reduced coronary artery calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002, 22: 1924-28
58. David J. Dow, Alex D McMahon, Ian C Gray, Chris J Packard, Pieter HE Groot. CCR2 and coronary artery disease: a woscops substudy. *BMC Res Notes.* 2010 Feb 2;3:31.
59. Ortlepp JR, Vesper K, Mevissen V, Schmitz F, Janssens U, Franke A. Chemokine receptor (CCR2) genotype is associated with myocardial infarction and heart failure in patients under 65 years of age. *J Mol Med* 2003, 81:363-367
60. Gonzalez P, Alvarez R, Batalla A, Reguero JR, Alvarez V, Astudillo A, et al. Genetic variation at the chemokine receptors CCR5/CCR2 in myocardial infarction. *Genes Immun* 2001, 2:191-195
61. Smith MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Lomb DA et al. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and development study (HGDS), multicenter AIDS cohort study (MACS), multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City cohort (SFCC), ALIVE study. *Science* 1997, 277:959-965
62. Szalai C, Duba, Prohaszka Z, Kalina A, Szabo T, Nagy B et al. Involvement of polymorphisms in the chemokine system in susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1-2518 C/C genotype in CAD patients. *Atherosclerosis* 2001, 158:233-239
63. Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem. Biophys. Res Communications*, 1999, 259: 344-348.

64. Nelissen I, Dubois B, Goris A, Ronsse I, Carton H, Opdenakker G, Gelatinase B, PECAM-1 and MCP-3 gene polymorphisms in Belgian multiple sclerosis. 2002 Aug 15;200(1-2):43-8
65. Huo Y, Weber C, Forlow SB, Sperandio M, Thatte J, Mack M et al. The chemokine KC, but not monocyte chemoattractant protein-1 triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium. *J Clin Invest* 2001;108:1307-1314.
66. Egashira K, Zhao Q, Kataoka C, Ohtani K, Usui M, Charo IF, Nishida K, Inoue S, Katoh M, Ichiki T, Takeshita A. Importance of monocyte chemoattractant protein-1 pathway in neointimal hyperplasia after periarterial injury in mice and monkeys. *Circ Res*. 2002;90:1167-1172.
67. Schober A, Zerneck A, Liehn E, Hundelshausen P, Knarren S, Kuziel W, Weber C. Crucial role of the CCL2/CCR2 axis in neointimal hyperplasia after arterial injury in hyperlipidemic mice involves early monocyte recruitment and CCL2 presentation on platelets. *Circ Res*. 2004;95:1125-1133.
68. Weber C, Schober A, Zerneck A. Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24:1997-2008
69. Schober. Chemokines in vascular dysfunction and remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*. 2008; 28:1950-1959
70. Taubman MB, Rollins BJ, Poon M, Marmur J, Green RA, Berk BC, Nadal-Ginard B. JE mRNA accumulates rapidly in aortic injury and in platelet-derived growth factor stimulated vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1992;70:314-325
71. Wagner AM, Wiebe JC, Boronat M, Saavedra P, Marrero D, Varillas F, Noova FJ. Insulin resistance explains the relationship between novel cardiovascular risk factors and hypertension. The Telde Study. *J Endocrinol Invest*. 2011 Dec;34(11):e409-12.

72. 2013 ACC/AHA Guideline on the Assessment of Cardiovascular Risk .  
Circulation 2013, noviembre 12
73. No authors listed. Obesity: preventing and managing the global epidemic.  
Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser. 2000;894:1-  
253.
74. ATP III guidelines. NIH Publication No. 01-3305. May 2001.
75. Universal definition of myocardial infarction. European Heart Journal.  
October 2007. 2525-2538
76. Killip T 3rd, Kimball JT. Treatment of myocardial infarction in a coronary  
care unit. A two year experience with 250 patients. Am J Cardiol. 1967  
Oct;20(4):457-64.
77. Evangelista A, Alonso Gomez A, Martín Durán R, et al. Guías de práctica  
clínica de la sociedad española de cardiología en ecocardiografía. Rev Esp  
Card. 2000; 53:663-83.
78. Morgan, J. A. and Tatar, J. F. Calculation of the Residual Sum of Squares  
for All Possible. Regressions. Technometrics, 1972, 14, 317-325.
79. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for  
extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988 Feb  
11;16(3):1215.
80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
81. 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM,  
Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA,  
Abecasis GR. A global reference for human genetic variation. Nature. 2015 Oct  
1;526(7571):68-74



