



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

**Influencia de los anticuerpos anti-LDL oxidada y del control glucémico sobre diferentes rutas metabólicas implicadas en la aterogénesis en pacientes con enfermedad arterial periférica y diabetes tipo 2.**

**AUTOR:**

VÍCTOR GÓMEZ CARRILLO

**DIRECTORES:**


RICARDO GÓMEZ HUELGAS

M<sup>a</sup> ROSA BERNAL LÓPEZ



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: Víctor Gómez Carrillo

 <http://orcid.org/0000-0002-1099-5588>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)



## **ÍNDICE PÁGINAS**

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>3-5</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>6-50</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>51</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>52-79</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>80-97</b>
<b>5. DISCUSIÓN Y LIMITES DEL ESTUDIO</b>	<b>98-115</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>116</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>117-129</b>
<b>8. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS</b>	<b>130</b>

## **ABREVIATURAS**

<b>ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
ABCA1	ATP-Vinculante al Cinta Transportador
ADA	Asociación Americana de Diabetes
ADN	Acido Desoxirribonucleico
AGE	Productos Avanzados de la Glicación
AKT1	Proteína Serina / Treonina Quinasas - 1
AMI	Arteria mamaria interna
APO	Arteria poplítea ocluida
Apo	Apolipoproteína
ApoE	Apolipoproteína E
ARNm	Acido Ribonucleico Mensajero
CCL2	Quimiocina (C-C) ligando 2
CD34	Grupo Diferenciación 34
CD36	Cluster de Diferenciación 36
CI	Cardiopatía isquémica
CML	Células Musculares Lisas
COX2	Ciclooxigenasa Tipo 2
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
dNTPs	Desoxinucleotidos Trifostato
EAP	Enfermedad Arterial Periférica
FasR	Apoptosis receptor 1
FT	Factor Tisular
IC 95%	Intervalo de confianza del 95%
Hb	Hemoglobina
H2O DEPC	H2O Dietilpirocarbonado
HbA1c	Hemoglobina Glicosilada
HDL	Lipoproteína de Alta Densidad
HDL-c	Colesterol Ligado a Lipoproteína de Alta Densidad
HIF1A	Factor de Hipoxia Inducible 1
HOMA-R	Modelo de Valoración de la Homeostasia- resistencia a la insulina
IC 95%	Intervalo de confianza del 95%
ICAM-1	Molécula de Adhesión Intercelular
IL-1	Interleukina 1
IL-4	Interleukina 4
IL-5	Interleukina 5
IL-6	Interleukina 6
IL-8	Interleukina 8
IL-10	Interleukina 10
IL-13	Interleukina 13
IL-12	Interleukina 12
IL-1 $\beta$	Interleukina 1 $\beta$
IMC	Índice de Masa Corporal
INF $\gamma$	Interferón $\gamma$
ITB	Indice Tobillo Brazo

LDL	Lipoproteína de Baja Densidad
LDL-c	Colesterol Ligado a Lipoproteína de Baja Densidad
LDLox	Lipoproteína de Baja Densidad Oxidada
LDLR	Receptor de Lipoproteína de Baja Densidad
LOX-1	Receptor de LDLox unido a Lecitina 1
LPL	Lipoproteinlipasa
LRP1	Proteína Relacionada con el Receptor de Lipoproteínas de Baja Densidad Tipo 1
MCP-1	Proteína Quimiotáctica de Monocitos Tipo 1
MMP10	Metaloproteinasa de Matrix-10
NCEP-ATP III	Programa de Educación Nacional Colesterol-Panel de Tratamiento en el adulto III
NDUFA	Ubiquinona Nuclear Codificada por Oxidorreductasa $\alpha$
NHANES	Estudio Nacional de Salud y Examen Nutricional de Estados Unidos
NKIRAS2	Inhibidor de la interacción Ras-like 2
NO	Oxido Nítrico
OLR1	Receptor de Lipoproteína de Baja Densidad oxidado tipo 1
OR	Odds ratio
PAS/PAD	Presión Arterial Sistólica/Diastólica
PCR	Proteína C Reactiva
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PGI2	Prostaciclina
Pm	Peso molecular
PPAR $\gamma$	Proliferador de Receptores de Peroxisoma Activados $\gamma$
PTGS1	Prostaglandina-Endoperóxido Sintasa Tipo 1
RAG2	Gen Activador de la Recombinación 2
RR	Riesgo relativo
RRR	Reducción del riesgo relativo
SCARB1	Receptor Scavenger clase B tipo 1
Sp1	Proteína Específica 1
SREBF1	Esterol Regulador al Elemento Vinculante Factor de Transcripción-1
SREBF2	Esterol Regulador al Elemento Vinculante Factor de Transcripción-2
SREBP2	Esterol-Regulador al Elemento Vinculante de la Proteína 2
TASC II	Consenso Inter-Sociedades para el Manejo de la Enfermedad Arterial Periférica II
TFPI	Inhibidor de la Vía del Factor Tisular
TIMP1	Inhibidor Tisular de la Metaloproteinasa 1
TIMP3	Inhibidor Tisular de la Metaloproteinasa 3
TLDA	Matriz de Baja Densidad TaqMan
TLR2	Toll-like receptor 2
TNF $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$
TP53	Proteína Tumoral p53
USP9Y	Ubiquitina Peptidasa Específica 9 Ligado-Y

VCAM-1	Molécula de Adhesión Celular Vascular Tipo 1
VEGF	Factor de Crecimiento Vascular Endotelial
VF	Vena femoral
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

# **1. INTRODUCCIÓN.**

## **1. Enfermedad arterial periférica: epidemiología y factores de riesgo.**

## **2. Mecanismos fisiopatológicos implicados en la aterosclerosis.**

### **2.1. Aspectos Generales.**

### **2.2. Inflamación.**

### **2.3. Apoptosis.**

### **2.4. Inmunidad.**

### **2.5. Metabolismo Lipídico. Anticuerpos anti-LDL oxidada.**

### **2.6. Diabetes Mellitus.**

## **3. Controversias sobre el beneficio del control glucémico en la prevención de complicaciones cardiovasculares en la diabetes tipo 2.**

## **1. Enfermedad arterial periférica: epidemiología y factores de riesgo.**

La prevalencia mundial de la enfermedad arterial periférica (EAP) de las extremidades inferiores se encuentra entre el 3% y el 12% de la población adulta. En Europa y América del Norte, se estima que 27 millones de personas se ven afectadas con aproximadamente 413.000 hospitalizaciones atribuidas anualmente a EAP (1). En la población española, la prevalencia de la EAP varía entre el 4,5-8,5%; de la que el 3,83-24,5% es silente y 6-29,3% se puede presentar como claudicación intermitente (2). Se trata, por tanto, de una enfermedad infraestimada e infradiagnosticada (3). Por otro lado, se sabe que la prevalencia de la EAP en pacientes diabéticos es mayor que en la población general, oscilando entre el 8% y el 71% de los sujetos diabéticos (4,5). Por tanto, dadas las importantes repercusiones de la EAP, tanto clínicas como sociales y económicas, la convierten en un importante problema de salud.

Los enfermos con EAP presentan una mortalidad cardiovascular 5 veces mayor que los controles de igual edad. Además, en los pacientes con enfermedad coronaria conocida, la presencia de EAP eleva el riesgo de muerte un 25% con respecto a los controles. Por todo esto es importante la búsqueda activa de la EAP incluso en pacientes asintomáticos, para controlar precozmente los factores de riesgo y reducir la mortalidad (1).

Los factores de riesgo para el desarrollo de la EAP, han sido plenamente identificados y, básicamente son los mismos que favorecen la aparición de la enfermedad vascular aterosclerótica.

La identificación de los factores de riesgo vascular se basa en el estudio de grandes cohortes poblacionales, como las de Framingham (6) y el ARIC (7), que se han centrado principalmente en la enfermedad coronaria. Los factores de riesgo mayores están implicados en el 80-90% de las enfermedades cardiovasculares. Todos los factores de riesgo se interrelacionan entre sí y su agrupación potencia la patogenia de la arteriosclerosis. Aproximadamente un 95% de individuos con EAP tiene, al menos, uno de los factores de riesgo cardiovascular tradicionales. Existen algunos factores de riesgo no modificables como la edad, la raza, el sexo masculino y los antecedentes familiares de enfermedad aterotrombótica. Entre los factores de riesgo modificables se encuentran el tabaquismo, la diabetes mellitus, la hipertensión arterial, la dislipemia y la hiperhomocisteinemia (8,9).

La diabetes mellitus y el tabaquismo son los factores de riesgo que están más específicamente relacionados con la EAP. Marcadores serológicos como la hiperfibrinogenemia y la hiperhomocisteinemia o estados de hipercoagulabilidad presentan una asociación documentada con el desarrollo de la EAP, mientras que la ingesta moderada de alcohol y la práctica habitual de ejercicio han demostrado tener un papel protector (9).

**Raza.** La incidencia de EAP en la población de raza negra duplica la de la población caucásica. Según el estudio GENOA (10), la prevalencia de EAP en sujetos de raza negra no latinoamericanos y de raza blanca fue del 7,8% y del 4,4%, respectivamente. Parece que esta diferencia es independiente de los factores clásicos de riesgo cardiovascular, ya que curiosamente la

ateroesclerosis es más frecuente en pacientes de raza blanca comparados con aquellos de raza negra o asiática.

**Sexo**. La prevalencia de la EAP, tanto sintomática como asintomática, es mayor en varones que en mujeres, sobre todo en población joven ya que en mujeres premenopáusicas la presencia de aterosclerosis es infrecuente o es leve. La presencia de estrógenos se considera un factor protector, ya que en edades más avanzadas, coincidiendo con el estado postmenopáusico, esta diferencia se va reduciendo hasta casi igualarse. Además, la prevalencia de EAP grave (isquemia crítica) en los varones es mayor que en las mujeres en una proporción de 2:1 o de 3:1, si bien esta ratio puede verse alterado en los próximos años debido a la disminución en el consumo de tabaco en los varones y al incremento del tabaquismo entre las mujeres (2).

**Edad**. Es el principal marcador de riesgo de EAP. La incidencia y la prevalencia aumentan de forma directa con la edad de la población, de manera que la prevalencia es cercana al 2,5% en la franja de edad de 50-59 años y asciende hasta el 14,5% en mayores de 70 años (11).

**Tabaco**. Es el factor de riesgo modificable más importante para el desarrollo de EAP y sus complicaciones. En algunos estudios se ha encontrado una asociación más estrecha entre consumo de tabaco y EAP que entre consumo de tabaco y cardiopatía isquémica. Más del 80% de los pacientes con EAP son o han sido fumadores. El riesgo relativo de desarrollar claudicación intermitente en las extremidades inferiores es, como mínimo, entre 2 y 10

veces más alto en fumadores que en no fumadores. Este incremento de riesgo es dependiente de la dosis, y se incrementa en función del número de cigarrillos consumidos por día y en función del número de años de hábito tabáquico. La EAP aparece con una década de adelanto en fumadores frente a no fumadores (2,11). El tabaquismo activo influye en la gravedad de la EAP, aumenta el riesgo de oclusión, de amputación, de procedimientos de revascularización y de mortalidad. El abandono del hábito tabáquico reduce progresivamente el riesgo de desarrollar la enfermedad. El cese del tabaquismo se asocia con una rápida disminución de la incidencia de la claudicación que se iguala a la de los no fumadores al año de haber dejado de fumar (2,3).

**Diabetes Mellitus.** La diabetes mellitus constituye uno de los principales problemas de salud pública debido a su elevada prevalencia, al hecho de que puede afectar a personas de cualquier edad, sexo, clase social y área geográfica, a su elevada morbimortalidad y a su elevado coste sanitario (12).

La diabetes ha adquirido un carácter pandémico. La obesidad es un importante factor de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2). El marcado incremento en la prevalencia de la obesidad a nivel mundial está en la base de la pandemia de diabetes. A nivel mundial, en el año 2011, se estimaba la existencia de 366 millones de personas y la previsión para el año 2030 asciende a 552 millones, siendo los países con ingresos bajos y medios los que se enfrentan al mayor crecimiento de la enfermedad (13).

Según el estudio di@betes (14), casi el 30% de la población adulta española presenta alguna alteración del metabolismo hidrocarbonado. La prevalencia de diabetes, ajustada por edad y sexo, fue del 13,8%, siendo la diabetes desconocida casi en la mitad de los casos (6%). La prevalencia de prediabetes (glucemia alterada en ayunas y/o intolerancia a la glucosa) fue muy elevada (14,8%). De tal modo que concluye que la prevalencia de diabetes y prediabetes se incrementaba con la edad y fue significativamente mayor en los varones.

En cuanto a la mortalidad en España, la diabetes es la tercera causa de muerte en mujeres y la séptima en varones (14). En 2006, la diabetes fue la causa del 2,6% del total de fallecimientos ocurridos, pero esta cifra está infraestimada ya que la mayoría de los pacientes con diabetes fallece por complicaciones crónicas y son éstas las que se registran como la causa de muerte (15).

El estado hiperglucémico crónico, característico de la diabetes mellitus, se asocia al desarrollo de complicaciones microvasculares específicas (retinopatía (50% de los casos), nefropatía (25% de los casos), neuropatía (25% de los casos)) (16) y facilita el desarrollo de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica (coronaria, cerebrovascular, periférica) que, característicamente, suele ser más precoz, más extensa y más grave que en los sujetos no diabéticos (12).

Las complicaciones cardiovasculares suponen el 65% de las causas de muerte en los sujetos diabéticos, los cuales presentan un riesgo 2-5 veces mayor de presentar un episodio cardiovascular que los no diabéticos. Es por ello que la DM2 se considera un equivalente de riesgo coronario, y los pacientes con diabetes presentan una enfermedad arterial más avanzada al momento del diagnóstico y de peor pronóstico que los pacientes no diabéticos (4). A diferencia de las complicaciones microvasculares, cuyo desarrollo está muy ligado al tiempo de evolución de la diabetes, la enfermedad macrovascular comienza a desarrollarse con niveles de hiperglucemia en rango subdiabético (17).

La presencia de diabetes mellitus se asocia con un incremento de dos a cuatro veces superior de desarrollar EAP, aumenta entre 3,5 y 8,6 veces el riesgo de claudicación en hombres y mujeres respectivamente, e incrementa el riesgo de desarrollar isquemia crítica (18).

Se trata de un factor de riesgo no sólo cualitativo, sino también cuantitativo, ya que por cada aumento del 1% de hemoglobina glicosilada (HbA1c), el riesgo de EAP se incrementa en un 25%. La resistencia a la insulina, aun sin criterios analíticos de diabetes, también es un factor de riesgo de EAP, que hace aumentar el riesgo en un 40-50% (18).

La afectación de vasos distales es habitual en la EAP del paciente diabético y, junto con la microangiopatía y neuropatía, condicionan un riesgo de amputación de hasta 10 veces mayor que en pacientes no diabéticos.

Comparados con pacientes no diabéticos, los pacientes diabéticos con EAP presentan una mayor tasa de mortalidad (51,7% frente al 25,6%;  $p < 0,002$ , en un seguimiento de 4,5 años), una mortalidad más precoz ( $64,7 \pm 11,4$  frente a  $71,2 \pm 8,7$  años;  $p < 0,04$ ) y cinco veces más probabilidades de amputación (41,4% frente al 11,5%;  $p < 0,0001$ ). Además, los que presentaban una HbA1c superior al 7,5% desarrollan cinco veces más claudicación y hospitalizaciones por EAP (2,19).

**Hipertensión arterial.** Es el factor de riesgo cardiovascular más frecuente y se relaciona con la presencia de EAP, aunque el riesgo relativo es menor que con otros factores, como el tabaco o la diabetes. El mecanismo por el que actúa la hipertensión arterial en la aterogénesis no está bien definido, pero parece tener una base hemodinámica, provocando la alteración en la actividad plaquetaria, la disfunción endotelial y la concentración anormal de factores homeostáticos que pudieran favorecer el estrés oxidativo y el desarrollo de la respuesta inflamatoria que lleva a la formación de la placa de ateroma (20).

**Dislipemia.** Existe un incremento del riesgo de desarrollar EAP asociado a presentar alteraciones del metabolismo lipídico. En el estudio NHANES (21), más del 60% de pacientes con EAP tenía hipercolesterolemia, mientras que, en el estudio PARTNERS (22), la prevalencia de hiperlipemia en pacientes con EAP fue del 77%. En el estudio Framingham (6) se encontró que niveles de colesterol total por encima de 270 mg/dl se asociaban al doble de incidencia de claudicación intermitente. Se ha visto que los pacientes con EAP tienen niveles más elevados de triglicéridos, colesterol VLDL, triglicéridos VLDL, colesterol

LDL y triglicéridos LDL y bajos niveles de colesterol HDL, que los controles (6). Por otro lado, el descenso de las concentraciones séricas de colesterol mediante la dieta o con fármacos frena la tasa de progresión de la aterosclerosis, consiguiendo la regresión de algunas placas de ateroma y retrasa la progresión de la EAP (23).

Aparte de los factores de riesgo tradicionales de la EAP, han surgido una serie de trabajos relacionando nuevos factores de riesgo con el desarrollo de la enfermedad.

**Hiperhomocisteinemia.** La hiperhomocisteinemia incrementa 2-3 veces el riesgo de desarrollar una enfermedad vascular aterosclerótica. Aunque su asociación con la EAP se ha definido como inconsistente, aproximadamente el 30-40% de pacientes con EAP presentan altos niveles de homocisteinemia, siendo esta asociación más frecuente entre los pacientes jóvenes (2, 11, 19).

**Insuficiencia renal crónica.** La enfermedad renal es un factor de riesgo de la EAP y los pacientes con insuficiencia renal crónica presentan mayor prevalencia de EAP (2, 11,19).

**Inflamación.** La inflamación es un mecanismo etiopatogénico importante para el inicio y la progresión de la EAP, y los mediadores inflamatorios que participan en este proceso son similares a los que contribuyen al desarrollo de la enfermedad coronaria. El tabaco y la diabetes, los más fuertes predictores del desarrollo de EAP, promueven un estrés oxidativo que, directa o

indirectamente, participa en las vías inflamatorias. También la hipertensión arterial, que afecta hasta un 80% de pacientes con EAP, promueve un estado inflamatorio. Así, la angiotensina II aumenta la expresión de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina-6 (IL-6) o la proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 (MCP-1). Además, la dislipemia puede activar funciones inflamatorias que modifican la oxidación de lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL). Niveles elevados de proteína C reactiva (PCR) y de otras moléculas proinflamatorias se asocian claramente con el aumento de riesgo de desarrollar EAP. Estas moléculas proinflamatorias no son unos simples marcadores de inflamación, sino que desempeñan un papel activo en la aterogénesis periférica (24).

**Hiperviscosidad sanguínea y estados de hipercoagulabilidad e hiperfibrinogenemia.** La hiperglobulia es frecuente en los pacientes fumadores. Está descrito un estado de hiperviscosidad, en pacientes con EAP y algunos estudios han demostrado que las concentraciones elevadas de fibrinógeno condicionan una alteración de la microcirculación que se asocia con una mayor gravedad clínica de la EAP (2, 11,19).

**Fosfatasa alcalina.** El estudio NHANES mostró una asociación significativa entre los niveles elevados de fosfatasa alcalina, y no de otros enzimas hepáticos, con el desarrollo de EAP (OR = 1,89, p = 0,023) (21).

**Niveles de fósforo.** Se ha encontrado una correlación positiva entre niveles de fosforemia de 3,7-5 mg/dl y un ITB > 1,3 (OR = 4,78, p = 0,003) (25), indicativo de una mayor rigidez de la pared arterial.

**Uricemia.** En algunos estudios existe una asociación entre niveles altos de ácido úrico en sangre y EAP (OR = 1,62, p = 0,015) (26).

Por otro lado, también se han descrito como factores protectores de la EAP un índice de masa corporal (IMC)  $\leq 25$  kg/m<sup>2</sup>, caminar más de 7 horas a la semana y un nivel adecuado de colesterol HDL (HDL-c) (2, 11,19).

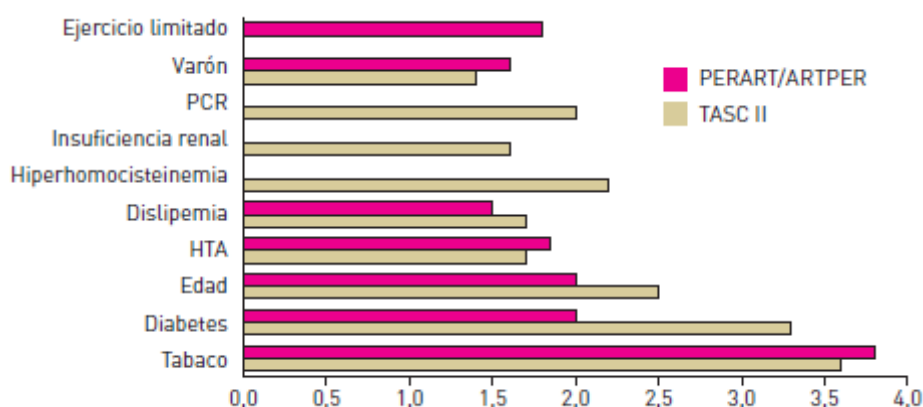
Existe una **predisposición genética** a presentar EAP, de carácter multigénico. Según algunos estudios, uno de cada 4 hermanos de los pacientes con EAP prematura tendrá un acontecimiento vascular antes de los 55 años de edad, y hasta la mitad de los hermanos asintomáticos desarrollarán una lesión vascular silente antes de los 50 años. En un estudio (10), realizado en una muestra de casi 2.500 pacientes multiétnicos de 29 a 91 años, se ha demostrado que la presencia de una historia familiar de EAP es un factor independiente de riesgo fuertemente asociado al desarrollo de EAP (10,11).

Es interesante conocer la fuerza de la asociación de los diferentes factores de riesgo. Se ha observado que el riesgo relativo (RR) de presentar un ITB <0,9 para los pacientes con diabetes es de 4,05 y para los individuos con tabaquismo activo de 2,5. También se ha descrito que la hipertensión arterial (RR: 1,5), la edad (RR: 1,5 por cada 5 años), el colesterol total (RR: 1,1 por

cada incremento de 10 mg/dl) y la hiperhomocisteinemia (RR: 1,4) se asocian con la presencia de EAP (27).

Los impactos calculados para cada factor de riesgo según el consenso TASC II (Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease) son similares a los obtenidos en el estudio PERART/ARTPER (1) (Figura 1).

**Figura 1. Asociación (riesgo relativo) entre la EAP y los factores de riesgo, según el TASC II y el estudio PERART/ARTPER. Fuente: Nörgren et al (1)**



El Colegio Americano de Cardiología / Asociación Americana del Corazón (ACC / AHA) ha establecido los siguientes grupos de riesgo en los que se recomienda realizar un despistaje de EAP: a) edad  $\geq 70$  años, b) sujetos de 50 - 69 años con antecedentes de tabaquismo o diabetes, c) pacientes de 40 - 49 años con diabetes y al menos otro factor de riesgo para la aterosclerosis, d) pacientes con síntomas sugerentes de claudicación intermitente, e) pacientes que presentan un examen anormal de los pulsos arteriales en extremidades

inferiores, y e) aquellos enfermos con aterosclerosis conocida en otras localizaciones vasculares (19)

Un estudio publicado recientemente (28) determinó los efectos acumulativos de los factores de riesgo conocidos para la EAP. Los factores utilizados en dicho modelo fueron: la edad, el sexo, la raza / etnia, la hipertensión arterial, la diabetes, la enfermedad renal crónica y el tabaquismo.

En comparación con los sujetos sin ningún factor de riesgo, los individuos que presentaban un factor de riesgo no mostraron un incremento significativo de presentar EAP (odds ratio (OR): 1,5, intervalo de confianza del 95% (IC 95%): 0,9-2,6)). Con dos factores de riesgo, el riesgo de EAP casi se cuadruplicó (OR: 3,7, IC 95 % 2.3-a 6.1) y con la presencia de tres factores de riesgo, el riesgo se incrementó 10 veces (OR: 10,2, IC 95% 6,4-16,3) (28).

## **2. Mecanismos fisiopatológicos implicados en la aterosclerosis**

### **2.1. Aspectos Generales.**

La EAP principalmente deriva de la presencia de una enfermedad arterial oclusiva, que condiciona un insuficiente flujo sanguíneo a las extremidades. En la gran mayoría de las ocasiones, el proceso patológico subyacente es la enfermedad arterioesclerótica que afecta preferentemente a la vascularización de las extremidades inferiores. La aterosclerosis ha pasado de ser considerada una enfermedad de depósito y degenerativa a ser entendida como una enfermedad inflamatoria crónica que da lugar a un episodio clínico agudo como

resultado de la complicación de una placa de ateroma. Se trata de una enfermedad multifacética y multifactorial, de patogénesis desconocida y en la cual se han implicado diversas teorías, dentro de las que se incluye la teoría del envejecimiento o degeneración, la injuria mecánica, la anoxia y las alteraciones hemorrágicas de la íntima, entre otras (29).

La formación de la placa de ateroma o ateromatosis fue definida por primera vez por Marchand como el desarrollo de una lesión predominantemente de la íntima, que afecta a las arterias elásticas y musculares de mayor calibre, siendo sus dos componentes básicos el depósito de lípidos y la proliferación celular y colágeno (30).