82. <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>
83. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 2000;132:365-86
84. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct 5;215(3):403-10
85. Martínez-Quintana E, Medina-Gil JM, Rodríguez-González F, Garay-Sánchez P, Limiñana JM, Saavedra P, Tugores A. Positive clinical response to clopidogrel is independent of paraoxonase 1 Q192R and CYP2C19 genetic variants. *J Clin Pharmacol.* 2014 Aug;54(8):843-9
86. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005 Jan 14;120(1):15-20.
87. <https://genome.ucsc.edu/>
88. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009 Jan;19(1):92-105.
89. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell.* 2007 Jul 6;27(1):91-105.
90. Halvorsen M, Martin JS, Broadaway S, Laederach A. Disease-associated mutations that alter the RNA structural ensemble. *PLoS Genet.* 2010 Aug 19;6(8):e1001074
91. Rosenson RS. Myocardial injury: the acute phase response and lipoprotein metabolism. *J Am Coll Cardiol.* 1993 Sep; 22(3): 933-40.

92. García-Paredes T, Aguilar-Alonso E, Arboleda-Sánchez JA, Vera-Almazán A, Arias-Verdú MD, Oléa-Jiménez V, Fuset-Cabanes MP, Sánchez-Cantalejo E, Rivera-Fernández R. Evaluation of prognostic scale Thrombolysis In Myocardial Infarction and Killip. An ST-elevation myocardial infarction new scale. *Am J Emerg Med.* 2014 Nov;32(11):1364-9.
93. Ferreira-González I, Permanyer-Miralda G, Marrugat J, Heras M, Cuñat J, Civeira E, Arós F, Rodríguez JJ, Sánchez PL, Bueno H. MASCARA (Manejo del Síndrome Coronario Agudo. Registro Actualizado) study. General findings. *Rev Esp Cardiol.* 2008 Aug;61(8):803-16.
94. Schiele F, Hochadel M, Tubaro M, Meneveau N, Wojakowski W, Gierlotka M, Polonski L, Bassand JP, Fox KA, Gitt AK. Reperfusion strategy in Europe: temporal trends in performance measures for reperfusion therapy in ST-elevation myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2010 Nov;31(21):2614-24.
95. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975 May 25;94(3):441-8.
96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
98. J.A. Driver, L. Dkoussé, G. Logroscino, J.M. Gaziano, T. Kurth. Incidence of cardiovascular disease and cáncer in advanced age: prospective cohort study. *BMJ.* 2008; 337:a2467
99. Haglund B, Koster M. , Nilsson T, Rosen M. Inequality in Access to coronary revascularization in Sweden. *Scand Cardiovasc J.* 2004 Dec; 38(6):334-9
100. Jneid H, Fonarow G, Cannon C, Hernandez A, Palacios I, Maree A, Wells Q, Bozkurt B, Lasbresh K, Liang L, hong Y, Newby K, Fletcher G, Peterson E,

Wexler L. Sex differences in medical care and early death after acute myocardial infarction. *Circulation*. 2008;118:2803-2810

101. R di Stefano. V di bello. M Barsotti. C. Grigoratos. C Armani, M Dell'Omodarme. A Carpi. A Balbarini. Inflammatory markers and cardiac function in acute coronary syndrome: difference in ST segment elevation myocardial infarction (STEMI) and in non-STEMI models. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 63,(2009) 773-780

102. P Kavsik, D. Ko, A. Newman, G. Palomaki, V. Lustin, A. MacRae. Risk stratification for heart failure and death in an acute coronary syndrome population using inflammatory cytokines and N-terminal pro-brain natriuretic peptide. *Clin Chem*, 53 (2007), pp 2112-2118

103. Kolovou G, Kolovou V, Koutelou M M, Mavrogeni S. Atherosclerotic and Non-Atherosclerotic Coronary Heart Disease in Women. *Curr Med Chem*. 2015 Sep 3.

104. Kaya MG, Yalcin R, Okyay K, Poyraz F, Bayraktar N, Pasaoglu H, Boyaci B, Cengel A. Potential role of plasma myeloperoxidase level in predicting long-term outcome of acute myocardial infarction. *Tex Heart Inst J*. 2012;39:500–506.

105. Van Damme J, Proost P, Lenaerts JP, Opdenakker G. Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J. Exp. Med* 1992;176:59–65.

106. Taub DD, Proost P, Murphy WJ, Anver M, Longo DL, van Damme J, Oppenheim JJ. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J. Clin. Invest* 1995;95:1370–1376.