Clásicamente se han considerado dos teorías para intentar explicar la formación de la placa de ateroma. La primera, iniciada por Rokitansy en 1852, postulaba que el mecanismo inicial era la reacción fibrótica que producía un engrosamiento de la íntima que de forma secundaria se cargaba de lípidos. Sin embargo, para Virchow (1856), el depósito lipídico es el que determinaría la formación de la placa. En ambas teorías, la incrustativa de Rokitansky o la infiltrativa de Virchow, el endotelio es un agente pasivo que sufre un proceso fibrótico o de depósito. Más de un siglo después, Ross integró ambas teorías al considerar la aterosclerosis como un proceso de respuesta inflamatoria a una agresión endotelial mediante procesos mecánicos, químicos, biológicos o inmunológicos. Esta lesión endotelial actúa como fenómeno inicial e induce la agregación plaquetaria con liberación de los diferentes factores que estimulan la proliferación y migración de células musculares lisas (CML). El aumento de

CML se acompaña de un aumento del tejido conjuntivo y del depósito celular y extracelular de lípidos (31).

Desde el punto de vista fisiopatológico, la isquemia de los miembros inferiores puede clasificarse en funcional y crítica. La isquemia funcional ocurre cuando el flujo sanguíneo es normal en reposo pero insuficiente durante el ejercicio, manifestándose clínicamente como claudicación intermitente. La isquemia crítica se produce cuando la reducción del flujo sanguíneo ocasiona un déficit de perfusión en reposo y se define por la presencia de dolor en reposo o lesiones tróficas en la extremidad (9,11). En estas circunstancias, el diagnóstico precoz es fundamental, ya que hay un claro riesgo de pérdida de la extremidad afectada si no se restablece un flujo sanguíneo adecuado, mediante cirugía o tratamiento endovascular. Diferenciar ambos conceptos es importante para establecer la indicación terapéutica y el pronóstico de los pacientes con EAP.

El mecanismo fisiopatológico por el que se desarrolla la insuficiencia arterial se basa en la presencia de estenosis arteriales que progresan en su historia natural hasta provocar una oclusión arterial completa. Ello se traduce en un mayor o menor grado de desarrollo de las vías colaterales de suplencia. Cuando el desajuste entre las necesidades de los tejidos periféricos y el aporte de sangre se produce de manera más o menos abrupta (placa de alto riesgo), estaremos ante un cuadro de isquemia aguda de origen trombótico (32).

Se han podido detectar diferencias en el comportamiento de la placa ateromatosa en relación con su localización anatómica. Las placas de alto riesgo en las arterias de las extremidades inferiores son muy estenóticas y fibrosas. Dicha estenosis, asociada con un estado de hipercoagulabilidad, contribuye de manera decisiva al desarrollo de eventos agudos (33).

Este tipo de placas contrasta claramente con las lesiones presentes en las arterias coronarias, que con frecuencia están compuestas por un gran núcleo lipídico extracelular y un gran número de células espumosas, recubierto por una fina cubierta fibrosa susceptible de rotura. En esta situación, la vulnerabilidad de la placa en los puntos más frágiles (mayor número de células espumosas y capa fibrosa más delgada) es la causa de los eventos agudos (34).

Cuando se produce la rotura de la placa, tiene lugar una trombosis que oblitera la luz vascular, desencadenando los cuadros agudos. Debido a que, con frecuencia, antes de la rotura de la placa se ha neoforado circulación colateral, la clínica de la isquemia aguda es mejor tolerada que la que acontece cuando el cuadro de base de la isquemia aguda es de origen embólico. En la mayoría de las ocasiones, la evolución clínica de la EAP es bastante estable debido al desarrollo de circulación colateral, a la adaptación metabólica de las masas musculares implicadas y al uso, muchas veces inconsciente, de grupos musculares no isquémicos. Se estima que sólo un 25% de los pacientes con claudicación intermitente experimentará un empeoramiento y evolucionará hacia la isquemia crítica, lo que suele ocurrir

con más frecuencia después del primer año de diagnóstico (27). Si se excluye a los pacientes diabéticos, aún es menos frecuente que la EAP condicione la pérdida de la extremidad. En el estudio de Framingham se encontró que menos de un 2% de los pacientes con EAP requirieron una amputación mayor (6).

En nuestro trabajo incidiremos en algunos mecanismos involucrados en la aterosclerosis y en consecuencia en la EAP, como son la inflamación, la apoptosis, procesos inmunológicos y el metabolismo lipídico. Además, analizaremos el impacto de la carga glucémica en dichos mecanismos.

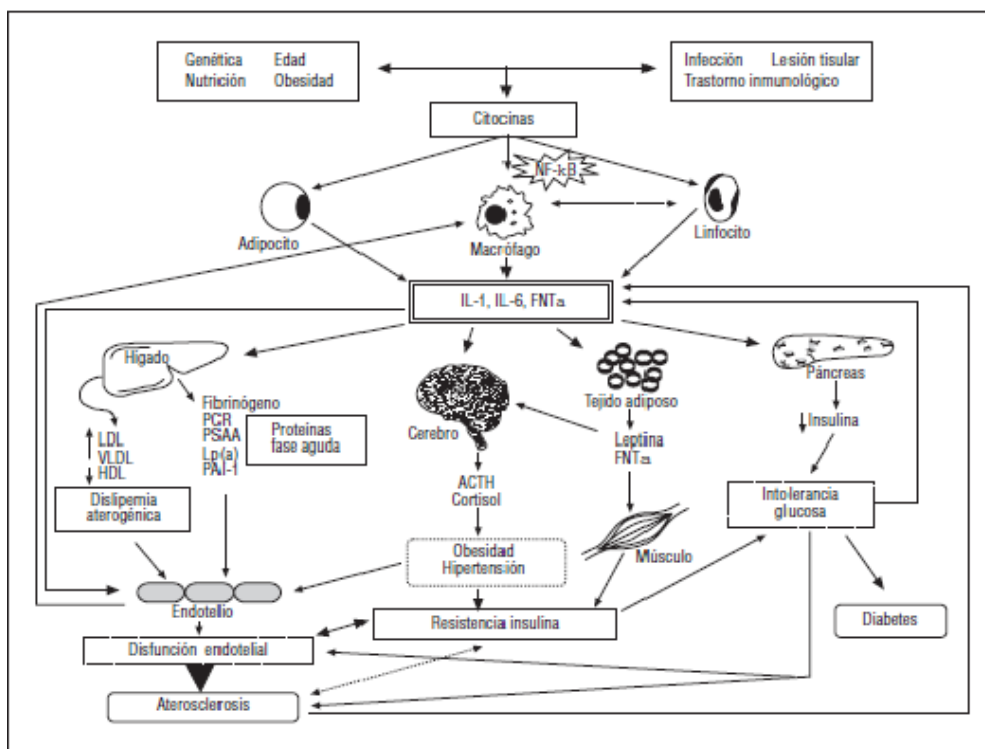
## **2.2. Inflamación**

Actualmente existe una sólida evidencia de que en el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis subyacen mecanismos inmunológicos e inflamatorios (35). Numerosos estudios demuestran que proteínas de fase aguda como la PCR, el fibrinógeno, la proteína sérica A-amiloide y diversas interleuquinas fueron factores predictivos de progresión y severidad de enfermedad coronaria en la población general y en el subgrupo de pacientes diabéticos en particular (36-38).

Es importante reseñar la función que desempeña el tejido adiposo y, por tanto, la obesidad, en el mantenimiento de un estado de inflamación crónica, al secretar una variedad de moléculas biológicamente activas como la IL-6, el factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), la leptina y la adiponectina, que son determinantes en la regulación del proceso aterogénico y en la resistencia a la

insulina (39-41). Esto nos dirige hacia la hipótesis de que una respuesta inmunológica e inflamatoria sistémica puede subyacer en el desarrollo del síndrome metabólico, la diabetes mellitus y la aterosclerosis (41) (Figura 2).

**Figura 2. Mecanismos fisiopatológicos del síndrome metabólico y la resistencia a la insulina implicados en la aterogénesis. Fuente: Hotta K et al. (41)**



Respuesta Inmunológica e Inflamatoria esquematizada, en la cual se demuestran las relaciones entre los diferentes componentes del síndrome de resistencia a la insulina y la aterosclerosis (véase texto). NF-κB: factor nuclear kappa-beta; IL-1: Interleucina 1; IL-6: Interleucina 6; FNTα: factor de necrosis tumoral alfa; PCR: proteína C reactiva; PSAA: proteína sérica A-amiloid; Lp(a): lipoproteína A; PAI-1: inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno; LDL: lipoproteína de baja densidad; VLDL: lipoproteína de muy baja densidad; HDL: lipoproteína de alta densidad; ACTH: hormona corticotropa adrenal.

Como podemos apreciar, múltiples factores endógenos y exógenos actúan promoviendo la activación de citoquinas lo cual atrae a macrófagos, linfocitos y adipocitos activando la cascada de inflamación en diferentes órganos. A nivel hepático, va a aumentar la producción de LDL y VLDL favoreciendo la placa aterogénica y la disfunción endotelial, la cual también se

va a ver influida por la obesidad y la hipertensión. En el tejido adiposo, la activación de la leptina y el  $TNF\alpha$  actúan sobre el musculo aumentando la resistencia a la insulina, que a su vez promueve la aterogénesis. En el páncreas, se disminuye la secreción de insulina y con ello se facilita el desarrollo de intolerancia a la glucosa y de diabetes (40,41).

La etiopatogenia de la aterosclerosis es multifactorial, lo cual se verifica con claridad en el paciente diabético. La disfunción endotelial está considerada como el estadio más precoz en el proceso aterogénico y se ha asociado a factores de riesgo cardiovascular clásicos y otros más recientes, como la hiperhomocisteinemia, el estrés oxidativo y las infecciones crónicas.

El endotelio tiene funciones endocrinas que regulan las actividades antiinflamatorias, mitógenas y de contractilidad de los vasos de la pared, así como del proceso hemostático. Tiene un papel regulador del tono vasomotor, además de propiedades antiaterogénicas y antiinflamatorias. La lesión endotelial desencadena una respuesta de infiltración monocitaria, que altera la capacidad antitrombótica endotelial, su capacidad fibrinolítica, e incluso la respuesta vasomotriz. Por tanto, la disfunción endotelial conlleva una pérdida de las funciones homeostáticas del endotelio, que resulta en la adhesión de plaquetas y células inflamatorias (monocitos y linfocitos T) a la pared vascular, un aumento de la permeabilidad endotelial que permite el depósito de LDL modificadas a nivel intimal, una liberación de citoquinas y factores de crecimiento que producen la proliferación de las CML, y la atracción de más células de estirpe inflamatoria a la pared arterial alterada. También trae como

consecuencia una perturbación del equilibrio trombolítico-trombótico en el lecho endotelial que promueve el desarrollo de fenómenos trombóticos, así como una regulación anormal del tono vasomotor, secundaria a una menor biodisponibilidad del óxido nítrico (NO), con la subsiguiente tendencia a la vasoconstricción arterial (42,43).

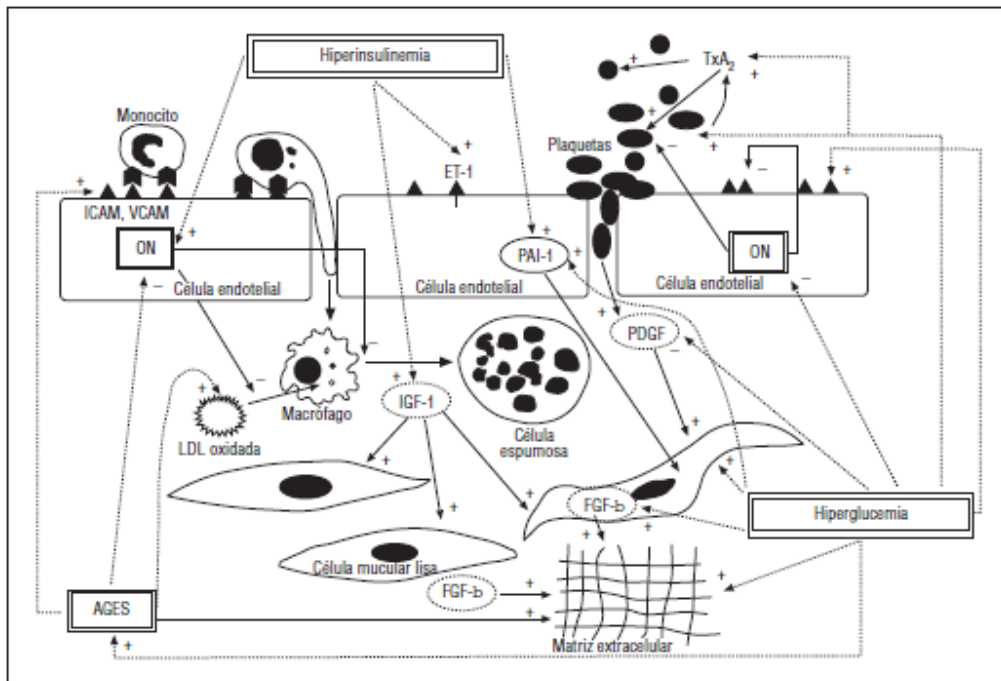
El primer cambio histopatológico en el proceso aterogénico es la acumulación de colesterol ligado a lipoproteína de baja densidad (LDL-c) en el espacio subintimal y la subsecuente oxidación, llevada a cabo principalmente por macrófagos. Las LDL oxidadas (LDLox) son capaces de activar al endotelio suprayacente. Las células endoteliales activadas sintetizan selectinas, moléculas de adhesión y sustancias químico atractivas que facilitan la unión y la posterior migración de linfocitos T y monocitos circulantes al espacio subendotelial. Los monocitos maduran a macrófagos, internalizan las LDLox y se transforman en células espumosas, las cuales producen más radicales libres y liberan nuevas citoquinas para la atracción de más macrófagos y CML. Se ha demostrado que en personas jóvenes, familiares de primer grado de pacientes diabéticos e individuos obesos o resistentes a la insulina presentan disfunción endotelial con una vasodilatación dependiente del endotelio alterada, con independencia de otros factores de riesgo cardiovascular (44).

Experimentalmente, la insulina produce vasodilatación dependiente de NO, pero en presencia de hiperglucemia y de un estado de resistencia a la insulina dicha vasodilatación es abolida. La hiperglucemia disminuye la disponibilidad de NO y aumenta la expresión de moléculas de adhesión en las

células endoteliales. Esto se debe a que la hiperglucemia induce un incremento en la producción de radicales libres y favorece la glicación no enzimática de proteínas y lipoproteínas, con la subsiguiente producción de productos avanzados de la glicación (AGE) (45).

Se ha detectado la acumulación tanto de AGE como de proteínas glicosiladas, en las placas de aterosclerosis de pacientes diabéticos, lo que puede expresar la existencia de un mayor estrés oxidativo en la diabetes (45) (Figura 3).

**Figura 3. Efectos biológicos de la hiperglucemia, hiperinsulinemia y productos AGE sobre las distintas células implicadas en el proceso de la aterosclerosis. Fuente Kirstein M, et al. (45)**



Efectos biológicos de la hiperglucemia, hiperinsulinemia y productos AGE sobre las distintas células implicadas en el proceso de la aterosclerosis. ON: óxido nítrico; ET-1: endotelina 1; PAI-1: Inhibidor 1 del activador del plasminógeno; IGF-1: factor 1 de crecimiento insulina-*Ih*. PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas; FGF-β: factor beta transformador del crecimiento; AGEs: productos avanzados de la glicación; TxA<sub>2</sub>: tromboxano A<sub>2</sub>; ICAM: molécula 1 de adhesión intercelular; VCAM: molécula de adhesión de células vasculares; (+): efecto activador; (-): efecto inhibitor.

### **2.3. Apoptosis**

La apoptosis constituye una forma de muerte celular con características morfológicas y dinámicas distintas de la muerte por necrosis, inducida por un programa intracelular estrechamente regulado en el cual las células destinadas a morir activan enzimas que degradan el propio ácido desoxirribonucleico (ADN) de la célula y las proteínas nucleares y citoplasmáticas (46).

Desde el punto de vista de la arquitectura celular, la apoptosis equilibra el efecto de la proliferación celular. Por ello, las alteraciones de la regulación de la apoptosis pueden participar en el desarrollo de numerosas enfermedades. De hecho esta involucrada en el remodelado de las paredes arteriales asociadas a hipertensión arterial primaria, hipertensión pulmonar primaria, by-pass, o en situaciones postangioplastia. Múltiples estudios tanto en humanos como en animales han comprobado que la apoptosis ocurre en la aterosclerosis coronaria, carotídea y aórtica (46).

Por otro lado, hay evidencias experimentales que sugieren que los mecanismos de oxidación juegan un papel en la apoptosis de las CML vasculares (47).

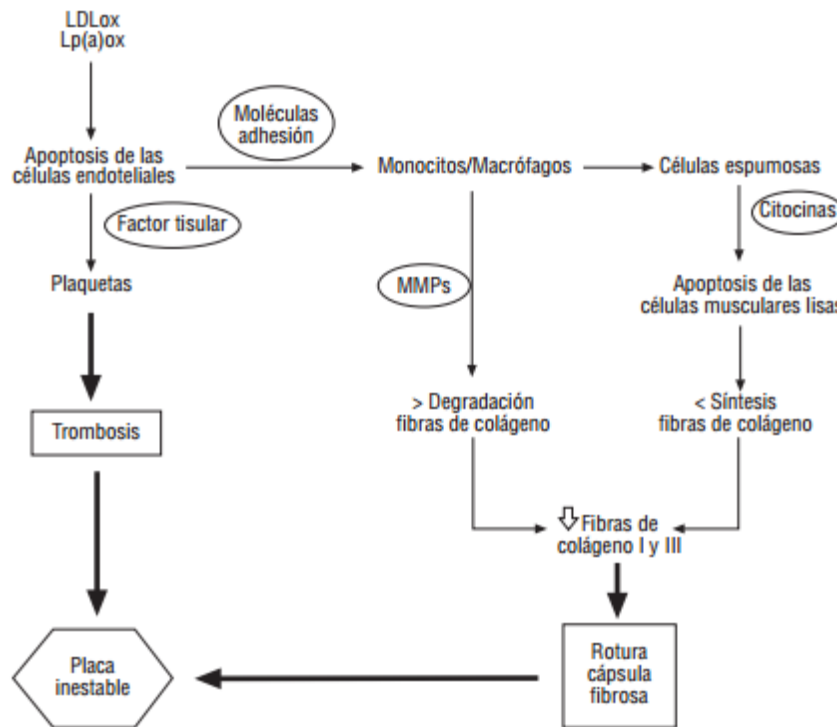
Se ha demostrado inmuno-reacción con antisuero anticaspasa 1 y 3, lo que incrementa la apoptosis en macrófagos de la íntima y del núcleo lipídico del ateroma, así como de las CML de la íntima en la porción fibrótica de la

placa aterosclerótica. El receptor Fas (FasR), está expresado en 2/3 de las células de la capa fibrosa. En el proceso aterosclerótico, el FasR interviene generando inestabilidad de la placa de ateroma al reducir el número de CML con función fagocítica y de células endoteliales de la placa. También produce una disminución de las CML de las placas próximas o contiguas, en un intento de aumentar el diámetro de la luz del vaso de la zona afectada (fenómeno de Glasgow). Todo ello resulta en una disminución del depósito de la matriz extracelular y en su mantenimiento, alterando la integridad de la placa, haciéndola inestable y vulnerable. También se ha implicado en la extensión de la placa al producir junto con la necrosis destrucción de las células espumosas en el core lipídico (48).

Por el contrario, se ha descrito que las CML vasculares que han emigrado al espacio subintimal en una placa aterosclerótica presentan apoptosis más frecuentemente que las células que aún permanecen en la media (49). La exagerada apoptosis de estas células puede ser un factor determinante de la vulnerabilidad de una placa aterosclerótica, pues comportaría una disminución de su número y una menor capacidad para la síntesis de colágeno fibrilar (50). Ello, combinado con la liberación desde los macrófagos de metaloproteinasas de matriz que degradan las fibras de colágeno, daría lugar a una cápsula fibrosa más frágil (51). En el desencadenamiento de la apoptosis de las CML se han implicado diversas citoquinas secretadas por las células espumosas presentes en la lesión (52) (Figura 4).

**Figura 4. Implicación de la apoptosis celular endotelial y en CML en la rotura de la capsula fibrosa y la inestabilidad de la placa de ateroma.**

**Fuente: Hamet P, et al (51)**



Si bien la apoptosis actúa debilitando la capa fibrosa, también interviene, paradójicamente, en el mecanismo de estabilización de la placa de ateroma, puesto que la apoptosis de los macrófagos en la capa fibrosa de la placa evita la destrucción del colágeno. No está claro aún si la apoptosis interviene en la etapa final de la enfermedad aterosclerótica o si su aumento se asocia con estadios tempranos de la aterogénesis (51).

La regulación de la proliferación y de la muerte por apoptosis en las CML vasculares es un mecanismo importante en la configuración de la estructura

normal de la pared vascular en condiciones fisiológicas. Por ello, el predominio de la proliferación celular sobre la apoptosis se ha propuesto como el mecanismo responsable de la acumulación de CML, que facilitaría el engrosamiento de la capa media y de la pared de las arterias pequeñas en la hipertensión arterial y que contribuye a la reestenosis tras la angioplastia (51). Por ello, prevenir el mecanismo de apoptosis podría ser beneficioso para evitar la proliferación celular excesiva que ocurre en situaciones postangioplastia. Se ha observado que la apoptosis está presente en forma paralela a la proliferación celular tras la angioplastia, por lo que sería un determinante mayor de reestenosis (46).

Por tanto, el proceso de apoptosis parece implicado en los mecanismos que favorecen la aterosclerosis vascular, lo que es cuestión de estudio en nuestra hipótesis de trabajo.

## **2.4. Mecanismos inmunitarios**

La lesión aterosclerótica es un proceso inflamatorio en donde la respuesta inmune, tanto celular como humoral, desempeña una función crucial. En estudios desarrollados tanto en humanos como en animales experimentales, se ha evidenciado el infiltrado de células T CD4+ capaces de reconocer a las LDL modificadas y a las proteínas de shock térmico, dos de los principales autoantígenos encontrados en la lesión aterosclerótica, evidenciando el papel de la inmunidad adquirida en la aterogénesis (53).

La importancia de los linfocitos en el establecimiento de la placa aterosclerótica se ha determinado gracias a experimentaciones en modelos animales, productos del cruce entre especímenes con deficiencia en la producción de apolipoproteína E (ApoE) o del receptor de LDL y ratones con delección en el gen activador de la recombinación 2 (RAG2), indispensable para el desarrollo de linfocitos T y B. En algunos estudios, el cruce se realizó con ratones con inmunodeficiencia combinada severa, observándose en todos los casos una reducción en las lesiones ateroscleróticas (54).

En modelos animales se han definido dos tipos de linfocitos T cooperadores Th-1 y Th-2 basados en el perfil de citoquinas que sintetizan. Las citoquinas de tipo Th1 son importantes promotores de la respuesta inmune mediada por células, mientras que las citoquinas Th2 inducen la respuesta inmune mediada por anticuerpos. La principal citoquina producida por las células Th-1 es el interferón  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), la cual ha sido identificada en placas ateroscleróticas humanas. La deficiencia de esta citoquina en ratones con déficit de ApoE se asocia con una reducción en el tamaño de la lesión aterosclerótica (55).

En la etiopatogenia de la aterosclerosis, el INF- $\gamma$  se asocia con el aumento en la internalización vascular de células Th1 y macrófagos, mayor tasa de asimilación de lípidos en macrófagos, incremento en la activación de las células presentadoras de antígenos y mayor secreción de citoquinas por parte de las células Th1 (56).

Las interleukinas 12 y 18 (IL-12 e IL-18) producidas por macrófagos, inicialmente son potentes inductores sinérgicos de INF- $\gamma$  y promueven la diferenciación de linfocitos T en Th1 proaterogénicos, además de la secreción de citoquinas en macrófagos y CML. No obstante, la función aterogénica de la IL-18 en la progresión de la lesión es independiente de la presencia de linfocitos T, según recientes estudios en ratones con inmunodeficiencia combinada severa y déficit para ApoE  $-/-$  (57). Aunque las lesiones ateroscleróticas presentan principalmente linfocitos Th1, es importante señalar que los Th2 secretan interleukinas 4, 5, 10 y 13 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13), involucradas en la proliferación y diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas secretoras de anticuerpos (58).

La deficiencia de IL-5 en ratones con déficit para el receptor de LDL conlleva al aumento de la lesión aterosclerótica (59). De igual forma, la sobreexpresión de IL-10 en linfocitos Th2 inhibe la aterosclerosis en estos ratones, probablemente por sus propiedades anti-inflamatorias sobre los macrófagos (60), presentando una función activa sobre la limitación de la respuesta inflamatoria en la íntima arterial.

En contraste, existe evidencia que la IL-4 a pesar de ser considerada anti-inflamatoria, ejerce un papel proaterogénico al promover el incremento en la expresión de moléculas de adhesión celular vascular tipo 1 (VCAM-1) (61) y de proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 (MCP-1) (62).

Todo esto evidencia la importancia de los linfocitos en la progresión de la lesión aterosclerótica, más que en su iniciación, puesto que la inmunidad adquirida se manifiesta cuando antígenos o epítopes moleculares específicos, como los generados por la LDLox, son reconocidos por receptores de antígenos. Por ende, las células inmunitarias más relevantes en el proceso de aterogénesis son los macrófagos al infiltrar la capa íntima arterial como consecuencia de la disfunción endotelial.

## **2.5. Metabolismo Lipídico. Anticuerpos Anti LDL-oxidada.**

El metabolismo lipídico desempeña una función crítica en el proceso aterogénico. La hiperlipidemia contribuye a la aterogénesis a través de varios mecanismos:

- La hiperlipidemia crónica, en particular la hipercolesterolemia, puede alterar directamente la función de las células endoteliales a través de la producción aumentada de radicales libres de oxígeno, que desactivan el NO. En caso de hiperlipidemia crónica, las lipoproteínas se acumulan dentro de la íntima en los sitios con permeabilidad endotelial aumentada (63).
- El cambio químico de los lípidos, inducido por los radicales libres generados en los macrófagos o las células endoteliales de la pared arterial, produce LDLox. Las LDLox son ingeridas por los macrófagos para formar células espumosas, además de aumentar la acumulación de monocitos en las lesiones así como estimular la liberación de factores de crecimiento y de citoquinas (63).

El depósito y salida de lipoproteínas del espacio subendotelial es un proceso fisiológico normal. Su permanencia en este espacio viene condicionada por el flujo de entrada de estas lipoproteínas y de su resistencia a las modificaciones oxidativas que suponen un cambio en su comportamiento biológico. Los LDL modificadas, sobre todo las oxidadas, son citotóxicas y lesivas para el endotelio, quimiotácticas para los monocitos e inhibidoras de la migración de los macrófagos. Las LDL oxidadas inducen la expresión del TNF- $\alpha$  y de interleukina 1 (IL-1), las cuales favorecen la expresión endotelial de moléculas de adhesión endotelial (ICAM-1, VCAM-1) y la síntesis de factores quimiotácticos de monocitos y linfocitos (MCP-1) por las células endoteliales. Esto favorece la unión de los monocitos y linfocitos circulantes al endotelio disfuncionante y la posterior migración de estas células al espacio subendotelial, promoviendo, al mismo tiempo, la diferenciación de los monocitos a macrófagos los cuales fagocitan las LDLox para transformarse en células espumosas, iniciándose así la formación de la «estría grasa» (64).

La capacidad aterogénica de las LDL radica en que, al ser partículas más pequeñas, con menor contenido lipídico, presentan una distribución espacial diferente, permaneciendo más tiempo en circulación y aumentando su probabilidad de ingresar a la pared vascular y ser oxidadas (63).

Además, por su menor tamaño, se produce una aproximación en las cargas positivas de los aminoácidos arginina y lisina en la cadena peptídica de la apolipoproteína B (ApoB) aumentando la afinidad por los proteoglicanos de

la pared vascular. Finalmente, al ser más pequeñas atraviesan cómodamente la íntima llegando al subendotelio, donde la oxidación se ve favorecida por su menor contenido de alfa-tocoferol, un antioxidante lipofílico (63).

Como consecuencia de la oxidación se producen cambios importantes en la estructura de la lipoproteína. A nivel lipídico, los ácidos grasos poliinsaturados que esterifican al colesterol, triglicéridos y fosfolípidos dan origen a hidroxiácidos, peroxiácidos y aldehídos. A nivel proteico, los aldehídos formados actúan sobre los grupos amino de la lisina presente en la ApoB, neutralizando las cargas positivas de la cadena peptídica, de manera que ésta se torna más frágil y finalmente se fragmenta. A partir de ese momento, la LDL deja de ser reconocida por los receptores y pasa a ser catabolizada por los macrófagos a través de los receptores scavenger. Probablemente la lisofosfatidilcolina, un componente mayoritario de las LDLox que se forma por oxidación de ésta, presente en las LDL, sea quien produzca la activación de las células del endotelio vascular, desencadenando una secuencia de eventos en la que intervienen distintos tipos celulares que se relacionan entre sí por medio de citoquinas, y que conducen, finalmente, a la formación de la placa ateromatosa (65).

Ha sido descrito un receptor de superficie en las células del endotelio vascular capaz de unir las LDLox denominado receptor de LDLox unido a Lecitina 1 (LOX-1), el cual desempeña una importante función en el proceso de activación endotelial (66) .

Los macrófagos en el ambiente subendotelial expresan distintos receptores de membrana capaces de unir LDLox. Entre ellos, destacan los receptores scavenger. Su síntesis no depende del nivel de colesterol presente dentro de la célula, de manera que el macrófago incorpora grandes cantidades de lípidos formando inclusiones citoplasmáticas que le dan un aspecto espumoso cuando se observan al microscopio electrónico. Cuando estas células mueren, su alto contenido de lípidos pasa a formar el núcleo, también denominado core lipídico, de la placa de ateroma (67).

Por otro lado, los macrófagos activados son capaces de sintetizar lipoproteínlipasa (LPL) y ApoE. La LPL se une a los proteoglicanos del endotelio transformando lipoproteínas ricas en triglicéridos en formas aterogénicas. La ApoE interviene en el flujo del colesterol presente en la pared vascular en combinación con la HDL, produciéndose un balance de colesterol dentro de la pared arterial (63,67).

Actualmente, se considera que un evento clave para el desarrollo de una placa de ateroma in vivo es la oxidación de la LDL, a través de mecanismos que involucran cadenas de reacción de radicales libres, que afectan tanto a la porción proteica como lipídica de la lipoproteína, dotándola de características proaterogénicas (68). Si bien la oxidación de la LDL puede ser desencadenada in vitro por múltiples oxidantes, resulta aún difícil definir cuáles son los mecanismos fisiológicos de oxidación de la lipoproteína.

Existen evidencias de que la oxidación de la LDL podría ser desencadenada tanto en la circulación como en la propia pared arterial, donde la LDL resulta parcialmente retenida mediante interacciones con los proteoglicanos y otros componentes de la matriz extracelular. Sin embargo, es más probable que ocurra en la propia pared arterial, ya que estaría menos protegida por el menor contenido de antioxidantes con respecto al plasma (69).

Los probables mecanismos que podrían desencadenar la oxidación de la LDL en la pared arterial incluyen la presencia de iones metálicos activos (cobre, hierro); enzimas como lipoxigenasa y mieloperoxidasa; las propias células vasculares locales (en particular los macrófagos y otros leucocitos y las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno). Del análisis de la estructura de la LDL, surge como evidente la ausencia de mecanismos antioxidantes potentes en el núcleo hidrofóbico de la partícula, uno de los sitios principales de formación de los productos de la lipoperoxidación. El NO representa el principal antioxidante fisiológico capaz de inhibir la lipoperoxidación en el núcleo hidrofóbico de la partícula de LDL (70,71).

La acumulación de colesterol en las lesiones ateroscleróticas no es debida a la captación celular de las LDL nativas, por medio del receptor de las LDL, sino que se debe a la captación de una forma modificada de las LDL y por el receptor scavenger. Estas conclusiones se basan en dos observaciones bien documentadas.

En primer lugar, los individuos que carecen completamente de receptores de LDL acumulan colesterol a nivel de células espumosas, de las placas de ateroma, en grado similar como lo hacen los sujetos que poseen niveles normales de dicho receptor. En segundo término, los dos tipos celulares que en el caso de las lesiones arteriales dan lugar a la formación de las células espumosas, los monocitos/macrófagos y las CML, no acumulan colesterol in vitro aún en presencia de altas concentraciones de LDL nativas. Esta aparente contradicción se elimina si las LDL circulantes sufren algún tipo de modificación postsecreción ya que estas partículas de LDL modificadas, sirven como ligandos para "entregar" el colesterol a los precursores de las células espumosas (72).

Por otro lado, se descubrió que la simple incubación in vitro de la LDL como una monocapa de células endoteliales o con CML, la convierte en una forma de LDL modificada que es captada más rápidamente por los macrófagos que por la vía del receptor scavenger, lo que genera un incremento del contenido celular de colesterol. Las células endoteliales desencadenan modificaciones oxidativas en la partícula lipoproteica, y el agregado de antioxidantes al medio de cultivo bloquea completamente estos cambios. Estas modificaciones de tipo oxidativo de la estructura de las lipoproteínas afectan significativamente su aterogenicidad (73).

Todas estas evidencias constituyen la base molecular para el desarrollo de una hipótesis patogénica de la aterosclerosis: la hipótesis de la modificación oxidativa, la cual plantea que la LDL modificada oxidativamente pero no la LDL

nativa (sin modificar), es captada por los receptores scavenger de los monocitos/macrófagos y de las CML en la íntima de las arterias (73).

La LDLox es también citotóxica para las células vasculares, ya que aumenta la disfunción endotelial y la liberación de lípidos y enzimas lisosomales en el espacio extracelular subendotelial, perpetuando el foco inflamatorio y promoviendo la progresión de la lesión aterosclerótica. Asimismo, altera la producción endotelial y la bio disponibilidad de NO e inhibe la óxido nítrico sintasa inducible en macrófagos, neutrófilos y plaquetas. La molécula de LDLox es por tanto la más aterogénica, ya que participa en varios procesos que conducen a la formación de la placa de ateroma, tales como la inducción de la lesión endotelial, la acumulación de los monocitos-macrófagos y la formación de células espumosas (72,73). La modificación oxidativa de las LDL induce la formación de epítomos inmunogénicos en la partícula de LDL-c, lo que conduce a la formación de anticuerpos anti-LDLox que se pueden detectar en el suero (74), especialmente en pacientes con lesiones ateroscleróticas avanzadas (75). Los anticuerpos anti-LDLox reaccionan con las lesiones ateroscleróticas pero no con segmentos arteriales. La función de los anticuerpos anti-LDLox en el desarrollo de la aterosclerosis es complejo y queda por determinar.

Los niveles de anticuerpos anti-LDLox se han detectado para predecir la progresión de las lesiones ateroscleróticas carotideas, habiéndose encontrado un aumento significativo en pacientes con enfermedad coronaria y con enfermedad vascular periférica (76).

Sin embargo, la importancia clínica de estos anticuerpos en diferentes patologías cardiovasculares sigue siendo objeto de debate.

La composición de la molécula de LDL es diferente entre distintos individuos, de tal modo que el grado de modificación oxidativa es difícil de controlar y evaluar, y por tanto no es posible determinar los niveles de anticuerpos contra los diferentes epítomos en las partículas de LDLox. En este sentido, en los estudios realizados hasta la fecha, podemos encontrar importantes controversias.

Se ha descrito una asociación inversa entre los niveles de anticuerpos anti-LDLox con los niveles de colesterol en población general (77) y con las cifras de presión arterial en mujeres hipertensas (78). Otros estudios han encontrado una reducción de los niveles de anticuerpos anti-LDLox con la mejoría del metabolismo de los hidratos de carbono en pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica (79). Sin embargo, en pacientes con hipercolesterolemia familiar no se ha evidenciado que el nivel de anticuerpos anti-LDLox esté incrementado (80). En pacientes diabéticos, los niveles de anticuerpos anti-LDLox están inversamente relacionados con el grado de control glucémico y con la presencia de complicaciones microvasculares (82).

La edad y el sexo son otras dos variables antropométricas que también pueden influir en los niveles de dichos anticuerpos. En un estudio realizado sobre 1354 personas concluye que los niveles de anticuerpos antiLDL fueron

mayores en personas entre 5-15 años que en personas mayores de 40 años y principalmente más en mujeres que en hombres, lo cual está en consonancia con otros estudios que encontraron asociación inversa entre la aterosclerosis y la presencia de anticuerpos anti LDLox (82).

Está ampliamente demostrado, por tanto, que el proceso aterosclerótico está influenciado por diferentes vías de señalización, como la inflamación y el metabolismo de los lípidos, principalmente, pero también se asocia con otros procesos tales como la apoptosis o el ciclo celular. Sin embargo, la asociación de anticuerpos anti-LDLox en el proceso aterosclerótico no ha sido ampliamente investigado.

## **2.6. Diabetes Mellitus**

La diabetes mellitus, es una enfermedad caracterizada por un estado de hiperglucemia crónica, cuya morbilidad y mortalidad a largo plazo deriva de las consecuencias del desarrollo de la enfermedad vascular aterosclerótica. La DM2 es la forma más frecuente y su prevalencia está aumentando de manera paralela al incremento de la edad poblacional y a la creciente incidencia de la obesidad e inactividad física en las sociedades de países desarrollados.

La cardiopatía isquémica representa la principal causa de muerte en pacientes con DM2. Existen evidencias de que los pacientes con DM2 que no han sufrido un síndrome coronario agudo tienen el mismo riesgo de padecerlo que aquellos no diabéticos que lo han sufrido previamente, de ahí que se haya

definido a la DM2 como un equivalente coronario. Además, el riesgo de muerte por un acontecimiento cardiovascular en los pacientes diabéticos es entre dos y cuatro veces mayor que en la población no diabética (83).

Este exceso de mortalidad es más elevado en mujeres (cuatro-cinco veces) que en varones (dos-tres veces). A pesar de que en los últimos años se ha constatado una disminución en la mortalidad de causa coronaria, debido probablemente a los avances en el tratamiento médico como el uso de agentes fibrinolíticos, antiagregantes, estatinas, beta bloqueantes e insulino terapia, los pacientes diabéticos con enfermedad coronaria continúan presentando un exceso de mortalidad respecto a la población no diabética. Por todo ello, la Asociación Americana de Cardiología considera la DM2 no como un simple factor independiente de riesgo, sino como una «verdadera enfermedad cardiovascular» (84).

En este sentido, es interesante conocer la influencia de la diabetes en el proceso inflamatorio y aterosclerótico que favorece la formación de la placa de ateroma. Nuestro grupo ha publicado recientemente un estudio sobre la sobreexpresión de marcadores inflamatorios en pacientes con DM2 (85). Los resultados mostraban que los monocitos de los pacientes diabéticos con lesiones ateroscleróticas avanzadas presentaban mayores niveles de MCP-1 y de IL-6, y menores niveles de toll-like receptor 2 (TLR2) que los sujetos sanos. Los pacientes con cifras de HbA1c  $\leq$  6,5% tenían niveles de expresión más bajos de IL-6 que aquellos con HbA1c más elevadas, lo que sugiere que el

control de la glucemia podría prevenir el estado inflamatorio asociado con la DM 2 (85).

En este mismo trabajo, se realizó un estudio "in vitro" con monocitos expuestos a concentraciones altas y bajas de glucosa junto a la ausencia o presencia de insulina. Los resultados demuestran que el estado hiperglucémico induce una expresión de MCP-1 y IL-6 y reduce la expresión de TLR2, mientras que la adición de insulina a alta dosis (100 UI/ml) aumenta considerablemente los efectos de la hiperglucemia sobre MCP-1 e IL-6 y reduce la expresión de TLR2. En conjunto, estos datos sugieren que tanto la hiperinsulinemia como la hiperglucemia contribuyen a alterar la expresión de estos genes proinflamatorios, lo que puede tener consecuencias en el proceso aterogénico ligado a la diabetes (85).

Por otro lado, nuestro grupo también ha estudiado el papel fisiopatológico del receptor scavenger CD36 (cluster de diferenciación 36) en la aterosclerosis (86). La expresión de CD36 parece depender en gran medida de su función proinflamatoria y la capacidad para asumir LDLox. A día de hoy existe controversia en relación con los posibles efectos beneficiosos / perjudiciales de la inhibición de CD36 en la aterosclerosis. El objetivo de dicho estudio es analizar si la expresión de CD36 en monocitos es modulada por la presencia de un número creciente de factores de riesgo ateroescleróticos, y específicamente por la hiperglucemia.

El estudio incluye a 33 pacientes con aterosclerosis avanzada y 8 donantes de sangre sanos como controles. Los pacientes fueron clasificados de acuerdo a la presencia de factores de riesgo aterosclerótico.

Los monocitos fueron expuestos in vitro a bajas (5,5 mM) o altas concentraciones de glucosa (26 mM). Los resultados demuestran que los niveles de proteína CD36 total y glicosilada son significativamente mayores en los pacientes con 3-4 factores de riesgo aterosclerótico que en aquellos con 0-2 factores de riesgo aterosclerótico o en sujetos sin antecedentes de infarto de miocardio (86).

Por otro lado, los niveles de proteína CD36 no glicosilada son significativamente mayores en pacientes diabéticos mal controlados, respecto a los pacientes con diabetes bien controlada o sujetos sin diabetes. Estos datos fueron corroborados por estudios in vitro que demostraron que el aumento de las concentraciones de glucosa reducía los niveles de proteína CD36 glicosilada. En conclusión, la expresión de CD36 se ve alterada por la hiperglucemia y la sobreexpresión de CD36 puede jugar un papel crucial en la aterotrombosis (86).

### **3. Controversias sobre el beneficio del control glucémico en la prevención de complicaciones cardiovasculares en la diabetes tipo 2.**

Aunque existe una clara relación epidemiológica entre la diabetes y la enfermedad aterosclerótica, los estudios de intervención no han demostrado hasta la fecha que el control glucémico estricto prevenga la morbimortalidad cardiovascular.

El potencial beneficio cardiovascular que aporta un adecuado control glucémico se basa en estudios observacionales y en un metaanálisis (87), que concluye que un incremento del 1% de la HbA1c se relaciona con un RR de enfermedad cardiovascular de 1,18 (IC 95%: 1,10-1,26). En el estudio UKPDS, el desarrollo de microcomplicaciones en paciente con DM2 estuvo muy ligado al control glucémico (con una reducción del RR [RRR] del 25% en 10 años en el grupo de terapia intensiva respecto al grupo control), pero la relación entre la HbA1c y el infarto agudo de miocardio fue menor (RRR: 16%) (88). Sólo los pacientes con DM2 y sobrepeso tratados con metformina mostraron una reducción significativa de infarto de miocardio (RRR: 39%;  $p = 0,01$ ) y de mortalidad total (RRR: 36%;  $p = 0,01$ ). En pacientes con DM2 bien controlada (HbA1c < 6%), la incidencia de infarto de miocardio fue 2-3 veces mayor que la de lesiones microvasculares, lo que demuestra la importancia de otros factores de riesgo, incluida la disglucemia en rango no diabético, en la patogenia de la aterosclerosis (88).

El seguimiento observacional de 10 años postintervención del estudio UKPDS (89), concluyó que el control glucémico intensivo en pacientes con DM2 de diagnóstico reciente (como era el caso de los pacientes incluidos en este estudio) aporta, además del establecido beneficio microvascular, un beneficio cardiovascular a largo plazo, reduciendo tanto el riesgo coronario como la mortalidad cardiovascular y global, a pesar de que a partir del primer año postintervención desaparecieron las diferencias de HbA1c entre los grupos.

Este fenómeno, también observado en la diabetes tipo 1 (estudio DCCT-EDIC) (90), ha sido denominado “efecto legado” o “memoria metabólica”. Hasta ahora, las estrategias de prevención cardiovascular en los pacientes con diabetes resaltaban la importancia del control tensional y lipídico. A partir de este estudio, debería añadirse la importancia del control glucémico, al menos en sujetos jóvenes o de edad media, con DM2 de inicio y sin enfermedad cardiovascular (91).

El UKPDS reclutó a una población relativamente joven (con una media de edad de 53 años) con DM2 de inicio, y en su mayoría sin comorbilidad asociada importante, por lo que sus resultados no deben ser generalizados a otras poblaciones, como ancianos o pacientes diabéticos con enfermedad cardiovascular asociada (88, 91).

Otros estudios, como el STENO-2 (92), ha demostrado que en pacientes con DM2 y microalbuminuria, una intervención multifactorial sobre los distintos

factores de riesgo (control glucémico en asociación con inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina, ácido acetilsalicílico, estatinas y modificación del estilo de vida) reduce casi un 60% la mortalidad cardiovascular durante un periodo de 13 años, a pesar de que el objetivo de control glucémico (HbA1c < 6,5%) se alcanzó en menos del 20% de los pacientes. Estos resultados refuerzan la idea de que, en los pacientes con DM2, el efecto protector vascular del control glucémico intensivo puede ser menor que otras intervenciones como la reducción de la presión arterial o el tratamiento de la hipercolesterolemia (93).

En febrero de 2008, el National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) y el National Institute of Health (NIH) de los EEUU comunicaron la suspensión prematura a los 3,5 años (17 meses antes de lo previsto) del estudio ACCORD, cuyo objetivo era alcanzar un control glucémico estricto (HbA1c <6%), al encontrar en un análisis interino de seguridad un exceso de mortalidad global (22%) respecto al grupo de control glucémico convencional (HbA1c entre 7 y 7,9%) (94). El ACCORD parece cuestionar la conveniencia de plantear un control glucémico ultraintensivo, con objetivos de HbA1c inferiores a los recomendados en las actuales guías, al menos en población con DM2 de alto riesgo cardiovascular (94).

Simultáneamente, se comunicaron los resultados del estudio ADVANCE que, en una población similar a la del ACCORD, concluyó que el tratamiento intensivo de la DM2 durante un seguimiento medio de 5 años reduce las complicaciones microvasculares (sobre todo la nefropatía), pero no las

macrovasculares. A diferencia del ACCORD, en el ADVANCE no se registró un incremento de la mortalidad en el grupo de terapia intensiva, pese a que los niveles de HbA1c alcanzados fueron similares en ambos estudios (del 6,4% frente al 7,5% en el ACCORD, y del 6,5% frente al 7,3% en el ADVANCE, con terapia intensiva y convencional, respectivamente) (95).

Se han postulado diversas explicaciones sobre la mayor mortalidad relacionada con el control glucémico estricto observada en el ACCORD. Entre ellas, la mayor incidencia de hipoglucemias (sintomáticas o asintomáticas), el marcado incremento del peso corporal de algunos pacientes, el rápido descenso alcanzado de la HbA1c (al inicio del estudio era mayor en el ACCORD que en el ADVANCE, del 8,1% frente al 7,2%), o las posibles interacciones medicamentosas en relación con la polimedicación o la insulino terapia intensiva. Debe señalarse que esta mayor mortalidad no parece asociada a ningún medicamento específico ni a ninguna combinación de fármacos en particular (94).

Posteriormente, se comunicaron los resultados del estudio VADT, realizado en una población, (casi exclusivamente masculina, de pacientes con DM2 mal controlados (HbA1c basal: 9,4%). Tras 5 años de seguimiento, y tras realizar un tratamiento intensivo de los demás factores de riesgo en toda la población del estudio, el tratamiento antidiabético intensivo para alcanzar una HbA1c del 6,9% no aportó beneficios cardiovasculares sobre la mortalidad ni en las complicaciones microvasculares respecto al tratamiento antidiabético convencional (96).

En este estudio, los episodios de hipoglucemia, la presencia de enfermedad cardiovascular previa, la edad, la cifra de HbA1c y unos niveles bajos de HDL-c fueron factores pronóstico de un mayor riesgo cardiovascular con terapia intensiva (96).

Debemos remarcar que los resultados de estos tres estudios no son aplicables a pacientes con DM2 de bajo riesgo (jóvenes, sin otros factores de riesgos asociados ni enfermedad cardiovascular, o con DM2 de corta evolución). De hecho, el análisis de subgrupos del ACCORD sugiere que el control glucémico estricto podría ser beneficioso desde el punto de vista cardiovascular en sujetos sin enfermedad vascular previa o con HbA1c < 8%. Asimismo, el análisis *post hoc* del VADT encontró un beneficio cardiovascular con el tratamiento antidiabético intensivo en los pacientes con diabetes de menos de 12 años de evolución, así como en los que presentaban bajos scores de calcio coronario y aórtico (91).

. Los actuales consensos recomiendan un abordaje intensivo y proactivo de la diabetes, con objetivos de HbA1c inferiores al 7 o el 6,5% en la mayoría de los casos. El paradigma «cuanto más baja la glucemia más beneficio» puede ser cuestionado tras los resultados del ACCORD (94), ya que reducir la glucemia por debajo de las recomendaciones vigentes (hasta niveles normoglucémicos, con HbA1c <6%) parece aumentar la mortalidad en los pacientes con DM2 de edad media-avanzada con alto riesgo vascular. En individuos seleccionados (con larga expectativa de vida, escasa comorbilidad y

bajo riesgo de hipoglucemias) podría ser deseable un objetivo de HbA1c <6% (97)

En síntesis, estos trabajos sugieren que, en comparación con el control de otros factores de riesgo, el beneficio CV del control glucémico intensivo es discreto y a largo plazo. Como ocurre con las complicaciones microvasculares, parece que el control glucémico es más importante para prevenir las complicaciones macrovasculares antes de que éstas aparezcan, mientras que su impacto es menor o nulo en pacientes con arteriosclerosis más avanzada. En consecuencia, las actuales guías preconizan una intervención multifactorial sobre todos los factores de riesgo y unos objetivos individualizados de control glucémico (97).

## **2. OBJETIVOS.**

1. Estudiar la expresión génica de diferentes biomarcadores implicados en el proceso aterogénico (apoptosis, inflamación, metabolismo lipídico) en muestras de arteria poplítea ocluida y de arteria mamaria en pacientes con diabetes tipo 2.
2. Estudiar la influencia del control glucémico en la expresión génica de diferentes biomarcadores implicados en el proceso aterogénico (apoptosis, inflamación, metabolismo lipídico) en muestras de arteria poplítea ocluida en pacientes con diabetes tipo 2.
3. Analizar la correlación entre los niveles plasmáticos de anticuerpos anti-LDL oxidada IgG e IgM y la expresión génica de diversos biomarcadores implicados en el proceso aterogénico (apoptosis, inflamación, metabolismo lipídico) en muestras de arteria poplítea ocluida en pacientes con diabetes tipo 2.