107. Allavena P, Bianchi G, Zhou D, van Damme J, Jilek P, Sozzani S, Mantovani A. Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3. *Eur. J. Immunol* 1994;24:3233–3236.
108. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J. Clin. Invest* 2007;117:902–909.
109. Kaikita K, Hayasaki T, Okuma T, Kuziel WA, Ogawa H, Takeya M. Targeted deletion of CC chemokine receptor 2 attenuates left ventricular remodeling after experimental myocardial infarction. *Am J Pathol.* 2004;165(2):439–447.
110. Van Damme J, Struyf S, Wuyts A, Van Coillie E, Menten P, Schols D, Sozzani S, De Meester I, Proost P. 1999. The role of CD26/DPP IV in chemokine processing. (Review) *Chem. Immunol.* 72: 42.
111. Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Monocyte chemotactic protein-3. *Eur Cytokine Netw.* 2001 Oct-Dec;12(4):554-60
112. Masure S, Paemen L, Proost P, Van Damme J, Opdenakker G. 1995. Expression of a human mutant monocyte chemotactic protein-3 in *Pichia pastoris* and characterization as an MCP-3 receptor antagonist. *J. Interferon Cytokine Res.* 15: 955.
113. Zhenyu Yao, Michael Keeney, Tzu-Hua Lin, Jukka Pajarinen, Katherine Barcay, Heather Waters, Kensuke Egashira, Fan Yang, and Stuart Goodman. Mutant monocyte chemoattractant protein 1 protein attenuates migration of and inflammatory cytokine release by macrophages exposed to orthopedic implant wear particles. *J Biomed Mater Res A.* 2014 Sep; 102(9): 3291–3297.
114. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P: Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 2004; 94(12): 1543–1553.

115. Sirera R, Salvador A, Roldan I, Talens R, González–Molina A, Rivera M: Quantification of pro inflammatory cytokines in the urine of congestive Heart failure patients. Its relationship with plasma levels. *Eur J Heart Fail* 2003; 5: 27–31.
116. Ono K, Matsumori A, Shio T, Furukawa Y, Sasayama S: Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation*, 1998; 98: 149–156.
117. Mann D: Stress–activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Ann Rev Physiol* 2003; 65: 81–101.
118. Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG: Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. *Experimental studies in rats. Cardiovasc Res.* 2002 Aug 1;55(2):329-40.
119. Martínez Rosas M. Cardiac remodeling and inflammation. *Arch Cardiol Mex.* 2006 Oct-Dec;76 Suppl 4:S58-66.
120. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:137-61.
121. Ito H, Nakano A, Kinoshita M, Matsumori A. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Lab Invest.* 2003;83(12):1715–1721.
122. Ali S, Robertson H, Wain JH, Isaacs JD, Malik G, Kirby JA. A non-glycosaminoglycan-binding variant of CC chemokine ligand 7 (monocyte chemoattractant protein-3) antagonizes chemokine-mediated inflammation. *J Immunol.* 2005;175(2):1257-66.
123. Di Liegro CM, Schiera G, Di Liegro I. Regulation of mRNA transport, localization and translation in the nervous system of mammals. *Int J Mol Med.* 2014 Apr;33(4):747-62.

124. Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E: Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 2008, 132:9-14.
125. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N: Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008, 9:102-114.
126. 122. Nilsen TW: Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet* 2007, 23:243-249.
127. Chekulaeva M, Filipowicz W. Mechanisms of miRNA-mediated posttranscriptional regulation in animal cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Jun;21(3):452-60. (esta referencia deberia de tener numero).
128. Crabtree GR. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science.* 1989 Jan 20;243(4889):355-61
129. Ban K, Ikeda U, Takahashi M, Kanbe T, Kasahara T, Shimada K. Expression of intercellular adhesion molecule-1 on rat cardiac myocytes by monocyte chemoattractant protein-1. *Cardiovasc Res.* 1994;28(8):1258–1262.
130. Schenk S, Mal N, Finan A, Zhang M, Kiedrowski M, Popovic Z, McCarthy PM, Penn MS. Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor. *Stem Cells.* 2007;25(1):245-51.
131. Nie, D. Li, L. Hu, S. Jin, Ying Yu, Z. Cai, Q. Shao, J. Shen, J. Yi, H. Xiao, L. Shen, B. He. Atorvastatin Improves Plaque Stability in ApoE-Knockout Mice by Regulating Chemokines and Chemokine Receptors. *PLoS One.* 2014; 9(5): e97009. Published online 2014 May
132. Overall CM, Wrana JL, Sodek J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue

inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. J Biol Chem. 1991 Jul 25;266(21):14064-71.