### **3. MATERIAL Y MÉTODO.**

#### **3.1. Tipo de estudio**

#### **3.2. Lugar y realización del estudio**

#### **3.3. Población**

##### **3.3.1 Criterios de inclusión**

##### **3.3.2. Criterios de exclusión**

#### **3.4. Variables recogidas**

##### **3.4.1. Variables de caracterización de la muestra**

##### **3.4.2. Variables resultado.**

#### **3.5. Técnicas realizadas**

##### **Estudio anatómico-patológico**

##### **3.5.1. Análisis histológico de las biopsias humanas**

##### **Estudios de expresión génica**

##### **3.5.2. Aislamiento y cuantificación del ARN**

##### **3.5.3. PCR en tiempo real**

##### **3.5.4. Aislamiento y cuantificación de proteínas**

##### **3.5.4.1. Extracción de Proteínas.**

##### **3.5.4.2. Cuantificación de Proteínas**

##### **3.5.4.3. Western Blot**

##### **3.5.5. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)**

#### **3.6. Análisis estadístico**

### **3.1. Tipo de estudio**

Se trata de un estudio transversal. El protocolo de estudio cumplió con los principios de la Declaración de Helsinki. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Regional Universitario de Málaga y todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito para participar en dicho estudio.

### **3.2. Lugar y tiempo de realización del estudio**

Todos los pacientes fueron hospitalizados en el Servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital Regional Universitario de Málaga entre febrero de 2007 y junio de 2008.

### **3.3. Población**

En este estudio se incluyeron pacientes con DM2 diagnosticados de un proceso de aterosclerosis avanzada como la enfermedad arterial periférica o la cardiopatía isquémica (EAP o CI).

Todos los pacientes con EAP presentaron una isquemia crítica que requirió la amputación supracondílea del miembro inferior afectado. Como controles, fueron reclutados pacientes con cardiopatía isquémica que precisaron bypass coronario.

Los pacientes amputados por EAP fueron divididos en dos grupos según su grado de control glucémico previo al ingreso: pacientes bien controlados (HbA1c  $\leq$ 6,5%) y mal controlados (HbA1c  $>$ 6,5%). Todos los controles

sometidos a bypass coronario presentaban buen control metabólico (HbA1c  $\leq 6,5\%$ ).

Los pacientes fueron ingresados en el hospital 72 horas antes de la cirugía. Durante su hospitalización, el tratamiento antidiabético fue modificado según el protocolo local, suspendiéndose los antidiabéticos orales e instaurándose una pauta con insulina basal más corrección y bolos prandiales de insulina rápida.

### **3.3.1. Criterios de inclusión:**

1. Pacientes de ambos sexos, de cualquier raza y edad comprendida entre 18-80 años.
2. Diagnóstico de DM2.
3. Diagnóstico de enfermedad aterosclerótica avanzada. Casos: pacientes con EAP oclusiva en estadio IV sometidos a amputación supracondílea de miembros inferiores. Controles: pacientes con CI tributarios de bypass coronario programado.
4. Firma del consentimiento informado para su participación en el estudio.

### **3.3.2. Criterios de exclusión:**

1. Por protocolo:
  - Edad  $<18$  años o  $>80$  años.
  - Denegación del consentimiento.
  - Pacientes terminales oncológicos y no oncológicos.

- Enfermedad mental severa, alcoholismo o drogadicción activos.
2. Por influencia en el recuento leucocitario:
- Discrasias sanguíneas.
  - Inmunodeficiencias congénitas o adquiridas.
  - Tratamiento inmunosupresor o corticoideo activo.
3. Por influencia sobre la HbA1c
- Anemias.
  - Cirrosis hepática.
  - Insuficiencia renal crónica moderada-avanzada (filtrado glomerular estimado  $< 60 \text{ ml/min/m}^2$ )

### **3.4. Variables estudiadas**

#### **3.4.1. Variables de caracterización de la muestra**

##### **Variables clínico-epidemiológicas**

- Sociodemográficas: edad (años): cuantitativa continua; sexo: cualitativa dicotómica.
- Clínico-metabólicas (variables cuantitativas continuas): peso (kg); talla (cm), IMC: cociente entre peso y talla ( $\text{kg/m}^2$ ); perímetro cintura abdominal (cm), presión arterial (mmHg). La presión arterial se tomó con el paciente en sedestación, con un tensiómetro automático validado (OMRON 705 CP). Se realizaron 3 determinaciones, separadas entre sí por 2 minutos y se adoptó como presión arterial final la media de las 2 últimas tomas, desechando la primera.

- Consumo de fármacos (cualitativa dicotómica). Se consideró relevante para el estudio registrar los siguientes grupos farmacológicos: antiagregantes, anticoagulantes, hipoglucemiantes orales, insulinas, estatinas, otros hipolipemiantes, y antihipertensivos.
- Caracterización de antecedentes personales (cualitativa dicotómica).

La definición de los factores de riesgo vascular se ajustó a las recomendaciones de las actuales guías de práctica clínica:

- **DM2**. La DM2 se diagnosticó cuando el paciente recibía tratamiento antidiabético previo al ingreso o, de acuerdo con la definición de la ADA (97), en pacientes sin antecedentes de diabetes que durante su hospitalización presentaron niveles repetidos de glucemia en ayunas  $\geq 126$  mg/dl y HbA1c  $\geq 6,5\%$ , para excluir estados de hiperglucemia de estrés asociada al ingreso hospitalario.
- **Hipertensión arterial**. Se consideró hipertenso al paciente que recibía tratamiento antihipertensivo previo a su ingreso.
- **Dislipemia**: presencia de hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia. Para la definición de hipercolesterolemia seguimos los criterios del NCEP-ATPIII 2001(98), considerándose diagnósticas cifras reiteradas de colesterol total  $\geq 200$  mg/dL y de LDL  $\geq 160$  mg/dL. También se consideró diagnóstico el consumo de estatinas siempre que éste fuera previo al diagnóstico del evento cardiovascular. Para la fracción HDL, los límites fueron niveles  $\leq 40$  mg/dL en varones y  $\leq 50$  mg/dL en mujeres. Se consideró el diagnóstico de hipertrigliceridemia la presencia en el historial clínico del paciente de cifras reiteradas de triglicéridos  $\geq 150$

mg/dL o estar recibiendo tratamiento específico en el momento de inclusión (98).

- **Obesidad.** Presencia de un IMC  $\geq 30$  Kg/m<sup>2</sup>.
- **Tabaquismo** Consumo activo, auto-reportado por el paciente, de cualquier cantidad de tabaco. Para considerarse exfumador el paciente debía haber interrumpido dicho hábito al menos 6 meses antes del ingreso.

Los criterios diagnósticos de enfermedad cardiovascular los definimos de la siguiente forma:

- **Enfermedad Arterial Periférica (EAP).** Cuando el paciente presentaba clínica compatible, fundamentalmente en forma de claudicación intermitente o isquemia aguda de miembros inferiores y se había comprobado el diagnóstico mediante técnicas de imagen: ecografía con doppler color, angiografía o angio-resonancia magnética de miembros inferiores.
- **Cardiopatía isquémica (CI).** Cuando presentaba historia de síndrome coronario agudo compatible con angina con criterios de riesgo (cambios electrocardiográficos, elevación de biomarcadores de daño miocárdico o síntomas sugestivos) al menos 6 meses antes de ingreso. Además debían presentar pruebas complementarias que apoyaban el diagnóstico: cateterismo coronario, TAC coronario, gammagrafía cardiaca o ergometría patológica.

- **Enfermedad cerebrovascular.** Si el paciente había presentado clínica compatible con accidente cerebrovascular isquémico transitorio o ictus, o presentaba estenosis carotídea >70% en angiografía de troncos supraórticos.

**VARIABLES ANALÍTICAS** (variables cuantitativas continuas):

- Glucemia en ayunas (mg/dL): se determinó mediante el método de la glucosa-oxidasa adaptado a un auto-analizador (Dimension®, Dade Behring, Alemania).
- HbA1c (%): mediante cromatografía.
- Colesterol total (mg/dL): se midió por métodos enzimáticos utilizando equipos comerciales (Dimension®, Dade Behring, Alemania).
- HDL-c (mg/dL): se midió por métodos enzimáticos utilizando equipos comerciales (Dimension®, Dade Behring, Alemania).
- LDL-c (mg/dL): se calculó por la fórmula de Friedewald (99): colesterol total - HDL - triglicéridos/5, donde todos los factores se expresan en mg/dL.
- Triglicéridos (mg/dL) medidos por métodos enzimáticos utilizando equipos comerciales (Dimension® Dade Behring, Alemania).
- Insulina basal en suero ( $\mu\text{U/mL}$ ) cuantificada por el método de radioinmunoanálisis (RIA).

- Índice HOMA-R (Modelo de valoración de la homeostasia- resistencia a la insulina). Método empleado para definir la insulín-resistencia aplicando la siguiente fórmula:  $(\text{insulina en ayunas } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glucemia basal (mg/dL)})/405 \cdot (100)$ .

### **3.4.2. Variables resultados**

- Expresión de RNA de diferentes biomarcadores en unidades arbitrarias.
- Expresión de proteínas en unidades arbitraria.

### **3.5. Técnicas realizadas**

Las biopsias de los distintos vasos sanguíneos (AMI, VF y APO) obtenidos tras las cirugías correspondientes, fueron empleadas para la realización de varios tipos de experimentación, por lo que fueron divididas en varias secciones.

Unas secciones fueron analizadas de forma anatómo-patológica y por ello fueron inmediatamente incluidas en paraformaldehído al 4%, y otras, fueron utilizadas para la realización de estudios de expresión génica, por lo que estas secciones fueron rápidamente congeladas en nitrógeno líquido.

## **Estudio anatómico-patológico**

### **3.5.1. Análisis histológico de las biopsias humanas**

Para estudiar las estructuras de las biopsias obtenidas, certificando que la AMI era una arteria sana, sin placas de ateroma, al igual que la vena femoral, así como verificar que la APO, era una arteria ocluida por una placa de ateroma, fue realizado el estudio anatómico-patológico de las mismas.

Para ello, las biopsias fueron inmediatamente sumergidas en una solución de fijación (paraformaldehído al 4%), cuyo volumen fue 20 veces mayor que el de las muestras introducidas en él. En este fijador, las biopsias fueron almacenadas durante dos días, tiempo estimado para que el tejido vascular ni se encoja ni se endurezca mucho.

Una vez fijadas las muestras, se procedió a la inclusión de las mismas. Este procedimiento se basa en impregnar las biopsias de una sustancia líquida que luego se solidifica. Nosotros utilizamos parafina, la cual, penetra en los espacios intracelulares y el interior celular de los vasos sanguíneos a estudiar. Antes de embeber las muestras en parafina, los tejidos fueron deshidratados porque la parafina no es soluble en agua. Debido a esto, pasamos el tejido por una gradación creciente de alcoholes (70° hasta 100°).

Por último, se procedió al aclaramiento del tejido con una sustancia miscible tanto en el alcohol como con el medio de inclusión a utilizar. Se llama aclaramiento ya que el tejido se torna transparente o claro, debido a que cambia su índice de refracción. Nosotros usamos el xilol para realizar este

aclaramiento. Con la inclusión se logra infiltrar la parafina líquida al tejido, que disuelve el medio de aclaramiento y penetra en el mismo.

Después las biopsias fueron colocadas en un recipiente o cassette al que fue añadido parafina fundida. Las muestras fueron colocadas en una estufa toda la noche a 60° C. Debido al calor, el xilol fue evaporado y los espacios anteriormente ocupados por éste fueron ocupados por la parafina.

Después las muestras fueron colocadas en un molde de metal de forma rectangular y con su cassette correspondiente con un poco de parafina fundida en un parafinador (Figura 5A) para realizar los moldes de parafina, los cuales fueron dejados solidificar a temperatura ambiente en una placa fría, formándose un bloque sólido de parafina con el trozo de tejido incluido (Figura 5B). Estos bloques solidificados fueron cortados en un microtomo (Figura 6A) en secciones seriadas de 4 µm de grosor (Figura 6B).

**Figura 5**

**A. Parafinador**

**B. Preparación de un molde de parafina con la muestra incluida**

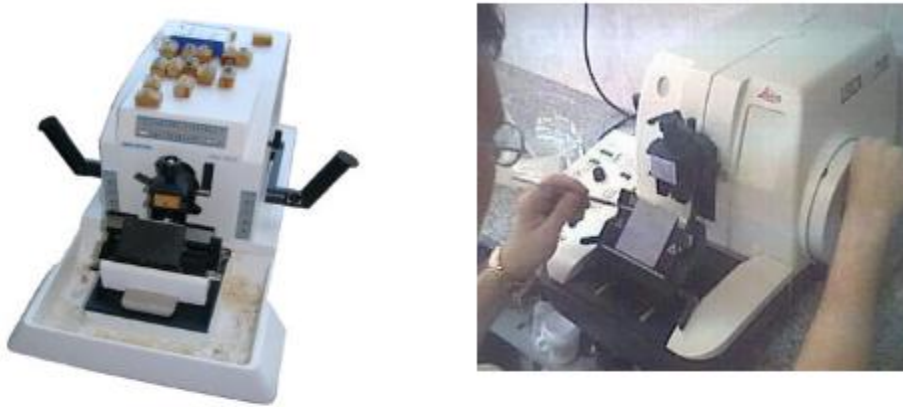


Estas secciones de tejido fueron colocadas en portaobjetos los cuales fueron previamente poli-lisinados mediante un tratamiento con poli-L-Lisina de 350 KDa (0.05 al 0.1%) para asegurar la correcta adherencia de la sección de tejido al portaobjetos.

**Figura 6.**

**A. Microtomo**

**B. Cortes de los moldes de parafina en el microtomo**



Para reconocer las estructuras que componían nuestras biopsias, los cortes fueron teñidos mediante la tinción de Tricrómico de Masson. Una vez teñidos fueron fotografiados con un microscopio óptico (Leica Microsystems Ltd.)

### **Tinción de Tricrómico de Masson**

Con el fin de identificar todas las estructuras presentes en nuestros vasos sanguíneos y corroborar la presencia/ausencia de placa de ateroma, nuestras biopsias fueron teñidas mediante la tinción del tricrómico de Masson.

Los cortes de las biopsias fueron desparafinados, primero mediante un calentamiento previo de 1 hora a 75°C y después, mediante una colección seriada de alcoholes decreciente con el objeto de hidratarlas y que la tinción fuera realizada correctamente. Los cortes fueron teñidos durante 5 minutos con hematoxilina de Weigert, para teñir los núcleos celulares.

A continuación fueron teñidos con fuchina ácida-escarlata de Briebrich y con ácido fosfomolibdico-naranja G durante 5 minutos. Las fibras conjuntivas fueron teñidas durante 5 minutos con una solución de azul de anilina, diferenciando bien con H<sub>2</sub>O acética al 1% durante 3 minutos.

Por último, los cortes fueron deshidratados con concentraciones crecientes de alcohol durante 2 minutos en cada uno de ellos. Los portaobjetos que contienen los cortes de nuestras biopsias fueron rociados con un bálsamo o resina sintética (EuKit), para poder pegar el cubreobjetos y realizar las fotos con el microscopio óptico.

## **Estudios de expresión génica**

### **3.5.2. Aislamiento y cuantificación de ARN**

Las biopsias vasculares, fueron sumergidas en 2 - metil-butano y a continuación en nitrógeno líquido como método de congelación rápida de la muestra, evitando así la alteración morfológica de sus componentes.

Para la extracción del ARN y las proteínas, las muestras de la APO, VF y así como de la AMI se homogeneizaron en hielo usando el reactivo de aislamiento Trizol de acuerdo a las instrucciones del fabricante y utilizando un homogeneizador mecánico (T25-Ultra3-Turrax Basic; Ika<sup>R</sup> Laboratory Equipment).

El Trizol es un reactivo para la extracción de ARN, ADN y proteínas a partir de tejido. Es una solución de fenol y guanidina isocianato desarrollada por Chomczynski and Sacchi en 1987 (101).

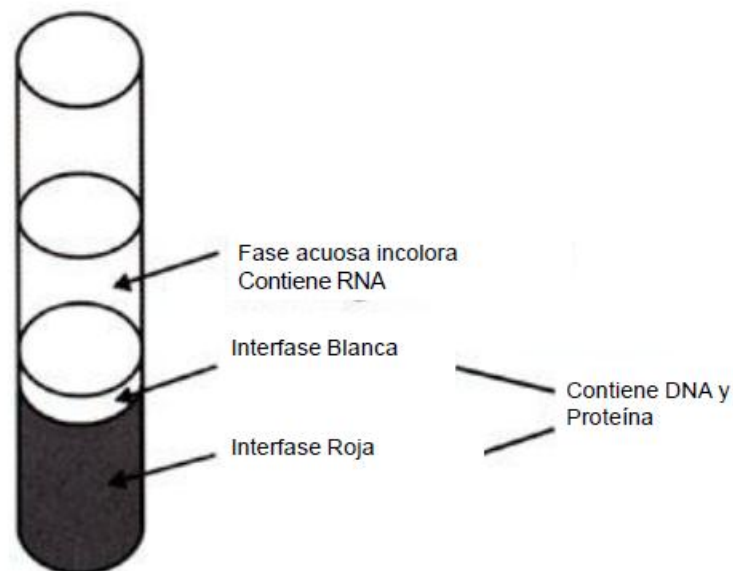
Durante la homogenización y lisis de la muestra, el Trizol es capaz de preservar la integridad del ARN y las proteínas. Las muestras han de manipularse en hielo y en campana de flujo laminar para evitar contaminaciones.

Para la extracción de ARN se necesitan los siguientes reactivos: cloroformo, isopropanolol, etanol al 75% y agua libre de RNAsas (H<sub>2</sub>O con Dietilpirocarbonato al 0.002% (DEPC))

Para la obtención del ARN y de las proteínas, las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente. Posteriormente se les añade Trizol, 1 mL por cada 50 mg de tejido. Las muestras homogenizadas, fueron incubadas durante 5-15 minutos a temperatura ambiente, para permitir la completa separación de los componentes. Después se les añade 200 µl de cloroformo/mL y se agitan vigorosamente durante 15 segundos incubándose

posteriormente a temperatura ambiente durante 2-3 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 12000 x g durante 15 minutos a 4° C tras lo cual el contenido de cada muestra se dividió en una fase inferior roja que corresponde al fenol-cloroformo, una interfase y una fase superior acuosa transparente. La fase acuosa contiene el ARN y las dos restantes el ADN y las proteínas (Figura 7).

**Figura 7.** Esquema del resultado de centrifugación del tejido. Método Trizol.



**Precipitación del ARN:** La fase incolora fue transferida a un nuevo tubo y se le añadió 500 µl de isopropanol/ml para precipitar el ARN. Las muestras fueron incubadas durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaron de nuevo a 12.000 x g durante 10 minutos a 4° C. El RNA, transparente en la fase acuosa y tras la centrifugación, formó un pellet gelatinoso en el fondo de tubo.

**Lavado del ARN:** El pellet formado (ARN) fue lavado con 1 ml de etanol al 75%. A continuación, fue volteado para lavar bien el ARN y centrifugado de nuevo a 12.000 x g durante 5 minutos a 4°C.

**Re-suspensión de ARN:** El sobrenadante fue descartado y el pellet fue secado al aire, siempre dentro de la campana de flujo. Para disolver el pellet, fueron añadidos 50 µL de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas (H<sub>2</sub>O DEPC). Posteriormente, el ARN obtenido fue incubado a 55-60 °C durante 10 minutos para facilitar su solubilidad. Los ARN resuspendidos fueron almacenados a -80° C hasta su posterior uso.

**Cuantificación de ARN:** El ARN obtenido fue cuantificado usando 2 µl de la muestra y mediante un espectrofotómetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific) que detecta los picos de los ácidos nucleicos presentes en una muestra a través de ondas electromagnéticas. La longitud de onda a que fue medido nuestro ARN fue de 260-280 nm y el coeficiente A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> estuvo entre 1.7 y 2 siendo considerada una buena extracción.

### **3.5.3. PCR en tiempo real**

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN en particular partiendo de una cantidad mínima.

El ADN copia (ADNc) o retrotranscripción, fue obtenido utilizando el kit llamado “*High Capacity cDNA Archive*” (*Applied Biosystems, San Francisco, California, EEUU*). En primer lugar se prepara una máster mix con los

siguientes componentes: buffer de retrotranscripción (10X), dNTPs (25X), cebadores (10X), retrotranscriptasa MultiScribe (50 U/ $\mu$ L) y H<sub>2</sub>O de DEPC.

Esta mezcla se reparte en eppendorf junto a 1  $\mu$ g del ARN extraído de nuestras muestras. La retrotranscripción la realizamos en un termociclador (Applied Biosystems 7500 Fast, Figura 8). Los ciclos de temperaturas para la realización de la retrotranscripción en el termociclador fueron: 25°C 10 min. 37°C 120 min. 95°C 5 min.

**Figura 8. Termociclador.**



Una vez obtenido el ADNc, fue amplificado, mediante PCR a tiempo real. Los análisis de expresión génica se realizaron a nivel de ARNm por TaqMan Array de baja densidad (TLDA). Las sondas TaqMan y los cebadores para nuestros genes diana fueron diseñadas mediante un catálogo on-line (Applied). Una vez seleccionados, este conjunto de genes (45 genes) fueron cargados en las tarjetas microfluídas, TLDA, de 384 pocillos, las cuales tenían configuradas 8 filas de 23 genes, por duplicado. Fueron diseñados dos tipos de tarjetas distintas, por lo que el total de genes estudiados fueron 46. Todos estos

genes fueron elegidos en base a revisiones de la literatura para moléculas diana involucradas en procesos inflamatorios y metabolismo lipídico. Los genes diana, GAPDH y 18srRNA, fueron elegidos en base a revisiones de la literatura para nuestras muestras (102,103).

Para la amplificación del ADN, fue preparada una mezcla de PCR que contenía, máster mix, ADNc (1 µg/ µL) y H<sub>2</sub>O estéril. Tras un suave volteo, 100 µl de mezcla fue transferida a los distintos pocillo de la tarjeta TLDA. Esta tarjeta fue centrifugada dos veces durante 1 min a 400 x g a temperatura ambiente para la correcta distribución de las muestras por todo el pocillo.

Estas tarjetas se colocan en un bloque específico para tarjetas microfluidas en un termociclador Applied Biosystems 7900HT Fast PCR System (Applied Biosystems). Las condiciones de los ciclos de la PCR a tiempo real fueron 2 minutos a 50°C y 10 minutos a 95°C seguidos por 40 ciclos de 30 segundos a 97°C y 1 minuto a 59.7°C. Estos niveles de expresión fueron medidos por duplicado. Las tarjetas TLDA fueron analizadas mediante el software RQ Manager (Applied Biosystems).

Los valores de expresión génica RQ fueron calculados en base al método "Ciclo Delta" ( $\Delta\Delta$  Ct). Estos valores CT fueron definidos como el punto en el cual la fluorescencia cuantificada sobrepasa los valores de fluorescencia ruido (background), calculada mediante el software SDS 2.3 (Applied Biosystems). Una mezcla de ADN de AMI de distintos pacientes fue usado como

calibrador y el gen constitutivo 18srRNA fue utilizado como gen de normalización.

Los genes se clasificaron según la vía metabólica involucrada (metabolismo lipídico, apoptosis, genes de transducción de señales inflamatorias, genes de respuesta inmune, regulador del citoesqueleto, reguladores de la transcripción y traducción) (Tabla 1).

**Tabla 1. Genes diana estudiados de las distintas rutas metabólicas**

	Genes			
<b>Inflamación</b>	F3 (FT)	TFPI	Von Willebrand factor	AGER
	CRP	CD34	VEGFA	CCL2 (MCP1)
<b>Apoptosis</b>	CDKN1A	BCL2	Caspase 3 (Casp3)	BAX
	CD83	MMP2	MMP3	MMP9
	MMP10	MMP13	AKT1	
<b>Metabolismo lipídico</b>	PPAR $\gamma$	PTGS1 (Cox1)	PTGS2 (Cox2)	CD36
	LRP1	NDUFA2	SCARB1	OLR1
	LDLR	ABCA1	TFPI	USP9Y
<b>Regulador transcripcion-traducción</b>	SREBF1	SREBF2	Sp1	HIF1A
	TP53	NKIRAS2		
<b>Respuesta inmune</b>	CD86	TLR2	TLR4	
<b>Regulador citoesqueleto</b>	Endoglin	Actin A1	MMP12	TIMP1
	TIMP3			

### **3.5.4. Aislamiento y cuantificación de proteínas**

#### **3.5.4.1. Extracción de Proteínas. Método del Trizol**

De las muestras anteriores de las que fue extraído el ARN, fueron extraídas también las proteínas de cada una de nuestras biopsias, según el método del Trizol (ver figura 7).

Fueron añadidos 300 µl de etanol 100% para degradar el ADN completamente para lo cual se incuban las muestras 2-3 minutos a temperatura ambiente. Éstas fueron centrifugadas a 2000 x g durante 5 minutos a 4° C. El sobrenadante fue recolectado en un eppendorf limpio de 2ml. Para continuar el proceso fueron añadidos 800 µl de isopropanol frío, y se incubaron las muestras 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación fueron centrifugados a 12000 x g durante 10 minutos a 4°C. Los pellets obtenidos, que ya son las proteínas totales de cada una de las muestras, fueron resuspendidos en una solución de hidrocloreuro de guanidina/etanol al 95%, incubados durante 20 minutos a temperatura ambiente y centrifugados a 7500 x g durante 5 minutos a 4°C. Este paso fue repetido 3 veces.

Para proceder al lavado de las proteínas, fueron añadidos 2 ml de etanol 100%, incubados durante 20 min a temperatura ambiente y centrifugados a 7500 x g a 4°C. Los pellets obtenidos fueron dejados secar al aire. Con el fin de solubilizar las proteínas obtenidas se añadieron 100 µl SDS 1% y fueron calentadas durante 10 min a 50°C. Una vez solubilizadas, fue cuantificada la concentración de cada una de las muestras y almacenadas a -20°C hasta su uso.

### **3.5.4.2 Cuantificación de Proteínas. Método BCA**

La cuantificación de proteínas fue realizada mediante el método del BCA, Protein Assay Reagent (Pierce. Ref: 23223). Esta cuantificación fue realizada para conocer la concentración proteica de cada una de nuestras muestras.

Se construyó una curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 2 mg/dl H<sub>2</sub>O estéril

#### **Curva Standard:**

<u>BSA (µl)</u>	<u>H<sub>2</sub>O estéril (µl)</u>	<u>[µg/µl]</u>
0	100	0
1,25	98,75	1,25
2,5	97,5	2,5
5	95	5
10	90	10
12,5	87,5	12,5
15	85	15

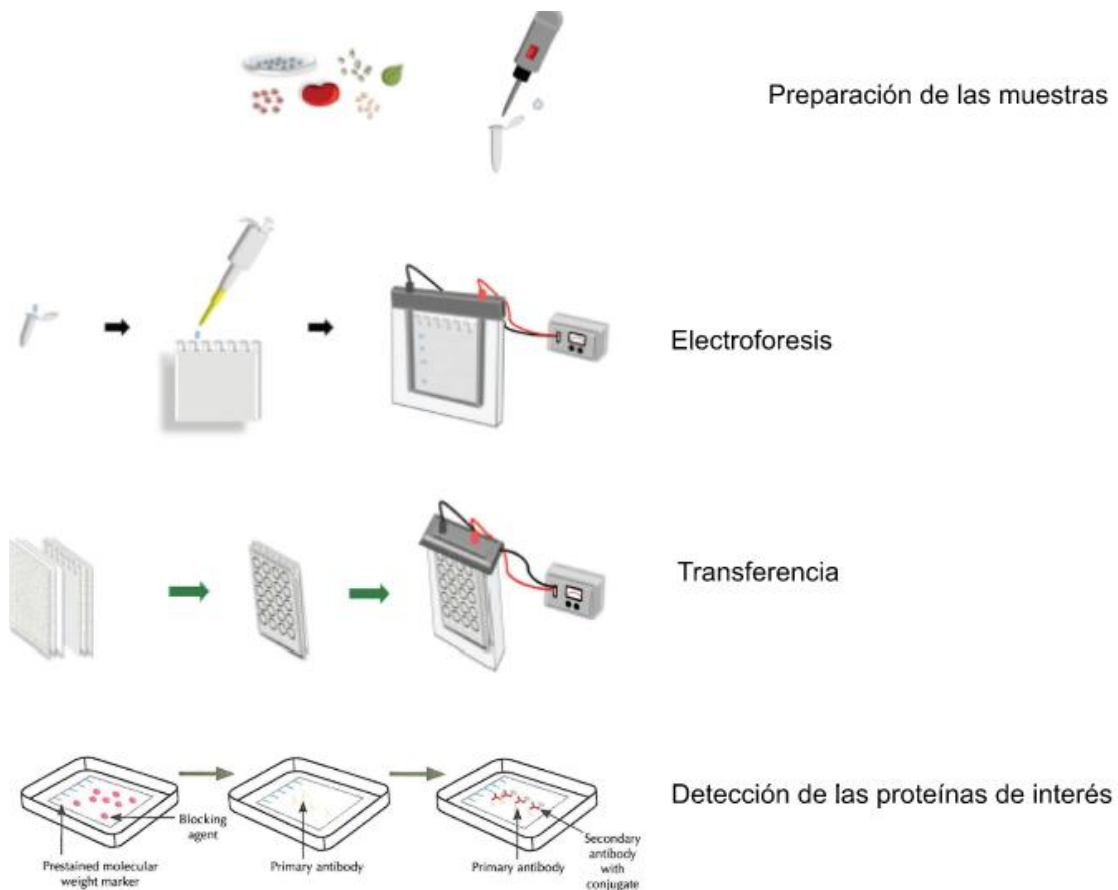
La curva estándar y diluciones 1:25 de cada una de nuestras muestras fueron cuantificadas en un espectrofotómetro (Versamax) a 562 nm. Para ello, tanto la curva estándar como nuestras muestras fueron sembradas en placas de 96 pocillos añadiéndose 100 µl reactivo BCA (Reactivo A + Reactivo B (1:50)). La placa fue calentada a 37° C durante 30 minutos en oscuridad antes de pasar a cuantificarse en el espectrofotómetro.

Las concentraciones de proteínas extraídas de nuestras biopsias las calculamos por extrapolación sobre las concentraciones conocidas de la curva estándar.

### 3.5.4.3 Western Blot.

Las proteínas cuantificadas obtenidas de las diferentes biopsias, fueron analizadas por Western Blot (104, Figura 9), donde éstas fueron separadas en primer lugar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente fueron transferidas, mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel, a una membrana de nitrocelulosa.

**Figura 9. Etapas de un Western Blot.**



Concentraciones de 30  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de proteína para el LRP1 y 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de proteína para el factor tisular (FT) de cada una de nuestras muestras, fueron separadas según su peso molecular (pm) mediante una corriente eléctrica de 80 V en geles de acrilamida/bisacrilamida, los cuales presentaban un tamaño de poro adecuado para la correcta separación de las mismas (gel concentrador (4%) y gel separador (7,5%, para el LRP1 y al 12%, para el FT)). 1  $\mu\text{L}$  de buffer de muestra 6X en condiciones no reductoras, (sin  $\beta$ -mercaptoetanol), para la cuantificación del LRP1 y en condiciones reductoras (con  $\beta$ -mercaptoetanol (1:20)) para la identificación del FT junto con 2  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol al 0.2% fue añadido a todas las muestras para identificar mejor el frente. Por otro lado, el marcador de distintos pm fue añadido en uno de los carriles de los geles para poder identificar bien nuestras proteínas de interés (LRP1 Y FT).

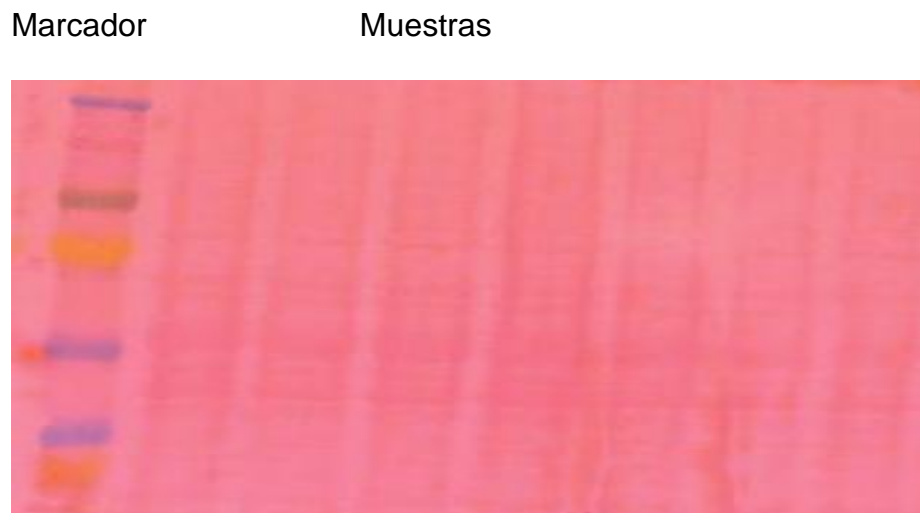
Las muestras y el marcador de pm, fueron calentadas durante 5 minutos a 95° C antes de ser cargadas en los geles. Las muestras junto al gel marcador de pm fueron cargadas en el gel concentrador, el cual se dejó correr a 60 V durante una hora con la finalidad de que las muestras se concentrasen. Tras esto se aumentó el voltaje a 80 V y se dejaron correr las proteínas hasta que el frente llega al final del gel separador.

Durante este proceso las proteínas fueron avanzando a través del gel hasta que por su pm se le impide pasar a través de los poros más pequeños quedando entonces dispuestas a una determinada altura del gel que fue identificada a través del marcador de pm.

El gel de poliacrilamida no permite revelar las proteínas que tenemos en nuestras muestras por lo que fue necesario transferirlas a un soporte adecuado para su identificación. Este soporte fue una membrana de nitrocelulosa, a la cual fueron transferidas todas nuestras proteínas desde el gel a través de un sistema de transferencia iBlot Dry Blotting System (IB 1001 Invitrogen) utilizando el kit de iBlot Gel Transfer Stacks. Esta transferencia fue realizada en 7 minutos a 23 V.

Para comprobar la correcta transferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa fue teñida con un colorante, Rojo Ponceau (Figura 10)

**Figura 10.** Gel indicativo de la buena transferencia de las proteínas sobre la membrana de nitrocelulosa (Rojo Ponceau).



Para identificar nuestras proteínas (LRP1 y el FT) fueron empleados anticuerpos sintéticos monoclonales específicos. Para que la unión fuera específica fueron bloqueadas las uniones inespecíficas con blotto, que es una solución de leche desnatada en polvo al 5% en TBS 1X y Tween 20 al 0,05%, durante toda la noche a 4° C en la que fueron incubadas las distintas membranas. Al día siguiente, éstas fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes, LRP1 (hLRP1/α2 MR (85 KDa) MAb, Ref: LRP61067, Fitzgerald RDI-PR61067)) o FT (Goat anti-human, tF-IgG. Ref: 4501 (45-52 KDa). American diagnostic INC)), diluidos en blotto, 1:50 (LRP1) y 1:1.000 (FT) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación suave.

Tras ese tiempo fueron realizados 2 lavados con TBS 1X + Tween 20 al 0.05% durante 15 minutos a temperatura ambiente y con fuerte agitación.

A continuación, las membranas fueron nuevamente incubadas con el anticuerpo secundario, Dako P0161 polyclonal rabbit anti-mouse Ig/HRP (marcado con peroxidasa de caballo), diluido en blotto en proporción 1:5.000 para el LRP1 y Santa Cruz Biotechnology, ref: sc-2922 polyclonal rabbit anti-goat Ig/HRP, diluido en blotto en proporción 1:10.000 para el FT, durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación suave.

El anticuerpo secundario se unió al primer anticuerpo ya fijado y permitió el posterior revelado de la membrana con luminol, (Pierce supersignal West Dura Exrtendet duration substrate) diluido en buffer específico (1:1), el cual se dejó actuar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para ello, las

membranas fueron envueltas en papel transparente y con un paño se quitó el exceso de luminol diluido.

Por último, las membranas fueron reveladas y se observaron las bandas obtenidas en un transiluminador Chemidoc de BioRad a través del programa Quantity One.

### **3.5.5. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)**

Los anticuerpos IgG e IgM anti – LDLox fueron medidos por duplicado tal y como han descrito previamente diferentes autores (77,78) utilizando la técnica de Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) para la detección de estos anticuerpos.

La partícula de LDL se aisló del plasma obtenido de nuestros pacientes a estudio, mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad. Para obtener LDLox se incubó este LDL nativo con malondialdehído (MDA) consiguiendo MDA-LDL.

Las placas de microtitulación para la determinación de anticuerpos IgG e IgM anti-MDA-LDL fueron recubiertas con 25 µL LDL nativa o MDA-LDL y el suero de cada uno de los participantes en el estudio.

La LDL oxidada de las muestras fue incubada durante 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos anti-LDL oxidada unidos a al pocillo de microtitulación. Tras un periodo de lavado, fueron agregados anticuerpos

antihumano apolipoproteína B conjugados en peroxidasa, lo cual se dejó incubar de nuevo durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras otro lavado, el anticuerpo etiquetado de enzima sin ligar fue eliminado del medio. El conjugado ligado fue detectado mediante la reacción con 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene añadiendo 50  $\mu$ L de solución ácida.

Tras este paso, las muestras fueron leídas en el espectrofotómetro (Versamax) a 450 nm. Los coeficientes intra- e inter-ensayo fueron del 5% y 10%, respectivamente.

### **3.6. Análisis Estadístico**

Todos los datos fueron informatizados y analizados mediante el programa informático SPSS edición 17.0. Las variables cuantitativas fueron expresadas como el valor medio  $\pm$  la desviación estándar (media  $\pm$  DE) y las variables cualitativas en forma de frecuencia, de porcentaje de incidencia (%), o cuartiles, según el tipo de distribución a la que se ajusten los datos.

Se realizó un análisis descriptivo y comparativo en función del tipo de control de la DM2 de los pacientes con los datos obtenidos. La comparación entre grupos se realizó, en las variables cuantitativas, utilizando el test de ANOVA para muestras independientes ó con el test no paramétrico de Mann-Whitney.

La comparación entre grupos múltiples fue realizada mediante el análisis de ANOVA de una vía y estudios Post Hoc. En las variables cualitativas, el análisis comparativo fue realizado mediante el test de Chi cuadrado ( $\text{Chi}^2$ ). Tanto en el caso de las variables cuantitativas como cualitativas se han realizado también, en los casos precisos, análisis univariante y multivariante, correlaciones y regresiones lineales y logísticas para determinar la posible existencia de factores predictores de la variable dependiente en estudio (control de la glucemia).

Las relaciones entre biomarcadores celulares y las variables continuas se han analizado mediante análisis de correlación de Spearman, que mide la relación lineal entre dos variables cualitativas ( $-1 < r < 1$ ).

Los modelos de regresión múltiple se utilizaron para corregir los factores de confusión para evaluar la asociación entre los niveles de expresión de RNAm de diferentes biomarcadores, factores de riesgo o fármacos.

Para evaluar la correlación plasmática de anticuerpos anti-LDLox IgG / IgM con biomarcadores específicos del metabolismo inflamatorio, apoptótico y lipídico en las muestras de arteria poplítea ocluida, de vena femoral y de arteria mamaria interna. Esto se realizó mediante análisis de correlación de Pearson.

El cálculo del tamaño muestral se realizó teniendo en cuenta que un menor coeficiente de correlación de 0,65 podría dar lugar a un error de tipo 1 o a un falso positivo. Así, con base a este objetivo, el tamaño de la muestra se

calculó para tener más de 70% de potencia, siendo  $\alpha = 0,05$  y un coeficiente de correlación de 0,65. Siguiendo este enfoque estadístico, el tamaño muestral mínimo requerido fue de 14 sujetos.

Todos los valores de probabilidad fueron de dos colas, y todos los intervalos de confianza del 95%. En todos los casos se considerará la existencia de significación estadística a aquella con una  $p < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS.**

- 4.1. **Características generales de la población.**
- 4.2. **Valoración histológica de las biopsias vasculares.**
- 4.3. **Expresión génica de los biomarcadores estudiados en el sistema vascular.**
  - 4.3.1. Expresión de ARN
  - 4.3.2. Expresión Proteica
- 4.4. **Análisis de correlación entre los parámetros antropométricos y bioquímicos con los biomarcadores.**
- 4.5. **Influencia del control glucémico sobre la expresión génica de los biomarcadores.**
- 4.6. **Asociación de anticuerpos anti - LDL oxidada con las distintas rutas metabólicas.**

#### **4.1. Características generales de la población.**

20 individuos con DM2 establecida fueron incluidos en el estudio, 5 pacientes con CI fueron sometidos a bypass coronario, presentando un buen control glucémico (HbA1c <6,5%) antes de la intervención. De estos sujetos fueron obtenidas las arterias controles libres de ateroma, la arteria mamaria interna (AMI). Por otro lado, fueron reclutados 15 pacientes que presentaban EAP grave por lo que fueron sometidos a amputación supracondílea de miembros inferiores, obteniéndose del mismo paciente el paquete vascular compuesto de arteria poplítea ocluida (APO) y vena femoral (VF).

Las características basales de los pacientes con CI y con EAP se muestran en la Tabla 2. Nuestra población presentaba una evolución media de DM2 de  $12 \pm 7$  años y una edad avanzada.

No encontramos diferencias significativas en la edad de los sujetos con CI respecto a la edad de los sujetos con EAP. Tampoco fue observada esta diferencia significativa en relación a la edad de los pacientes con EAP, cuando fueron clasificados por su grado de control glucémico. Los pacientes con EAP y buen control glucémico presentaban menos peso y un menor IMC que los pacientes con mal control glucémico aunque también sin significación estadística entre ellos.

Algunos pacientes recibían tratamiento con antidiabéticos orales. Además, el 70% de los pacientes que se encontraban mal controlados desde el punto de vista glucémico estaban siendo tratados con insulina. Los tratamientos farmacológicos prescritos de nuestra población fueron:

- Antidiabéticos orales (20%): metformina, glicazida o repaglinida (6,7% respectivamente)
- Insulina (86,7%)
- Antihipertensivos (80%): IECA (26,7%) ARA II, Bloqueadores canales de calcio,  $\beta$  bloqueantes (20% respectivamente)
- Diuréticos (46,7%)
- Estatinas (26,7%)
- Antiagregantes (80%)
- Anticoagulantes (53,3%)

**Tabla 2:** Características epidemiológicas, clínicas y analíticas (valorescuantitativos (media  $\pm$  desviación estándar), valores cualitativos (porcentaje).

	Sujetos con EAP			
	Sujetos con CI	Sujetos con EAP	DM2 con HbA1c $\leq$ 6,5%	DM2 con HbA1c $>$ 6,5 %
N (%)	5	15	6 (40.0)	9 (60.0)
Edad	63,2 $\pm$ 13,0	67,3 $\pm$ 14,2	73,8 $\pm$ 11,8	63,0 $\pm$ 14,6
Sexo (Hombre / Mujer) (%)	5/0	12 / 3	5 (83,3) / 1 (16,7)	7 (77,8) / 2 (22,2)
Peso (Kg)	75,9 $\pm$ 10,1	68,7 $\pm$ 12,1	63,5 $\pm$ 11,3	72,1 $\pm$ 11,9
Perímetro de cintura (cm)	94,5 $\pm$ 3,5	96,7 $\pm$ 8,7	96,5 $\pm$ 12,7	90,8 $\pm$ 19,2
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27,9 $\pm$ 3,5	25,3 $\pm$ 3,9	24,6 $\pm$ 4,4	25,7 $\pm$ 3,7
Hipertensión arterial (%)	21,4	73,3	66,7	77,8
Dislipemia (%)	57,1	85,7	83,3	87,5
Obesidad (%)	16,7	33,3	33,3	33,3
Tabaquismo (%)	33,3	13,3	11,1	22,2
Presión arterial sistólica / diastólica (mmHg)	133/74 $\pm$ 24/14	150/76 $\pm$ 24/13	141/78 $\pm$ 21/6	155/75 $\pm$ 26/16
Glucemia (mg/dL)	<b>105,2 <math>\pm</math> 8,3</b>	<b>129,2 <math>\pm</math> 48,1</b>	<b>96,2 <math>\pm</math> 31,1</b>	<b>151,2 <math>\pm</math> 32,6*</b>
HbA1c (%)	<b>6,2 <math>\pm</math> 0,3</b>	<b>7,8 <math>\pm</math> 1,8</b>	<b>6,0 <math>\pm</math> 0,4</b>	<b>8,9 <math>\pm</math> 1,3**</b>
Creatinina (mg/dL)	1,0 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,9	1,2 $\pm$ 0,7	2,5 $\pm$ 1,7
Acido urico (mg/dL)	5,4 $\pm$ 1,4	4,5 $\pm$ 2,8	3,6 $\pm$ 2,0	5,3 $\pm$ 3,3
Colesterol total (mg/dL)	135,8 $\pm$ 37,9	152,7 $\pm$ 55,6	126,5 $\pm$ 67,0	179,9 $\pm$ 61,1
LDL-c (mg/dL)	81,8 $\pm$ 15,5	88,0 $\pm$ 28,12	73,4 $\pm$ 21,7	112,4 $\pm$ 52,2
HDL-c (mg/dL)	32,4 $\pm$ 12,0	32,6 $\pm$ 13,8	32,3 $\pm$ 18,9	32,9 $\pm$ 9,0
Triglicéridos(mg/dL)	201,0 [106,0-302,0]	122,0 [82,3-234,5]	116,5 [74,8-131,5]	210,5 [83,5-364,3]
GOT (U/l)	27,2 $\pm$ 9,8	34,23 $\pm$ 9,3	40,8 $\pm$ 46,5	28,6 $\pm$ 19,7
GPT(U/l)	53,2 $\pm$ 30,0	40,7 $\pm$ 19,0	42,5 $\pm$ 20,5	39,1 $\pm$ 19,1
GGT (U/l)	30,2 $\pm$ 9,8	56,1 $\pm$ 7,1	89,3 $\pm$ 40,7	114,6 $\pm$ 132,8
Insulina ( $\mu$ UI/ml)	13,5 $\pm$ 9,3	11,8 $\pm$ 6,4	10,5 $\pm$ 5,8	12,6 $\pm$ 7,3
HOMA-IR	5,9 $\pm$ 4,6	4,1 $\pm$ 2,2	2,8 $\pm$ 1,6	5,3 $\pm$ ,4
Antidiabéticos orales	3 (60,0%)	4 (26%)	1 (6,7%)	3 (33,3%)
Insulina	1 (25,0 %)	9 (60%)	3 (50%)	6 (66,7%)
Antihipertensivos	1 (25,0%)	12 (80%)	5 (83,3%)	7 (77,8%)
Hipolipemiantes	2 (40,0%)	4 (26.6%)	1 (16,7%)	3 (33,3%)
Antiagregantes	1 (25,0%)	12 (80%)	6 (100%)	6 (66,7%)
Anticoagulantes	3 (60,0%)	8 (53%)	3 (50%)	5 (55,6%)

\*  $p = 0,02$  vs buen control\*\*  $p < 0,0001$  vs buen control

## **4.2. Valoración histológica de las biopsias vasculares.**

Todas las biopsias de los distintos vasos sanguíneos fueron teñidas con Tricrómico de Masson y fotografiadas mediante un microscopio óptico de rutina (2x). Con esta tinción fue comprobada la anatomía patológica de nuestras biopsias. Así, los núcleos celulares fueron teñidos de negro, el colágeno y el tejido conjuntivo, de color azulado, el epitelio y los glóbulos rojos fueron teñidos de color rojo intenso y las células musculares lisas vasculares fueron teñidas de rojo pardusco. La anatomía de los vasos fue analizada desde la luz del vaso hacia el exterior.

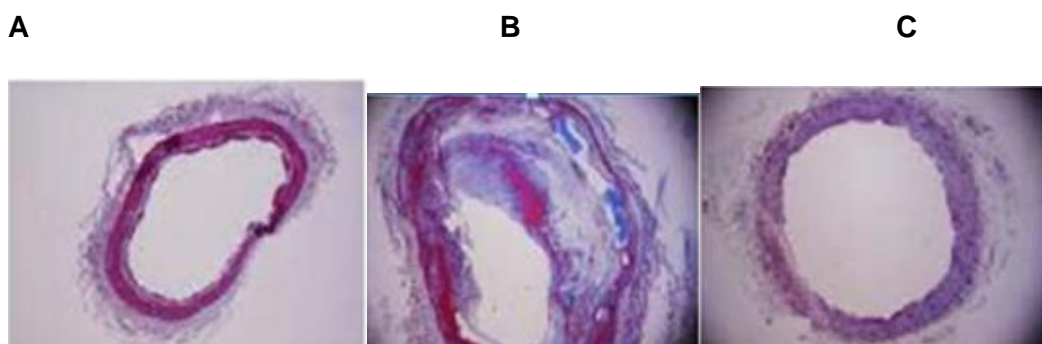
La AMI mostró una histología normal y sana (Figura 11A), por lo que fue utilizada como vaso control en nuestros experimentos. Analizamos el endotelio observando que era una capa unicelular en la que los núcleos fueron teñidos de negro, un subendotelio formado por tejido conectivo fibroelástico y que juntos formaban la capa íntima. A continuación encontramos una lámina elástica interna formada por fibras elásticas y que conectan con la capa media. La capa media estaba compuesta por fibras musculares lisas (rojo pardusco), fibras de colágeno (azuladas) y fibras elásticas. En la parte más cercana a la capa adventicia se localizó otra banda de fibras elásticas, la lámina elástica externa. Por último, en la capa adventicia observamos tejido conectivo, fibroblastos, vasa vasorum, fibras elásticas y de colágeno.

En la APO (Figura 11B) fue observada una capa íntima con endotelio bien definido y un subendotelio muy engrosado debido a la presencia de una gran placa de ateroma.

Era una placa blanda con un núcleo lipídico de gran volumen y depósitos de calcio (azulado), que ocupaba casi 2 tercios de la luz del vaso. La cápsula tenía pocas fibras de colágeno aunque con un exceso de macrófagos y linfocitos. La estructura de la capa media, fue afectada por la presencia de la placa ya que produjo el adelgazamiento de la capa media a lo largo del vaso. La capa adventicia presenta fibras elásticas y de colágeno.

En las biopsias de VF (Figura 11C) observamos las 3 capas bien diferenciadas y sin patologías. La capa íntima junto con el endotelio y un subendotelio compuesto por fibras de colágeno y elásticas, rodeado por una lámina elástica interna bien definida, la capa media, donde predominaban las capas de fibras musculares lisas asociadas a fibras de colágeno (azulado) y elásticas y la capa adventicia, compuesta por tejido conectivo laxo y fibras musculares lisas, y donde podemos encontrar vasa vasorum. Las venas no presentan lámina elástica externa.

**Figura 11.** Histología de los distintos vasos sanguíneos del estudio. Arteria mamaria interna (A), arteria poplítea (B, donde se aprecia placa de ateroma), vena femoral (C), teñidas con Tricrómico de Masson. Imágenes tomadas por un microscopio óptico. (2X)



### **4.3. Expresión génica de los biomarcadores estudiados en el sistema vascular**

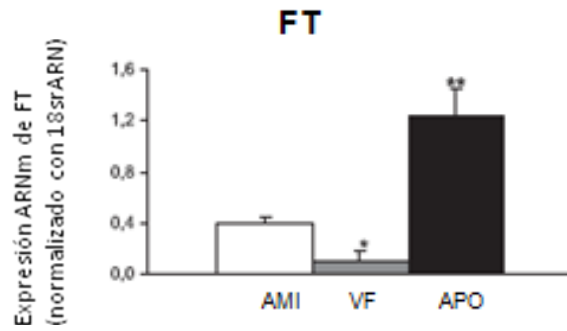
#### **4.3.1 Expresión de ARN**

La posible alteración en la expresión génica de diferentes biomarcadores involucrados en distintas rutas metabólicas, fue analizada mediante el estudio de los niveles de ARN de la APO, la VF y la AMI, la cual usamos como vaso control.

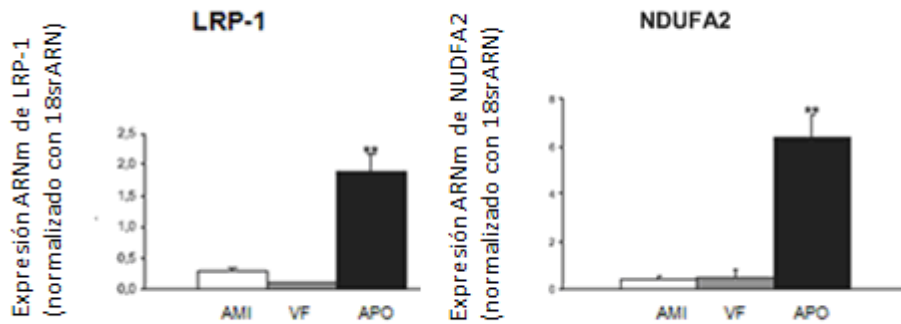
De los 46 genes estudiados sólo 9 fueron significativamente diferentes en todos los tejidos. La APO fue el vaso que presentó mayores niveles de expresión génica de los biomarcadores analizados en todas las rutas metabólicas estudiadas (trombosis (Figura 12A), metabolismo lipídico (Figura 12B), apoptosis (Figura 12C) o respuesta inmune (Figura 12D), respecto a la AMI o la VF. Estos resultados se recogen en la Figura 12.

**Figura 12.** Niveles de expresión de ARN de los diferentes genes implicados en distintas rutas metabólicas en los vasos sanguíneos estudiados (AMI, VF y APO).

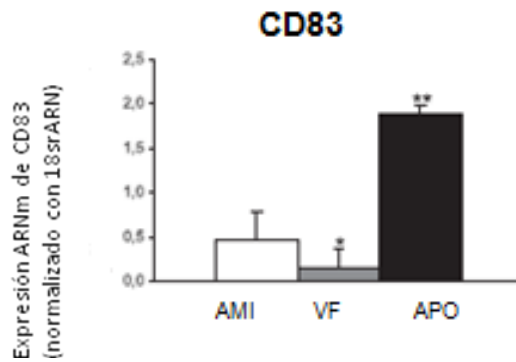
**A) Trombosis:**

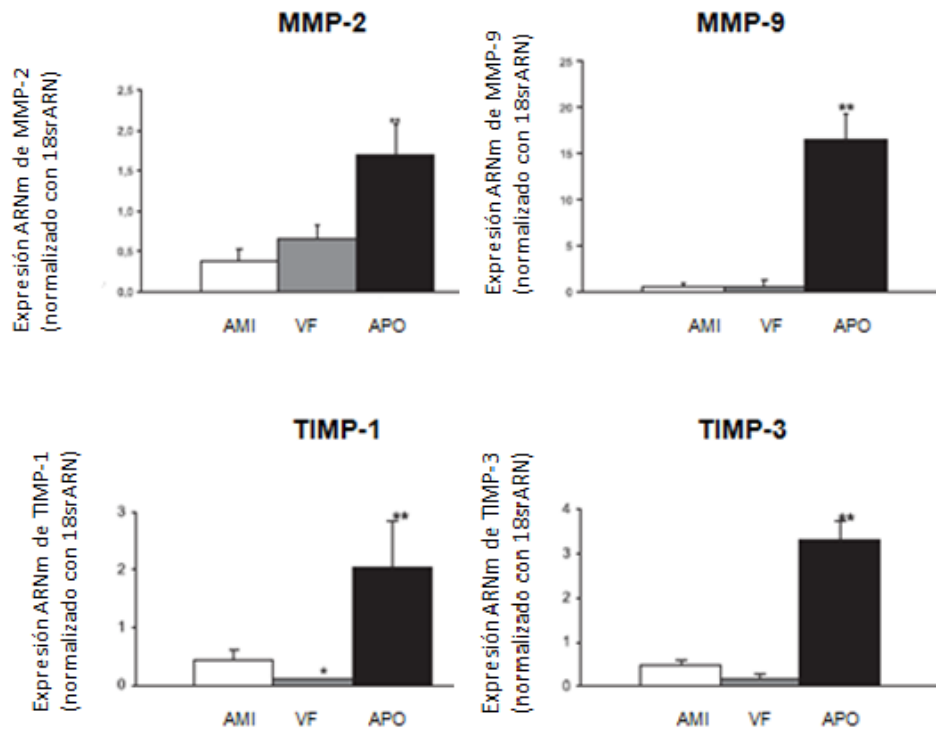


**B) Metabolismo lipídico:**

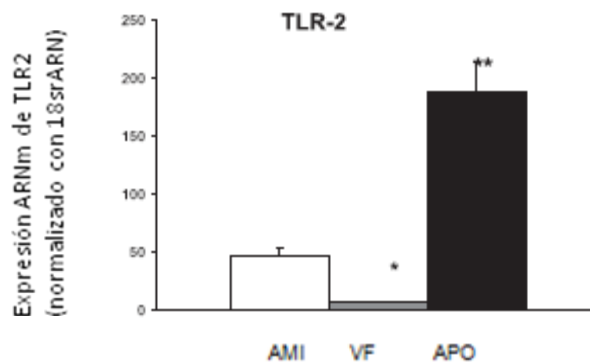


**C) Apoptosis:**





#### D) Respuesta inmune:



\*p <0,05 vs AMI) \*\* p <0,05 vs AMI y VF.

#### 4.3.2 Expresión proteica

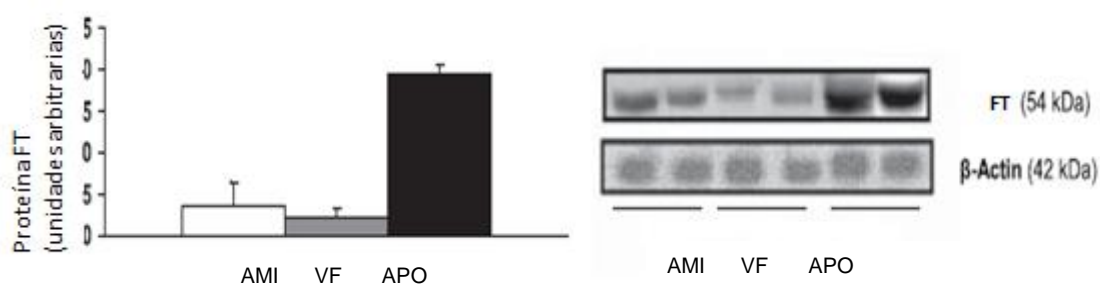
El proceso inflamatorio y el metabolismo lipídico son dos de las vías claves en la formación de la placa de ateroma en la pared vascular. Por lo tanto, y en vista a los resultados de expresión del ARN obtenidos de dos de los biomarcadores de estas vías (FT y LRP-1), fue cuantificada su expresión proteica, comprobando que el patrón de sobreexpresión en la OPA se repetía

respecto a la AMI y a la VF. Los resultados de esta cuantificación, fue recogida en la Figura 13.

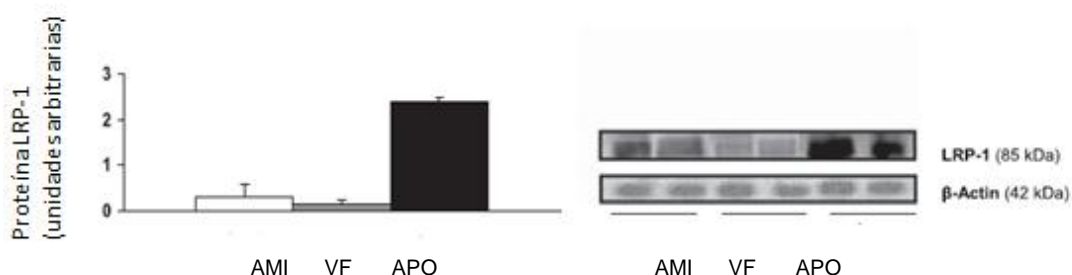
La APO tuvo mayor expresión de FT ( $1,93 \pm 0,12$  UA) que la VF ( $0,20 \pm 0,12$  UA) y la AMI ( $0,34 \pm 0,23$  UA), lo cual mostró diferencia significativa entre ellas ( $p < 0,04$ ). Lo mismo ocurrió cuando estudiamos los niveles de LRP-1; la OPA tenía una mayor expresión ( $2,38 \pm 0,11$  UA) comparado con la VF ( $0,14 \pm 0,07$  UA) y la AMI ( $0,30 \pm 0,17$ ) con una diferencia significativa entre ellas ( $p < 0,05$ ).

**Figura 13.** Niveles de expresión génica (ARN y proteína) de FT (A) y LRP-1 (B) de los vasos sanguíneos estudiados. Las imágenes de la derecha muestra el análisis densitométrico de la proteína de AMI, VF y APO, utilizando B-Actina para la normalización de los resultados.

#### A) Expresión génica de FT



## B) Expresión génica de LRP-1



### 4.4. Análisis de correlación entre los parámetros antropométricos y bioquímicos con los biomarcadores.

En todos los tejidos (AMI, VF, APO), sólo la presión arterial, como parámetro antropométrico, mostró una correlación significativa con los diferentes biomarcadores.

En las biopsias de AMI, la presión arterial sistólica se asoció negativamente con MMP-9 ( $p = 0,02$ ), TIMP-1 ( $p = 0,03$ ) TIMP-3 ( $p = 0,03$ ), PPAR $\gamma$  ( $p = 0,03$ ) y VEGFA ( $p = 0,005$ ). En cambio, las biopsias de APO mostraron una correlación positiva entre la presión arterial sistólica y MMP9 ( $p = 0,03$ ), y entre la presión arterial diastólica y SREBP1 ( $p = 0,02$ ). Las biopsias de VF presentaban una correlación positiva entre la presión arterial diastólica y HIFA1A ( $p = 0,04$ ).

Como parámetros bioquímicos, únicamente los niveles de glucemia en ayunas y la hemoglobina glicosilada se correlacionaron significativamente con los biomarcadores analizándose en las biopsias de APO y VF. Por el contrario, las biopsias de AMI no mostraron ninguna correlación significativa con ninguno

de los biomarcadores estudiados. Las biopsias de VF mostraron una correlación negativa entre los niveles de glucemia y los niveles de BCL2 ( $p=0,02$ ), CDKN1A ( $p=0,04$ ), COX-2 ( $p=0,05$ ) y SREBP2 ( $p=0,03$ ). La HbA1c sólo se correlacionó negativamente con BCL2 ( $p=0,05$ ). Las biopsias de APO únicamente mostraron una correlación positiva entre los niveles de glucemia en ayunas y los biomarcadores CD83 ( $p < 0,0001$ ), LRP-1 ( $p < 0,0001$ ), NDUFA2 ( $p=0,05$ ) y TIMP1 ( $p=0,03$ ).

#### **4.5. Influencia del control glucémico sobre la expresión génica de los biomarcadores.**

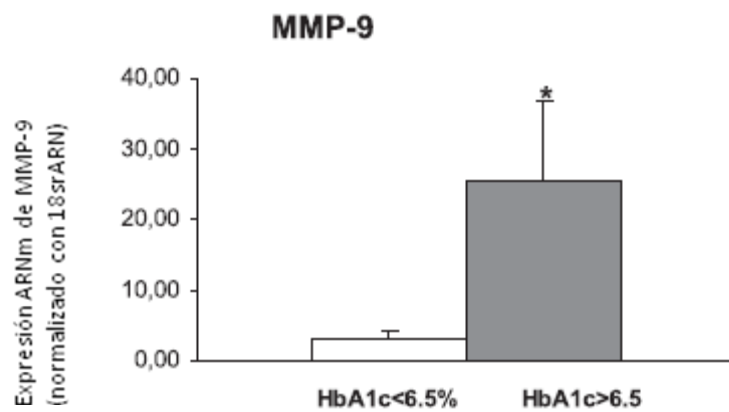
Para analizar si el control glucémico ejercía algún efecto sobre los distintos biomarcadores de las rutas metabólicas estudiadas, los pacientes diabéticos con EAP fueron clasificados en dos subgrupos, aquellos que presentaban una hemoglobina glicosilada (HbA1c)  $\leq 6,5$  (pacientes con buen control glucémico,  $n=6$ ) y aquellos con HbA1c  $> 6,5$  (pacientes con mal control glucémico,  $n=9$ ).

Como cabía esperar, los niveles plasmáticos de glucosa y HbA1c fueron significativamente mayores en los pacientes mal controlados ( $151,2 \text{ mg/dl} \pm 32,6$  y  $8,9 \% \pm 1,3$ , respectivamente) frente a los pacientes bien controlados ( $96,2 \text{ mg / dl} \pm 31,1$  y  $6,0 \% \pm 0,4$ , respectivamente) con un valor de  $p=0,02$  y  $p < 0,0001$ , respectivamente.

Por otro lado, fueron analizados los niveles de expresión del ARN en el paquete vascular (APO y VF) de los pacientes con EAP.

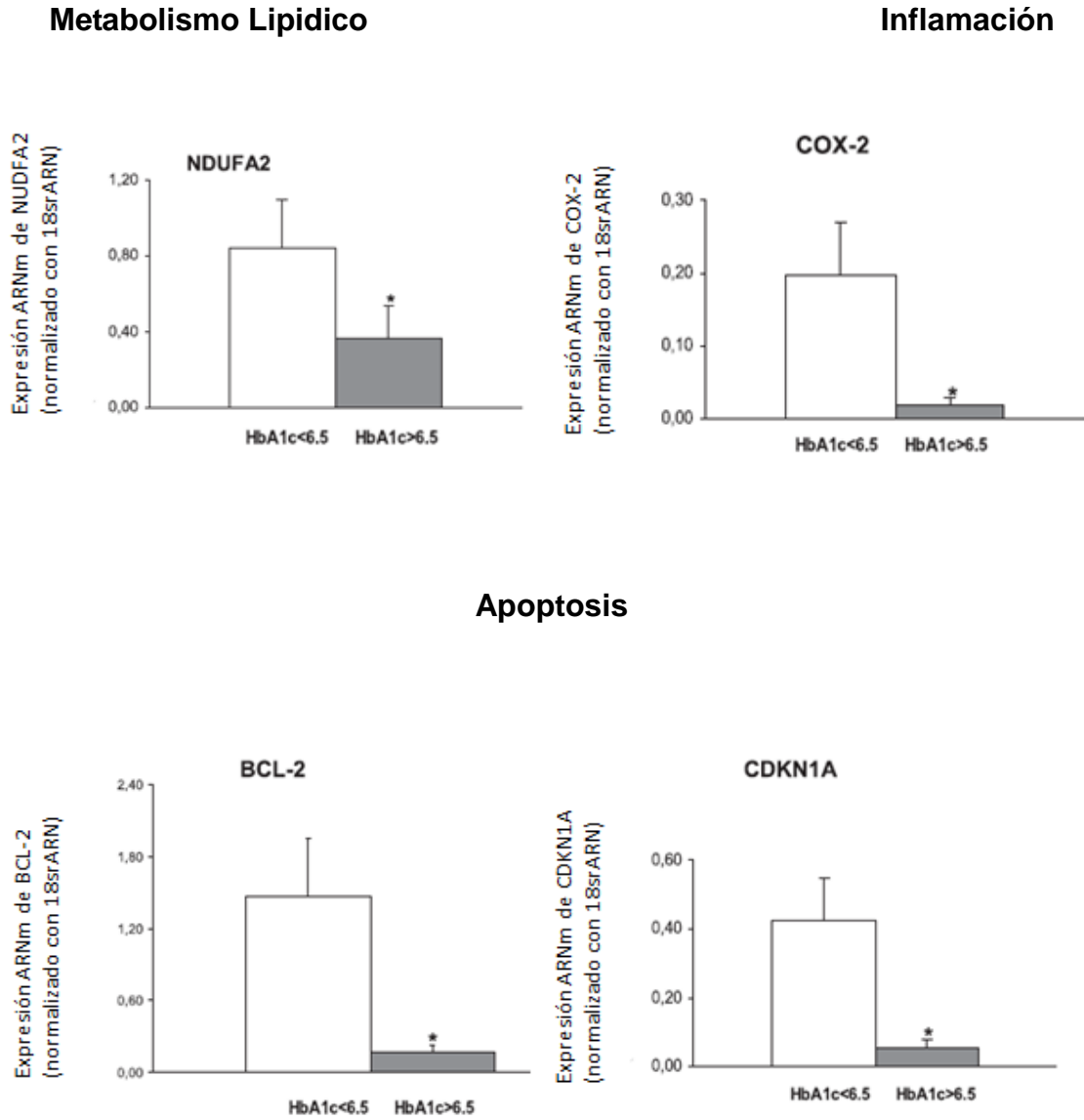
En la APO, sólo la MMP9 mostró un incremento en su expresión de pacientes diabéticos con un mal control glucémicos frente a pacientes diabéticos con buen control ( $p < 0,0001$ ) Figura 14.

**Figura 14.** Niveles de expresión de ARN de MMP-9 en pacientes mal o bien controlados en biopsias de APO.

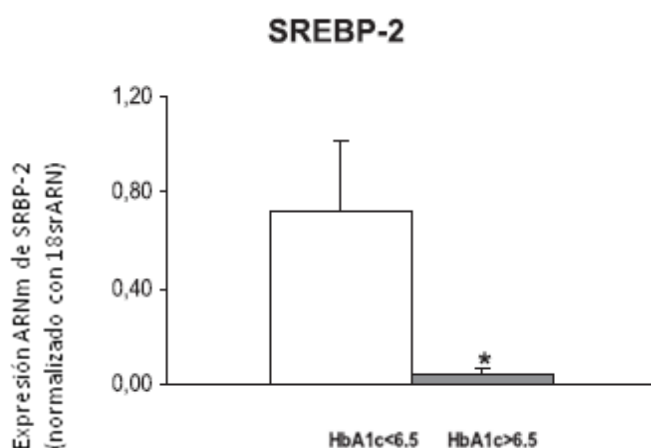


En la VF la expresión de diferentes biomarcadores, NDUFA2, Cox-2, BCL-2, CDKN1A y SREBP-2, fue significativamente mayor en los pacientes diabéticos con buen control glucémico respecto a los pacientes diabéticos con mal control. Figura 15.

**Figura 15.** Niveles de expresión de ARN en biopsias de VF de distintos biomarcadores en pacientes con buen y mal control glucémico



## Regulación de la transcripción



### 4.6. Asociación de anticuerpos anti-LDL oxidada con las distintas rutas metabólicas

La forma más aterogénica del LDL (LDL oxidada) tiene una fuerte implicación en la formación de la placa ateromatosa, por lo que fue estudiada la posible relación entre los niveles plasmáticos de anticuerpos IgG/IgM anti-LDL oxidada y los diferentes biomarcadores involucrados en las distintas rutas metabólicas (inflamación, apoptosis, ciclo celular, factor de transcripción y metabolismo lipídico).

Los niveles de anticuerpos IgG/IgM anti – LDL oxidada no mostraron ninguna correlación con los parámetros bioquímicos estudiados. Únicamente en la APO fue observada una correlación negativa entre anticuerpos IgM anti – LDL oxidada y los niveles de LDL colesterol ( $r=0,562$   $p= 0,05$ ).

De los 46 genes estudiados tan sólo 11 genes mostraron una correlación estadísticamente significativa en ambas biopsias (APO y VF). (Tabla 3)

**Tabla 3:** Biomarcadores estudiados de distintas rutas metabólicas en APO y VF.

Gen	Nombre Gen	Secuencia Referencia	ID	Longitud amplificación
<b>Inflamación</b>				
FT	Factor Tisular	NM_001032281.2	Hs00196731_m1	126
VEGFA	Factor de Crecimiento Vascular Endotelial A	NM_003376.4	Hs00900054_m1	60
<b>Apoptosis</b>				
MMP10	Metaloproteinasa de Matriz 10	NM_002425.2	Hs00233987_m1	82
MMP2	Metaloproteinasa de Matriz 2	NM_004530.2	Hs00234422_m1	83
BAX	Proteína asociada a BCL2	NM_138761.2	Hs00180269_m1	62
Casp 3	Caspasa 3	NM_032991.2	Hs00234387_m1	100
AKT1	v-akt Oncogen Viral Homologo Timoma Murina 1	NM_005163.2	Hs00178289_m1	66
CDKN1A	Inhibidor Quinasa Ciclina Dependiente 1 <sup>a</sup>	NM_078467.1	Hs00355782_m1	66
<b>Metabolismo Lipídico</b>				
SCARB1	Receptor Scavenger Clase B, Miembro 1	NM_001082959.1	Hs00969827_m1	75
PPAR $\gamma$	Proliferador de Receptores de Peroxisoma Activados $\gamma$	NM_138711.3	Hs00234592_m1	77
<b>Factor de Transcripción</b>				
NKIRAS2	Inhibidor de la interacción Ras-like 2	NM_003998.2	Hs00765730_m1	66
<b>Genes Control</b>				
18SrRNA	18SrRNA	X03205.1	Hs99999901_s1	187
GAPDH	Gliceraldehido -3- fosfato deshidrogenasa	NM_002046.3	Hs99999905_m1	122

Cuando fueron analizadas las biopsias de APO, solamente los anticuerpos IgM anti – LDL oxidada mostraron una correlación positiva con varios biomarcadores implicados en inflamación, apoptosis y metabolismo lipídico. Sin embargo, los anticuerpos IgG anti-LDL oxidada no tuvieron correlación con ninguno de los biomarcadores estudiados. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Correlación entre los diferentes biomarcadores y los anticuerpos IgM anti – LDL oxidada en APO

Biomarcador	IgM	
	r	p
MMP10	0,597	0,05
AKT1	0,718	0,009
BAX	0,618	0,03
CDKN1A	0,575	0,05
SCARB1	0,600	0,04
VEGFA	0,663	0,03

En cambio, en las biopsias de VF, se observó una correlación positiva entre anticuerpo IgM anti – LDL oxidada con biomarcadores de inflamación, apoptosis, metabolismo lipídico y factores de transcripción, y una correlación significativa entre los anticuerpos IgG anti–LDL oxidada con algunos de los biomarcadores involucrados en apoptosis (Tabla 5).

**Tabla 5.** Correlación entre los diferentes biomarcadores y los anticuerpos anti – LDL oxidada en VF.

Biomarcador	IgG		IgM	
	R	p	r	p
<b>MMP10</b>	-0,710	0,04	NS	NS
<b>MMP2</b>	0,673	0,05	NS	NS
<b>AKT1</b>	NS	NS	0,670	0,05
<b>BAX</b>	NS	NS	0,657	0,05
<b>Casp3</b>	NS	NS	0,677	0,04
<b>NFkB</b>	NS	NS	0,659	0,05
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	NS	NS	0,686	0,04
<b>TPF1</b>	NS	NS	0,704	0,03
<b>VEGFA</b>	NS	NS	0,682	0,04

\* NS = No significativo

## 5. DISCUSIÓN.

Actualmente se conoce que la diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad que se asocia a un aumento de riesgo cardiovascular. Estudios epidemiológicos han demostrado que la resistencia a la insulina junto con otras alteraciones metabólicas que se asocian, como la dislipemia, la hipertensión y la obesidad, influyen en la precocidad y severidad de la aterosclerosis que desarrollan los pacientes con diabetes mellitus. La relación existente entre la resistencia a la insulina y el proceso aterogénico está clara, pero es compleja. Esta complejidad puede ser debida a la interacción existente entre genes involucrados en la aparición de la resistencia a la insulina con otros que regulan el metabolismo lipídico, cascada de coagulación, apoptosis y la disfunción endotelial de la pared arterial.

Sabemos que distintos factores de transcripción regulan la expresión de genes que codifican proteínas proinflamatorias, claves en el desarrollo de la placa de ateroma (105), y que en el estado de resistencia a la insulina existen múltiples factores activadores que pueden explicar la precocidad y severidad del proceso aterogénico (106).

Además, la mejora del control glucémico en pacientes diabéticos, podría condicionar el desarrollo de la placa cuando la lesión endotelial ya se encuentra establecida.

Por otro lado, es interesante estudiar qué implicación puede tener la presencia de Ac AntiLDLox en las zonas de la lesión. Como sabemos la

ateroesclerosis es consecuencia de la acumulación de exceso de lípidos en los vasos sanguíneos, lo cual desencadena una respuesta inmune que conlleva a la secreción de citoquinas inflamatorias que promueven su desarrollo, pero ¿qué niveles de expresión de biomarcadores podemos llegar a encontrar?, ¿qué ocurre en los vasos sanguíneos de los pacientes con una aterosclerosis avanzada? ¿influye el control glucémico del paciente diabético?, ¿qué efecto tiene la presencia de Ac AntiLDLox?

En este trabajo analizamos los resultados obtenidos en las biopsias de nuestros pacientes diabéticos con enfermedad isquémica sobre el desarrollo del proceso aterosclerótico.

En nuestro estudio, la VF y la AMI poseen un patrón de expresión similar, pero muy diferente al que se ve en la APO. Una de las diferencias entre el sistema arterial y venoso es que el proceso aterosclerótico se acentúa en las grandes arterias, donde se ejercen fuerzas hemodinámicas diferentes y con mayor presión que en el sistema venoso. Es un hecho ampliamente aceptado que la ruptura de la placa desempeña una función crucial en la patogénesis de los eventos vasculares y desestabilización de la placa aterosclerótica. En nuestro estudio encontramos diferencias significativas entre estos vasos como resultado de un proceso de arterosclerosis avanzada.

Cuando analizamos el nivel de expresión génico de los biomarcadores en los diferentes vasos, encontramos que la APO muestra mayores niveles que el resto de vasos, lo cual se reitera en todas las rutas metabólicas estudiadas

(trombosis, metabolismo lipídico, apoptosis, respuesta inmune). Esto nos confirma de nuevo que son los grandes vasos los que están más influenciados por la reacción inflamatoria y lipídica que conlleva el proceso aterosclerótico.

La presión arterial tiene una relación continua y positiva con la morbimortalidad de los pacientes con enfermedad cardiovascular. Este parámetro antropométrico es el único factor de riesgo en nuestro estudio que presenta una correlación significativa y positiva con los diferentes biomarcadores tanto en la APO como en la VF, siendo esta correlación negativa en la AMI.

La lesión vascular facilita la interacción entre la sangre circulante y sustancias protrombóticas, como el FT presente dentro de la lesión aterosclerótica. Nuestros resultados muestran un aumento de niveles de expresión génica de FT en la APO con respecto a la VF y la AMI, concordantes con la literatura (107).

El FT es una glicoproteína de peso molecular pequeño que inicia la cascada de la coagulación extrínseca y es considerado un importante regulador de la coagulación, la hemostasis y la trombosis. El grado de expresión del FT predice el grado de trombogenicidad de la placa aterosclerótica.

El FT se ha encontrado en muestras de pacientes en los que se les ha realizado endarterectomía de carótida aterosclerótica y, más recientemente, en algunos especímenes de lesiones ateroscleróticas en arterias coronarias de

pacientes con cardiopatía isquémica. Todo esto sugiere que esta proteína está implicada potencialmente en la complicación trombótica de la aterosclerosis después de la rotura de la placa (108).

El metabolismo lipídico, como ya conocemos, está involucrado en la formación de la placa de ateroma y posee un valor indudable como marcador de riesgo de eventos cardiovasculares futuros. Tanto los niveles de expresión a nivel de ARNm de NDUFA2 como de LRP1 están aumentados en la APO, respecto al resto de vasos estudiados. Ésto podría ser debido a que NDUFA2 es una proteína implicada en el proceso de estrés oxidativo (109) y que se produce durante la formación de la placa. Por otro lado, LRP1 está regulado por varios factores de riesgo cardiovascular como la hipercolesterolemia (110) y la hipertensión (111), además, este receptor contribuye a la absorción de agregados de LDL (112). El aumento de expresión de LRP1 en la APO sugiere que es una proteína crucial en la progresión de arterosclerosis, como se ha corroborado también en estudios previos (113,114).

El aumento de los depósitos intracelulares de lípidos en la placa de ateroma está relacionado con altos niveles de expresión de LRP1 en la región coronaria (114). Debido a ello, es lógico pensar que en aquellos vasos con más evidencia de aterosclerosis (demostrado histológicamente, como es el caso de la APO) presente mayor expresión de de ARN y proteínas implicadas en el metabolismo lipídico.

Los lípidos son capaces de activar vías intracelulares para aumentar, además de la inflamación local y sistémica, la apoptosis celular (115). Nuestros resultados mostraron, en la APO, una sobreexpresión significativa de múltiples de los biomarcadores analizados, hecho no corroborado ni en la VF ni en la AMI.

Dado que la apoptosis es un proceso muy relevante en la enfermedades cardiovasculares, analizamos las posibles implicaciones que podían tener las metaloproteinasas (MMP) , familia de endopeptidasas dependientes de zinc que degradan la matriz extracelular vascular y los componentes de la membrana basal implicados principalmente en la reparación tisular y la remodelación vascular, así como sus inhibidores tisulares naturales (TIMPs) .

Sabemos que las MMPs median la desestabilización de la placa aterosclerótica y que la ruptura de la misma participa de forma crucial en la patogénesis de los eventos cardiovasculares. Nuestros resultados muestran un incremento de los niveles de expresión génica, tanto de MMP2 como de MMP9 en la APO, lo cual concuerda con datos publicados previamente (116). Ambas MMPs ejercen acciones pro- y anti-inflamatorias, las cuales están asociadas con la rigidez arterial y la hipertensión esencial (117).

Estas MMPs están reguladas por citoquinas pro-inflamatorias, LDLox, o situaciones de resistencia a la insulina, donde se incrementa el estrés oxidativo, además de por sus TIMPs (118).

Estos TIMPs, concretamente, TIMP1 y TIMP3, presentan mayores niveles de expresión en la arteria con aterosclerosis avanzada (APO), lo cual concuerda con la literatura (119,120) respecto al resto de los vasos estudiados, VF y AMI.

Por otro lado, TIMP-1 y TIMP-3 son inhibidores endógenos regulados por LDLox en las células endoteliales vasculares (121), y son mecanismos de compensación para evitar la ruptura de la placa de ateroma. Por tanto en aquellos vasos donde hay más aterosclerosis, habrá más expresión de TIMP-1 y TIMP-3.

La presencia de ácidos grasos libres en exceso en los tejidos periféricos puede empeorar la resistencia a la insulina y puede estar involucrada en la activación de los procesos inflamatorios a través de la activación de los receptores de tipo toll (TRL) (122). TLR son una familia de receptores de reconocimiento de patrones que se encuentran en diversas células inflamatorias (123). En nuestro estudio, encontramos que TLR2 presenta un incremento de expresión en la APO en comparación con la VF y la AMI.

Por tanto, y a raíz de los resultados obtenidos, podemos afirmar que en aquellos vasos con aterosclerosis avanzada, (en nuestro caso la APO), existen mayores niveles de expresión génica (tanto ARN como proteica) de algunos biomarcadores constituyentes de las diferentes rutas metabólicas implicadas en el proceso aterosclerótico.

Con todos estos datos, cabe preguntarnos ¿qué aporta dicho conocimiento a nuestra práctica clínica diaria?, ¿podríamos actuar sobre estos biomarcadores para enlentecer el proceso aterosclerótico? y, si es así, ¿de qué forma?

El hecho concordante de que en vasos con mayor presencia de ateromas exista un aumento de expresión de genes involucrados en diferentes rutas metabólicas, nos confirma que la aterosclerosis es un proceso multifactorial en el que tiene implicación, además de múltiples factores de riesgo, otros biomarcadores implicados en inflamación, metabolismo lipídico o apoptosis. Por todo ello es importante modificar y disminuir los hábitos propios del paciente: reducir el consumo de dieta rica en grasas, el tabaquismo o la falta de ejercicio. Administrar distintos tipos de medicamentos según las características del paciente como pueden ser anticoagulantes para disminuir el riesgo de trombosis, antiagregantes plaquetarios que favorezca el riego vascular, y evidentemente fármacos que ayuden al control de la tensión arterial y el colesterol.

Recientemente (124), la Sociedad Internacional de la Aterosclerosis (International Atherosclerosis Society -IAS-), emitió recomendaciones respecto a la disminución de los niveles de colesterol y manejo de la dislipemia, buscando el abatimiento del riesgo de enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

Es bien conocido, y así queda demostrado, que la dieta mediterránea, reduce la incidencia de eventos cardiovasculares mayores en las personas con alto riesgo cardiovascular (125).

En el estudio PREDIMED (126) realizado con 772 participantes, puede comprobarse que una intervención con una dieta mediterránea (aceite de oliva y frutos secos) a los 3 meses, reduce la presión arterial, mejora el perfil lipídico (con aumento del colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL-c) y reducción del colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL-c)) y disminuye los marcadores de inflamación relacionados con la arteriosclerosis.

En estudios posteriores, se ha comprobado que esta intervención también disminuye la concentración plasmática LDLox y otros marcadores sistémicos de oxidación, así como los parámetros inflamatorios celulares y séricos relacionados con la aparición y la progresión de la arteriosclerosis (127).

Se ha visto que niveles altos de LDL y particularmente de su forma oxidada están correlacionados con la aterosclerosis (31,128-131). La oxidación de las LDL, que es una etapa crucial en la aterosclerosis (128), puede ser inhibida por las HDL a través de sus componentes oxidables o sus enzimas asociadas tales como las similares a paraoxonasas y la PAF-acetilhidrolasa.

Por otro lado, en prevención secundaria, la utilización de algunos fármacos en el tratamiento de la diabetes y la aterosclerosis como metformina,

pioglitazonas y estatinas pueden ejercer sus efectos de protección a través de la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), la cual tiene potencialmente efectos beneficiosos anti-ateroscleróticos, como la reducción de la adherencia de la célula inflamatoria, la acumulación de lípidos y la proliferación de células inflamatorias (132-134).

La activación de AMPK tiene un número de efectos anti-ateroscleróticos potencialmente beneficiosos incluyendo la reducción de la adhesión de células inflamatorias en el endotelio de los vasos sanguíneos, reduciendo la acumulación de lípidos y la proliferación de las células inflamatorias causadas por LDLox, la estimulación de la expresión de genes responsables de células antioxidantes y la estimulación de enzimas responsables de la formación de óxido nítrico. En los seres humanos y animales la cascada de AMPK desencadena mecanismos protectores vasculares que han demostrado reducir la lesión isquémica del miocardio. Todos estos datos sugieren que la activación y la función de la AMPK contribuyen a la salud cardiovascular (134).

Como hemos comentado, las tiazolidinedionas, como la pioglitazona, son capaces de inhibir el proceso aterosclerótico. Sin embargo, su efecto sobre la posible inhibición de la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo en las placas ateroscleróticas avanzadas sigue siendo desconocido (133).

Otros fármacos como los inhibidores de la HMG-CoA reductasa (simvastatina), inhiben el crecimiento de células musculares lisas (CML) del

endotelio vascular de en condiciones de hiperglucemia y retrasan la producción de colesterol en el cuerpo para disminuir el proceso aterosclerótico. Además, simvastatina promueve la expresión de proteínas p53, p16, p21, p27 y disminuye la actividad de las ciclinas CDK2/CDK4, implicados en la detención del ciclo celular, lo cual conduce a la apoptosis de la célula (132).

¿Y qué ocurre con los diferentes biomarcadores cuando los analizamos en función del control glucémico del paciente diabético? Es probable que los estados de hiperglucemia conduzcan a alteraciones en las vías de transducción de señales, viéndose afectada la expresión génica causando disfunción celular.

La hiperinsulinemia se relaciona con la regulación de SREBP2 (135), lo que podría entrar en conflicto con nuestros resultados. El factor de transcripción SREBP2, muestra mayores niveles de expresión en la VF de pacientes con buen control glucémico y además es capaz de controlar la expresión de algunos genes implicados en la síntesis de receptores de LDL (receptor CD36), como ya demostró previamente nuestro grupo (136). Sampson y col. (137) demostraron que los sujetos diabéticos con buen control glucémico presentan mayor expresión de CD36, lo que podría reflejar una eficiencia postranscripcional de este receptor y por lo tanto un mayor metabolismo de LDLox en estos pacientes.

Ante la pregunta de si es necesario un estricto control glucémico, y qué ocurre con los biomarcadores implicados en las diferentes vías metabólicas u qué implicaciones tiene a nivel cardiovascular, en nuestro estudio objetivamos

que cuando el proceso arteriosclerótico se estudia comparando el buen o mal control glucémico, se observa que la expresión de genes implicados en la inflamación se incrementa en la VF de pacientes con buen control diabético.

En contraste las arterias en estado avanzado de trombosis, como en la APO, donde la luz vascular está casi completamente obstruida, el control de la glucemia no parece ejercer ningún efecto sobre el perfil de expresión génica.

Por tanto, cuando comparamos las arterias ocluidas con otros vasos sin ateroma en pacientes diabéticos y con aterosclerosis, encontramos diferencias significativas en los marcadores biológicos implicados en el metabolismo lipídico y en la inflamación, destacando que aquellos pacientes con aterosclerosis avanzada, el control estricto de la glucemia no va a modificar los niveles de expresión génica, ya que el daño tisular ya está establecido.

Los resultados de nuestro trabajo concuerdan con estudios previos que demuestran que el control estricto de la glucemia no mejora la progresión de la enfermedad cardiovascular en situaciones de aterosclerosis avanzada (138-139).

Poco se conoce sobre qué posible efecto podría ejercer la presencia de anticuerpos antiLDLox (IgM e IgG) sobre el proceso arteriosclerótico. Está demostrado que la inmunoglobulina IgM tiene un carácter protector, contrario al efecto que posee la inmunoglobulina IgG, con un marcado carácter proaterogénico (140).

En nuestros resultados podemos observar que en pacientes con enfermedad arterial periférica, la estirpe de la IgM correlaciona significativa y positivamente con el estado aterosclerótico que presenta la APO, datos concordantes con la literatura (140) y que podrían ser explicados como mecanismo compensatorio del organismo frente a la lesión aterosclerótica.

Sin embargo, esta estirpe estaba en equilibrio con la IgG dentro del sistema venoso, lo cual podría estar evitando la formación de la placa de ateroma.

Ya en 2009, Lewis y col. demostraron en ateromas aórticos de modelos murinos knockout para receptores de LDL, que la inmunoglobulina IgM es necesaria como mecanismo de ateroprotección y que existe una mayor apoptosis celular en estas zonas ateromatosas (141).

Por otro lado, de todas las características bioquímicas y antropométricas de nuestra población de pacientes diabéticos, y en concordancia con otros estudios (77-79), sólo los niveles plasmáticos de c-LDL mostraron una correlación negativa con la inmunoglobulina IgM.

Se ha visto que sujetos que son positivos para anticuerpos anti-LDLox presentan niveles significativamente más bajos de colesterol total y de LDL-c (77), existiendo, además, una correlación negativa entre ellos. Esta relación inversa junto con las discordancias ya publicadas, sugiere que la relación entre anticuerpos anti-LDLox, la aterosclerosis y los lípidos es muy compleja.

Pero, ¿existe alguna correlación significativa entre la presencia de los anticuerpos anti-LDLox y la sobreexpresión de diferentes biomarcadores implicados en las rutas metabólicas del proceso aterosclerótico?

Durante la formación de la placa, las células musculares migran a la capa íntima, donde proliferan y generan algunos de los biomarcadores inflamatorios propios de la placa de ateroma. En la última década, se ha sugerido que el factor de crecimiento VEGFA, actúa de manera proinflamatoria en las células endoteliales y que está involucrado en el proceso aterosclerótico. EL VEGF promueve la angiogénesis, pero también ejercen determinados efectos que alteran el desarrollo de la placa aterosclerótica (142).

Nuestros resultados muestran una asociación significativa y positiva entre la inmunoglobulina IgM y el factor de crecimiento VEGFA, tanto en la VF como en la APO.

El inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) es una proteína implicada en el metabolismo y modificación proteica (143). Nuestros resultados muestran una correlación significativa y positiva con IgM en VF, lo podría formar parte del mecanismo de defensa del vaso frente a la aparición de la lesión ateromatosa. Esta correlación no se da en la APO.

Como sabemos, las MMPs están involucradas, en la proliferación, la migración y la diferenciación celular, así como en angiogénesis, apoptosis, y defensa celular. Participan también en el mantenimiento de la permeabilidad

vascular después de un evento trombótico, que requiere la eliminación de fibrina mediante una enzima proteolítica que implica a éstas y a la plasmina (144). En nuestro estudio encontramos que en la APO MMP10, involucrada en la disrupción de la placa, se correlaciona positivamente con niveles elevados de anticuerpos anti LDLox IgM. Esto vuelve a darnos evidencias del posible mecanismo compensatorio que se estaría librando en el entorno aterogénico dentro de esta arteria.

Por otro lado, algunos biomarcadores involucrados en el metabolismo lipídico, también muestran estar correlacionados con los anticuerpos anti-LDLox.

El receptor *scavenger* (SR) clase B tipo I (SCARB1) es un receptor multifuncional que media el transporte de lípidos de forma bidireccional en el macrófago (145). En las células periféricas, la captación de lípidos por SR favorece el inicio de la cascada proinflamatoria vinculada a la aterosclerosis, lo cual estaría en concordancia con los resultados encontrados en nuestro estudio. Observamos que existe una correlación positiva entre los niveles de expresión de SCARB1 y la IgM únicamente en la APO y no en la VF.

El receptor activado por el proliferador de peroxisomas PPAR $\gamma$ , también se correlaciona positivamente con los niveles de IgM en VF. Se ha demostrado que PPAR $\gamma$  ejerce efectos antiinflamatorios y que los agonistas de PPAR $\gamma$  inhiben la progresión de la aterosclerosis en los seres humanos (146).

La activación de PPAR $\gamma$  por sus ligandos podría modular la transcripción de genes como NF $\kappa$ B, lo que conduce a varios efectos anti- aterogénicos y fibrinolíticos (147). Esto concuerda con nuestros resultados ya que encontramos que en VF, NF $\kappa$ B presenta una correlación positiva con los niveles de anticuerpos anti LDLox IgM.

Hace ya algunas décadas que la apoptosis ha sido implicada en el proceso aterosclerótico (148,149) ya que podría inducir a una regresión de las lesiones reestenóticas y placas ateroscleróticas primarias (150,151). Sin embargo, la apoptosis también podría tener efectos negativos en la estabilidad de las placas ateroscleróticas (152).

Nuestros resultados muestran que biomarcadores como Akt1, implicado en activación de la vía PI3K/Akt, la cual conduce a una respuesta proliferativa y anti-apoptótica (153), y Bax, como regulador de la apoptosis, tienen una correlación positiva con la IgM tanto en APO como en VF. Por otro lado, también Casp3, mostró esta correlación en la vena.

Se ha demostrado que en las células endoteliales de la vena umbilical humana; la apoptosis inducida por la LDLox, se asoció con la regulación positiva de genes proapoptóticos como, Bax, y Casp3 y la inhibición de los genes AKT1 antiapoptóticas acompañado con cambios recíprocos en la metilación de regiones promotoras de estos genes (154).

La metilación del ADN se hereda generalmente de forma estable en las generaciones consecutivas de células adultas, pero las alteraciones de los patrones de metilación normales se han observado en algunos estadios de enfermedades como el cáncer y la aterosclerosis (155).

Los patrones de metilación aberrantes del ADN pueden conducir al proceso aterogénico por hipo- e hiper-metilación de los genes (156) ó vinculándolo con el aumento del contenido de la homocisteína (157).

Un estudio, (158) ha puesto de manifiesto la implicación crítica del LDLox en el desarrollo de la apoptosis. Ésta se observa en todas las etapas evolutivas del proceso aterogénico, sin embargo, su participación en etapas posteriores de desarrollo de la placa no está claro. A este respecto, se ha sugerido que la apoptosis se reduce a medida que avanza la placa aterosclerótica (159).

Se ha demostrado que LDLox provoca un aumento de la metilación del ADN global y participa en la reprogramación epigenética de las células endoteliales que las hace resistentes a la apoptosis. El aumento de la tolerancia a la LDLox está aparentemente relacionado con la hiper-metilación de regiones promotoras de los genes proapoptóticos e hipo-metilación de los genes antiapoptóticos. Este fenómeno de reducción de la apoptosis en el avance de la placa tiene importantes consecuencias fisiopatológicas en el desarrollo de la aterosclerosis (154). En este sentido, se podría plantear la hipótesis de que, debido a esta correlación entre estos biomarcadores y

anticuerpos anti LDLox IgM, estos anticuerpos podrían tener una función protectora en la placa de ateroma.

Por otro lado, se demostró que Casp 3 es capaz de escindir específicamente CDKN1A y puede desencadenar la vía de la apoptosis (160). CDKN1A es un regulador de la progresión del ciclo celular en G1. (161) La expresión de este gen es modulada por la proteína p53 supresora de tumores (162). En este estudio, se encontró una correlación positiva entre CDKN1A y anticuerpos anti LDLox IgM en la APO.

Por tanto, los resultados de este estudio muestran que la expresión de los genes que actúan en las vías metabólicas como la inflamación, el metabolismo lipídico y la apoptosis de los vasos sanguíneos está directamente relacionado con los niveles de anticuerpos antiLDLox, especialmente en la VF y la APO, aunque, como este es un estudio transversal, no podemos determinar si los anticuerpos anti LDLox IgM tienen un efecto favorable en la inestabilidad de las placas, si ejerce una respuesta compensatoria de protección o si son simplemente un marcador correlativo de la presencia de células inflamatorias en los pacientes diabéticos.

## **LIMITACIONES DEL ESTUDIO.**

1. Este trabajo es el estudio transversal de un patología concreta (enfermedad arterial periférica en pacientes diabéticos tipo 2), por lo que no podemos extrapolar nuestros resultados a otras patologías en las que también exista una aterosclerosis avanzada.
2. Al ser un estudio genético con técnicas de elevado coste económico, el tamaño muestral es reducido.
3. Por otro lado, no podemos determinar si niveles de anticuerpos IgM anti-LDL oxidada ejercen algún efecto sobre la inestabilidad de la placa de ateroma, si median una respuesta compensatoria de protección o si, por el contrario, no son más que un marcador relacionado con la presencia de células inflamatorias en diabéticos pacientes.

## **6. CONCLUSIONES.**

- 1. Las arterias poplíteas ocluidas de pacientes con diabetes tipo 2, en comparación con las arterias mamarias libres de aterosclerosis, presentan una alta expresión de biomarcadores de apoptosis, de inflamación y de metabolismo lipídico.*
- 2. El mal control glucémico no modifica la expresión génica de diferentes biomarcadores proateroscleróticos (apoptosis, inflamación, metabolismo lipídico) en las arterias poplíteas ocluidas de pacientes con diabetes tipo 2.*
- 3. Existe una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de anticuerpos anti-LDL oxidada IgM y la expresión génica de diferentes biomarcadores implicados en la aterogénesis (apoptosis, inflamación, metabolismo lipídico) en las arterias poplíteas ocluidas de pacientes con diabetes tipo 2.*

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

1. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG; TASC II Working Group. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg.* 2007; 45 Suppl S:S5-67.
2. Blanes JI, Cairols MA, Marrugat J; ESTIME. Prevalence of peripheral artery disease and its associated risk factors in Spain: The ESTIME study. *Ont Angiol.* 2009; 28(1): 20-5.
3. Forés R, Alzamora MT, Baena JM, Pera G, Torán P, Ingla J; Infradiagnóstico de la arteriopatía periférica en la población española. Estudio ARTPER. *Med Clin (Barc).* 2010; 135(7): 306-9.
4. Escobar C, Blanes I, Ruiz A, Vinvesa D, Montero M, Rodríguez M, et al. Prevalence and clinical Profile and management of peripheral arterial disease in edarly patients with diabetes, *Eur J Intern Med.* 2011; 22(3): 275-81.
5. Mancera J, Paniagua F, Martos I, Baca A, Ruiz S, González P, et al. Enfermedad arterial periférica oculta en población diabética seguida en Atención Primaria. *Clin Invest Arterioscl.* 2010; 22(4): 154-61.
6. Kannel WB, Skinner JJ, Schwartz MJ, Shurtleff D. Intermittent claudication. Incidence in the Framingham Study. *Circulation.* 1970; 41(5):875-83.
7. Saito I, Folsom AR, Brancati FL, Duncan BB, Chambless LE, McGovern PG. Nontraditional risk factors for coronary heart disease incidence among persons with diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Ann Intern Med* 2000; 133(2): 81-91.
8. Villar F, Banegas JR, Donado JM, Rodríguez Artalejos F. Las enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo en España: hechos y cifras. Informe SEA 2003. Madrid: Sociedad Española de Arterioesclerosis (SEA), 2004.
9. Selvin E, Erlinger TP. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Circulation.* 2004; 110(6):738-43.
10. Kullo IJ, Bailey KR, Kardia SL, Mosley TH Jr, Boerwinkle E, Turner ST. Ethnic differences in peripheral arterial disease in the NHLBI Genetic Epidemiology Network of Arteriopathy (GENOA) study. *Vasc Med.* 2003; 8(4): 237-42.
11. Tendera M, Aboyans V, Bartelink ML, Baumgartner I, Clément D, Collet JP, et al. ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases. *European Heart Journal.* 2011; 32(22): 2851- 906.

12. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country – years and 2-7 million participants. *Lancet*. 2011; 378(9785):31-40.
13. Lam DW, LeRoith D. The worldwide diabetes epidemic. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2012; 19(2): 93-96.
14. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A, Carmena R, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia*. 2012; 55(1):88-93.
15. Yorkshire and Humer public health observatory. Diabetes attributable deaths: estimating the excess deaths among people with diabetes. [www.yhpho.org.uk/](http://www.yhpho.org.uk/) Revisado el 25 Noviembre 2011.
16. Goday A. Epidemiology of diabetes and its non-coronary complications. *Rev Esp Cardiol*. 2002; 55(6):657-70.
17. Veresiu IA. Assesment of peripheral vascular disease. En: Hâncu N. Cardiovascular risk in type 2 diabetes mellitus. Berlin: Springer Verlag; 2003.p. 227-39.
18. Bundó M, Muñoz L, Pérez C, Montero J, Montero N, Toran P, et al. Asymptomatic peripheral arterial disease in type 2 Diabetes Patients: A 10 years follow up study of the utility of the ankle brachial index as a prognostic marker of cardiovascular disease. *Ann Vasc Surg*. 2010; 24(8): 985-93.
19. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, et al. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/ Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter- Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation*. 2006; 113(11): e463-654.
20. Luque Otero M, Martell Claros N. Hipertensión arterial y síndrome metabólico. *Med Clin (Barc)*. 2004; 123(18):707-11.
21. Cheung BM, Ong KL, Wong LY. Elevated serum alkaline phosphatase and peripheral arterial disease in the United States National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2004. *Int J Cardiol*. 2009; 135(2): 156-61.
22. Hirsch AT, Criqui MH, Treat-Jacobson D, Regensteiner JG, Creager MA, Olin JW, et al. Peripheral Arterial Disease Detection, Awareness, and Treatment in Primary Care. *JAMA*. 2001; 286(11): 1317-24.

23. Sentí M, Nogués X, Pedro-Botet J, Rubiés- Prat J, Vidal-Barraquer F. Lipoprotein Profile in men with peripheral vascular disease. Role of intermediate density lipoproteins and apoprotein E phenotypes. *Circulation*. 1992; 85(1): 30-6.
24. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation*. 1998; 97(5): 425-8.
25. Kendrick J, Ix JH, Targher G, Smits G, Chonchol M. Relation of serum phosphorus levels to ankle brachial pressure index (from the Third National Health and Nutrition Examination Survey). *Am J Cardiol*. 2010; 106(4): 564-8.
26. Shankar A, Klein BE, Nieto FJ, Klein R. Association between serum uric acid level and peripheral arterial disease. *Atherosclerosis*. 2008; 196(2): 749-55.
27. McDermott MM, Criqui MH, Greenland P, Guralnik JM, Liu K, Pearce WH, et al. Leg strength in peripheral arterial disease: associations with disease severity and lower-extremity performance. *J Vasc Surg*. 2004; 39(3): 523-30.
28. Eraso LH, Fukaya E, Mohler ER 3rd, Xie D, Sha D, Berger JS. Peripheral arterial disease, prevalence and cumulative risk factor profile analysis. *Eur J Prev Cardiol*. 2014; 21(6):704-11.
29. Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S Jr, Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk factor assessment equations. A statement for healthcarre professionals from the American Heart Association.
30. Dock W. Research in arteriosclerosis; the first fifty years. *Ann Intern Med*. 1958; 49(3): 699–705.
31. Ross, R., Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340(2): 115-26.
32. Fuster V, Stein B, Ambrose JA, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis. Evolving concepts. *Circulation*. 1990; 82(3 Suppl):II47-59.
33. Ouriel K. Peripheral arterial disease. *Lancet*. 2001 Oct 13;358 (9289):1257-64.
34. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lesson from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 May;20(5):1262-75.
35. Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA* 1998; 279: 1477-82.
36. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuffi AG, Pepys MB et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med*. 1994; 331(7): 417-24.
37. Fiesta A, D'Agostino R Jr, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 2000; 102(1): 42-47.

38. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(4): 972-8.
39. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996; 271(5249): 665-8.
40. Nilsson J, Jovinge S, Niemann A, Reneland R, Lithell H. Relation between plasma tumor necrosis factor- $\alpha$ - and insulin sensitivity in elderly men with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18(8): 1199-1202.
41. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20(6): 1595-9.
42. Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev*. 2011; 91(1): 327-387.
43. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011; 473 (7347): 317-25.
44. Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S, et al. Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation*. 2000; 101(15): 1780-4.
45. Kirstein M, Brett J, Radoff S, Ogawa S, Stern D, Vlassara H. Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor: role in vascular disease of diabetes and aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87(22): 9010-4.
46. Best PJ.M, Hasdai D, Sangiorgi G, Schwartz RS, Holmes DR Jr, Simari RD, et al. Apoptosis. Basic concepts and implications in coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19(1):14-22.
47. Kockx MM. Apoptosis in the atherosclerotic plaque. Quantitative and qualitative aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18(10):1519-22.
48. Kockx MM, Herman AG. Apoptosis in atherogenesis: implications for plaque destabilization. *Eur Heart J* 1998; 19(Suppl G): G23-8.
49. Geng YG, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma: colocalization with interleukin 1 $\beta$  converting enzyme. *Am J Pathol*. 1995; 147(2): 251-66.
50. Geng YG, Wu Q, Muszynski M, Hansson GK, Libby P. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ . *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; 16(1):19-27.
51. Hamet P. Proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle in hypertension. *Am J Pathol*. 1998;152(2): 523-32.

52. Businaro R, Digregorio M, Riganò R, Profumo G, Buttari B, Leone S, et al. Morphological analysis of cell subpopulations within carotid atherosclerotic plaque. *Ital J Anat Embryol* 2005; 110 (2 Suppl. 1): 109-15.
53. Zhou X, Stemme S, Hansson G. Evidence for a local immune response in atherosclerosis. CD4+ T cells infiltrate lesions of apolipoprotein-E-deficient mice. *Am J Pathol.* 1996; 149(2): 359-66.
54. Reardon C, Blachowicz L, White T, Cabana V, Wang Y, Lukens J, et al. Effect of immune deficiency on lipoproteins and atherosclerosis in male apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21(6): 1011-1016.
55. Frostergard J, Ulfgren A, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: Dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis.* 1999; 145(1): 33-43.
56. Leon M, Zuckerman S. Gamma interferon: A central mediator in atherosclerosis. *Inflamm Res.* 2005; 54(10): 395-411.
57. Tenger C, Sundborger A, Jawien J, Zhou X. IL-18 accelerates atherosclerosis accompanied by elevation of INF- $\gamma$  and CXCL16 expression independently of T cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(4):791-6.
58. Robertson A, Hansson G. T cells in atherogenesis: For better or for worse?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26(11): 2421-32.
59. Binder C, Hartvigsen K, Chang M, Miller M, Broide D, Palinski W, et al. IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2004; 114(3): 427-37.
60. Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin-10. *J Exp Med.* 1991; 174(6): 1549-55.
61. Lee Y, Kuhn H, Henning B, Neish A, Toborek M. IL-4-induced oxidative stress upregulates VCAM-1 gene expression in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33(1): 83-94.
62. Lee Y, Henning B, Toborek M. Redox-regulated mechanism of IL-4 induced MCP-1 expression in human vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284(1): 185-92.
63. Chait A, Brazg R, Tribble D, Krauss R. Susceptibility of small dense low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype pattern B. *Am J Med.* 1993; 94(4): 350-6.
64. Patel RS, Al Mheid I, Morris AA, Ahmed Y, Kavtaradze N, Ali S, et al. Oxidative stress is associated with impaired arterial elasticity. *Atherosclerosis.* 2011; 218(1): 90-5.
65. Kune N, Cybulsky M, Gimbrone M. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoprotein, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 1992; 90(3): 1138-44.

66. Li D, Mehta L. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation* 2000; 101(25): 2889-95.
67. Breslow JL. Genetics of lipoprotein abnormalities associated with coronary artery disease susceptibility. *Annu Rev Genet.* 2000; 34: 233-54.
68. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low density lipoprotein that increases its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* 1989. 320(14): 915-24.
69. Takahashi Y, Zhu H, Yoshimoto T. Essential roles of lipoxygenases in LDL oxidation and development of atherosclerosis.. *Antioxid. Redox Signal.* 2005; 7(3-4): 425-31.
70. Gaziano JM. Dietary antioxidants and cardiovascular disease. *Vitam Horm* 2000;58:299–320.
71. Catapano AL, Maggi FM, Tragni E. Low density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis. *Curr Opin Cardiol* 2000;15(5): 355–63.
72. Palinski W, Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, et al. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(4):1372–76.
73. Inoue, T, Uchida T, Kamishirado H, Takayanagi K, Hayashi T, Morooka S. Clinical significance of antibody against oxidized low density lipoprotein in patients with atherosclerotic coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; 37(3): 775–79.
74. Che J, Li G, Wang W, Li Q, Liu H, Chen K, Liu T. Serum autoantibodies against human oxidized low-density lipoproteins are inversely associated with severity of coronary stenotic lesions calculated by Gensini score. *Cardiol J.* 2011; 18 (4):364-70.
75. Wang JJ, Han AZ, Meng Y, Gong JB, Zhang CN, Li K, et al. Measurement of oxidized lipoprotein(a) in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease by 2 ELISAs: using different capture antibody against oxidized lipoprotein(a) or oxidized LDL. *Clin Biochem.* 2010; 43(6): 571-75.
76. Monaco C, Crea F, Niccoli G, Summaria F, Cianflone D, Bordone R, et al. Autoantibodies against oxidized low density lipoproteins in patients with stable angina, unstable angina or peripheral vascular disease; pathophysiological implications. *Eur Heart J.* 2001; 22(17): 1572-7.
77. Tinahones FJ, Gómez-Zumaquero JM, Rojo-Martínez G, Cardona F, Esteva de Antonio IE, Ruiz de Adana MS, et al. Increased levels of anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies are associated with reduced levels of cholesterol in the general population. *Metabolism.* 2002; 51(4): 429-31.
78. Garrido-Sanchez L, Garcia-Fuentes E, Cardona F, Rojo-Martinez G, Soriguer F, Tinahones FJ. Anti-oxidized LDL antibody levels are reduced in women with hypertension. *Eur J Clin Invest.* 2009; 39(9): 800-6.

79. Garrido-Sanchez L, Garcia-Almeida JM, Garcia-Serrano S, Cardona I, Garcia-Arnes J, Soriquer F, et al. Improved carbohydrate metabolism after bariatric surgery raises antioxidantized LDL antibody levels in morbidly obese patients. *Diabetes Care* 2008; 31(12): 2258-64.
80. Hulthe J, Wikstrand J, Lidell A, Wendelhag I, Hansson GK, Wiklund O. Antibody titers against oxidized LDL are not elevated in patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998; 18(8): 1203–11.
81. Festa A, Kopp HP, Schernthaner G, Menze EJ. Autoantibodies to oxidised low density lipoproteins in IDDM are inversely related to metabolic control and microvascular complications. *Diabetologia.* 1998; 41(3): 350–6.
82. Tinahones FJ, Gomez-Zumaquero JM, Garrido-Sánchez L, García-Fuentes E, Rojo-Martínez G, Esteva I, et al. Influence of age and sex on levels of anti-oxidized LDL antibodies and anti-LDL immune complexes in the general population. *J. Lipid Res.* 2005; 46(3): 452–7.
83. Malmberg K, Yusuf S, Gerstein HC, Brown J, Zhao F, Hunt D, et al. Impact of diabetes on long-term prognosis in patients with unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction: results of the OASIS (Organization to Assess Strategies for Ischemic Syndromes) Registry. *Circulation* 2000; 102(9): 1014-19.
84. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, et al. Diabetes and cardiovascular disease. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 1999; 100(10): 1134-46.
85. Bernal-Lopez MR, Llorente-Cortes V, Calleja, Lopez-Carmona D, Mayas MD, Gomez-Huelgas R, et al. Effect of different degrees of impaired glucose metabolism on the expression of inflammatory markers in monocytes of patients with atherosclerosis. *Acta Diabetol.* 2013; 50(4): 553-62.
86. Bernal-Lopez RM, Llorente-Cortes V, López-Carmona D, Mayas DM, Gomez-Huelgas R, Tinahones FJ, et al. Modulation of human monocyte CD36 by type 2 diabetes mellitus and other atherosclerotic risk factors. *Eur J Clin Invest.* 2011; 41(8): 854-62
87. Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, et al. Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Ann Intern Med.* 2004;141(6): 421-31.
88. Stratton IM, Adler AI, Neil HAW, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ.* 2000;321(7258): 405-12.
89. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008;359(15): 1565-76.

90. Pop – Busui R, Low PA, Waberski BH, Martin CL, Albers JW, Feldman EL, et al. Effects of prior intensive insulin therapy on cardiac autonomic nervous system function in type 1 diabetes mellitus: the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications study (DCCT/EDIC). *Circulation* 2009; 119(22): 2886-93.
91. Gómez Huelgas R. Beneficios del control glucémico en la diabetes tipo 2. Certezas e incertidumbres derivadas de los últimos estudios. *Av Diabetol.* 2009; 25: 222-8 Epub Marzo 18, 2009. Accesible en [www.sediabetes.org](http://www.sediabetes.org), último acceso 25.04.2016.
92. Gaede P, Lund-Andersen H, Parving HH, Pedersen O. Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008;358(6): 580-91.
93. Huang ES, Meigs JB, Singer DE. The effect of interventions to prevent cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Med.* 2001;111(8): 633-42.
94. Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC Jr, Bigger JT, Buse JB, et al. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008;358(24): 2545-59.
95. Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Woodward M, et al. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008;358(24): 2560-72.
96. Duckworth W, Abraira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, et al. Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2009;360(2):129-39.
97. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2015. *Diabetes Care* 2015; Vol 38. Suppl 1.
98. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106(25): 3143-421.
99. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson SD. Estimation of the concentration of lowdensity lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18(6): 499-502.
100. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985; 28(7): 412–9
101. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
102. De Jonge HJM, Fehrmann RSN, De Bont ESJM, Hofstra RMW, Gerbens F, Kamps WA, et al. Evidence Based Selection of Housekeeping Genes. *PLoS One.* 2007; 2(9): e898.
103. Chaulet H, Desgranges C, Renault MA, Dupuch F, Ezan G, Peiretti F, et al. Extracellular nucleotides induce arterial smooth muscle cell migration via osteopontin. *Circ Res.* 2001; 89(9): 772-8.

104. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U A.* 1979; 76(9):4350-4.
105. Ritchie ME. Nuclear Factor- $\kappa$ B is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris. *Circulation.* 1998; 98(17): 1707-13.
106. Golovchenko I, Goalstone ML, Watson P, Brownlee M, Draznin B. Hyperinsulinemia enhances transcriptional activity of nuclear factor- $\kappa$ B induced by angiotensin II, hyperglycemia, and advanced glycosylation end products in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2000; 87(9): 746-52.
107. Karoly ED, Li Z, Dailey LA, Hyseni X, Huang YC. Up-regulation of tissue factor in human pulmonary artery endothelial cells after ultrafine particle exposure. *Environ Health Perspect.* 2007; 115 4): 535-40.
108. Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernandez-Ortiz A, et al. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation.* 1997; 95(3): 594-9.
109. Elejalde Guerra JI. Oxidative stress, diseases and antioxidant treatment. *An Med Interna.* 2001; 18(6): 326-35.
110. Llorente-Cortes V, Otero-Viñas M, Sanchez S, Rodriguez C, Badimon L. Low-density lipoprotein upregulates low-density lipoprotein receptor-related protein expression in vascular smooth muscle cells: possible involvement of sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism. *Circulation.* 2002; 106(24): 3104-10.
111. Sendra J, Llorente-Cortés V, Costales P, Huesca-Gómez C, Badimon L. Angiotensin II upregulates LDL receptor-related protein (LRP1) expression in the vascular wall: a new pro-atherogenic mechanism of hypertension. *Cardiovasc Res.* 2008; 78(3): 581-9.
112. Llorente-Cortes V, Martínez-Gonzalez J, Badimon L. LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(6): 1572-79.
113. Hiltunen TP, Luoma JS, Nikkari T, Ylä-Herttuala S. Expression of LDL receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein, and scavenger receptor in rabbit atherosclerotic lesions: marked induction of scavenger receptor and VLDL receptor expression during lesion development. *Circulation* 1998, 97(11):1079–86.
114. Llorente-Cortes V, Otero-Viñas M, Berrozpe M, Badimon L. Intracellular lipid accumulation, low-density lipoprotein receptor-related protein expression, and cell survival in vascular smooth muscle cells derived from normal and atherosclerotic human coronaries. *Eur J Clin Invest.* 2004; 34(3):182–90.
115. Helkin A, Stein JJ, Lin S, Siddiqui S, Maier KG, Gahtan V. Dyslipidemia Part 1-Review of Lipid Metabolism and Vascular Cell Physiology. *Vasc Endovascular Surg.* 2016; 50(2): 107-18.

116. Heo SH, Cho CH, Kim HO, Jo YH, Yoon KS, Lee JH, et al. Plaque rupture is a determinant of vascular events in carotid artery atherosclerotic disease: involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9. *J Clin Neurol* 2011; 7(2):69–76.
117. Zhou S, Feely J, Spiers JP, Mahmud A: Matrix metalloproteinase-9 polymorphism contributes to blood pressure and arterial stiffness in essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 2007; 21(11):861–67.
118. Ganea E, Trifan M, Laslo AC, Putina G, Cristescu C: Matriz metalloproteinases: useful and deleterious. *Biochem Soc Trans*. 2007; 35(4): 689–91.
119. Hopps E, Caimi G. Matrix metalloproteinases as a pharmacological target in cardiovascular diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(14):2583-9.
120. Hansson J, Vasan RS, Ärnlov J, Ingelsson E, Lind L, Larsson A, et al. Biomarkers of extracellular matrix metabolism (MMP-9 and TIMP-1) and risk of stroke, myocardial infarction, and cause-specific mortality: cohort study. *PLoS One*. 2011; 6(1):e16185.
121. Huang Y, Song L, Wu S, Fan F, Lopes-Virella MF: Oxidized LDL differentially regulates MMP-1 and TIMP-1 expression in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 2001; 156(1):119–25.
122. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; 116(11):3015–25.
123. Carmody RJ, Chen YH. Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling. *Cell Mol Immunol*. 2007; 4(1):31–41.
124. Millán Núñez-Cortés, J. International Atherosclerosis Society Guidelines for Management of Dyslipidemia. *Clin Invest Arterioscl*. 2014; 26(1): 20.
125. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, et al. PREDIMED Study Investigators. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med*. 2013; 368(14):1279-90.
126. Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Ruiz-Gutiérrez V, Covas MI, et al. PREDIMED Study Investigators. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2006; 145(1):1-11.
127. Salas-Salvadó J, Fernández-Ballart J, Ros E, Martínez-González MA, Fitó M, Estruch R, et al. PREDIMED Study Investigators. Effect of a Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial. *Arch Intern Med*. 2008; 168(22): 2449-58.
128. Singh U, Jialal I. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*. 2006; 13(3): 129-142.
129. Krötz F, Hae-Young S, Pohl U. Reactiveoxygen species. Players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24(11):1988-96.
130. Steinberg D. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*. 1997; 95(4):1062-71.
131. Aldred S. Oxidative and nitrative changes seen in lipoproteins following exercise. *Atherosclerosis*. 2007; 192(1): 1-8.

132. Chan KC, Wang CJ, Ho HH, Chen HM, Huang CN. Simvastatin inhibits cell cycle progression in glucose-stimulated proliferation of aortic vascular smooth muscle cells by up-regulating cyclin dependent kinase inhibitors and p53. *Pharmacol Res.* 2008; 58(3-4): 247-256.
133. Game BA, He L, Jarido V, Nareika A, Jaffa AA, Lopes-Virella MF, et al. Pioglitazone inhibits connective tissue growth factor expression in advanced atherosclerotic plaques in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2007; 192(1): 85-91.
134. Ewart MA, Kennedy S. AMPK and vasculoprotection. *Pharmacol Ther.* 2011; 131(2): 242-53.
135. Xie X, Liao H, Dang H, Pang W, Guan Y, Wang X, et al. Down-regulation of hepatic HNF4alpha gene expression during hyperinsulinemia via SREBPs. *Mol Endocrinol.* 2009; 23(4):434–43.
136. Bernal-Lopez MR, Llorente-Cortes V, Gomez-Huelgas R, Badimon L, Tinahones FJ. Intimate relation between genic expression of scavenger receptor CD36 and SREBP2. *Proc Biochem.* 2010; 45(6): 1002-06.
137. Sampson MJ, Davies IR, Braschi S, Ivory K, Hughes DA. Increased expression of a scavenger receptor (CD36) in monocytes from subjects with Type 2 diabetes. *Atherosclerosis.* 2003; 167(1): 129-134.
138. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet.* 1998; 352(9131): 837-53.
139. Dluhy RG, McMahon GT: Intensive Glycemic Control in the ACCORD and ADVANCE Trials. *N Engl J Med* 2008, 358(24): 2630–33.
140. Burut DF, Karim Y, Ferns GA. The role of immune complexes in atherogenesis. *Angiology.* 2010; 61(7): 679-89.
141. Lewis MJ, Malik TH, Ehrenstein MR, Boyle JJ, Botto M, Haskard DO. Immunoglobulin M is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation.* 2009; 120(5): 417-26.
142. Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med.* 2001; 7(4): 425–9.
143. Bernal-Lopez MR, Garrido-Sanchez L, Gomez-Carrillo V, Gallego-Perales JL, Llorente-Cortes V, Calleja F, et al. Antioxidized LDL antibodies are associated with different metabolic pathways in patients with atherosclerotic plaque and type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2013; 36(4):1006-1.
144. Lijnen HR. Elements of the fibrinolytic system. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 936: 226–236.
145. Vergeer M, Korporaal SJ, Franssen R, Meurs I, Out R, Hovingh GK, et al. Genetic variant of the scavenger receptor B1 in humans. *N Engl J Med.* 2011; 364(2): 136-45.

146. Sugawara A, Uruno A, Matsuda K, Funato T, Saito-Hakoda A, Kudo M, Ito S. Effects of PPAR $\gamma$  agonists against vascular and renal dysfunction. *Curr Mol Pharmacol*. 2012;5(2): 2458-254.
147. Genolet R, Wahli W, Michalik L. PPARs as drug targets to modulate inflammatory responses? *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2004; 3(4):361-75.
148. Bennett M.R. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc Research*. 1999; 41(2): 361-8.
149. Kockx M.M, De Meyer G.R.Y, Muhring J, Jacob W, Bult H, Herman AG. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1998; 97(23): 2307-15.
150. Pollman MJ, Hall JL, Mann MJ, Zhang L Gibbons GH. Inhibition of neointimal cell Bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nat Med*. 1998; 4(2):222-7.
151. Wang BY, Ho HKV, Lin PS, Schwarzacher SP, Pollman MJ, Gibbons GH, et al. Regression of atherosclerosis: Role of nitric oxide and apoptosis. *Circulation*. 1999; 99(9):1236-41.
152. Kockx MM, Herman AG. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res*. 2000; 45(3): 736-46.
153. Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, Crackower MA, Penninger JM, Backx PH. The role of phosphoinositide-3kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;37(2): 449-71.
154. Mitra S, Khaidakov M, Lu J, Ayyadevara S, Szwedo J, Wang XW, et al. Prior exposure to oxidized low-density lipoprotein limits apoptosis in subsequent generations of endothelial cells by altering promoter methylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301(2): H506-13.
155. Dong C, Yoon W, Goldschmidt-Clermont PJ. DNA methylation and atherosclerosis. *J Nutr*. 2002; 132(8 Suppl): 2406S–2409S.
156. Newman PE. Can reduced folic acid and vitamin B12 levels cause deficient DNA methylation producing mutations which initiate atherosclerosis? *Med Hypotheses*. 1999; 53(5): 421–4.
157. Zaina S, Lindholm M, Lund G. Nutrition and aberrant DNA methylation patterns in atherosclerosis: more than just hyperhomocysteinemia? *J Nutr*. 2005; 135(1):5–8.
158. Mehta JL. Oxidized or native low-density lipoprotein cholesterol: which is more important in atherogenesis? *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48(5): 980–2.
159. Tekabe Y, Li Q, Luma J, Weisenberger D, Sedlar M, Harja E. Noninvasive monitoring the biology of atherosclerotic plaque development with radiolabeled annexin V and matrix metalloproteinase inhibitor in spontaneous atherosclerotic mice. *J Nucl Cardiol*. 2010; 17(6): 1073–81.

160. Al-Khalaf HH, Hendrayani SF, Aboussekhra A. ATR controls the p21 (WAF1/Cip1) protein up-regulation and apoptosis in response to low UV fluences. *Mol Carcinog.* 2012; 51(12): 930-8.
161. Tokumoto M, Tsuruya K, Fukuda K, Kanai H, Kuroki S, Hirakata H, et al. Parathyroid cell growth in patients with advanced secondary hyperparathyroidism: vitamin D receptor and cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18 (Suppl 3): iii9-12.
162. El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 1994; 54(5): 1169-74.

## **8. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS.**

- *Bernal-Lopez MR, Llorente-Cortes V, Gomez-Carrillo V , Lopez-Carmona D, Calleja F, Gomez-Huelgas R, et al. Alterations of specific biomarkers of metabolic pathways in vascular tree from patients with Type 2 diabetes. Cardiovascular Diabetology. 2012 ;11:86.*
- *Bernal-López MR, Garrido-Sánchez L, Gómez-Carrillo V, Gallego-Perales JL, Llorente-Cortes V, Calleja F, et al. Antioxidized LDL antibodies are associated with different metabolic pathways in patients with atherosclerotic plaque and type 2 diabetes. Diabetes Care. 2013; 36(4):1006-11.*