



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“DESEQUILIBRIO DE LAS METALOPROTEINASAS EN EL
DESARROLLO ATROSCLEROTICO”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

P R E S E N T A:

MED. CIR. CARMONA GONZÁLEZ CARLOS AMIR

DIRECTORES:

**DRA. EN C. PAULA FIGUEROA ARREDONDO
DR. EN C. CITLALTEPETL SALINAS LARA**



MEXICO, D.F. A 15 DE JUNIO DE 2012



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 10:00 horas del día 15 del mes de Junio del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de La Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía para examinar la tesis titulada:

Desequilibrio de Metaloproteinasas en el Desarrollo Aterosclerótico

Presentada por el alumno:

Carmona	González	Carlos Amir							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
		Con registro:	A	1	0	0	6	2	1

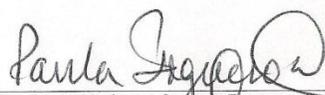
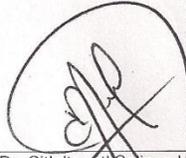
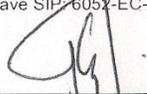
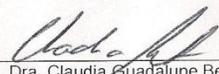
aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

 _____ Dra. Paula María del Carmen Figueroa Arredondo Profesor Colegiado Clave SIP: 6052-EC-09	 _____ Dr. Citlalpetétl Salmas Lara Profesor Invitado Clave SIP: 7270-EA-10
 _____ Dr. Fernando Enriquez Rincón Profesor Invitado Clave SIP: 7110-EB-10	 _____ Dra. Claudia Guadalupe Benitez Cardoza Profesor Colegiado Clave SIP: 6964-EC-10
 _____ Dr. Cesar Augusto Cardino Reyes López Profesor Colegiado Clave SIP: 6512-EB-09	

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


 SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA
 INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
 ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA
 SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

Dr. Cesar Augusto Cardino Reyes López
 Profesor Colegiado
 Clave SIP: 6512-EB-09

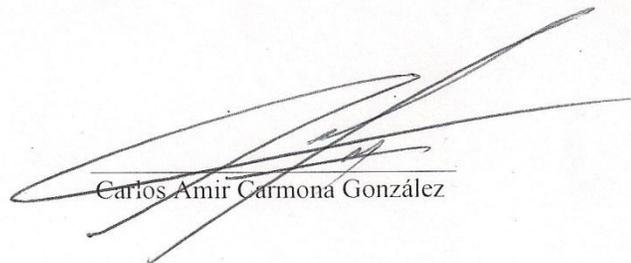


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 15 del mes Junio del año 2012, el que suscribe Carlos Amir Carmona González alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular con número de registro A100621, adscrito a la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Paula María del Carmen Figueroa Arredondo y cede los derechos del trabajo intitulado Desequilibrio de Metaloproteinasas en el Desarrollo Aterosclerótico, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección dr.carlos.amir.carmona@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Carlos Amir Carmona González

1. Índice	I
2. Dedicatoria	III
3. Agradecimientos	IV
4. Lista de Figuras	1
5. Lista de Tablas	3
6. Abreviaturas	3
7. Resumen	4
8. Abstract	5
9. Introducción	6
10. Generalidades de Aterosclerosis	8
11. Formación de la Placa Ateromatosa	9
12. Metaloproteasas y Aterosclerosis	15
13. Sistema Fibrinolítico en Aterosclerosis	20
14. Morfología Histopatológica	22
15. Antecedentes	25
16. Justificación	30
17. Pregunta de Investigación	31
18. Hipótesis	31
19. Objetivos	31
20. Metas	32

21. Estrategia experimental	33
22. Material y Métodos	34
23. Tipo y Diseño De Estudio	34
24. Universo de estudio	35
25. Tamaño de muestra	35
26. Criterios de Inclusión	35
27. Criterios de No Inclusión	36
28. Criterios de Exclusión	36
29. Variables Dependientes	36
30. Variables Independientes	37
31. Definición Operacional de Las Variables	37
32. Técnica de Inmunohistoquímica	42
33. Ética	43
34. Resultados	44
a) Métodos Estadísticos y Análisis de Resultados	44
b) Características Clínicas	46
c) Características Histopatológicas	51
d) Características Inmunohistoquímicas	57
e) Correlaciones Estadísticas	61

35. Discusión	65
36. Conclusiones	73
37. Perspectivas	75
38. Anexo 1	76
39. Anexo 2	77
40. Referencias Bibliográficas	80

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía bajo la dirección de la Dra. Paula María del Carmen Figueroa Arredondo investigadora titular del Programa Institucional de Biomedicina Molecular de la ENMH-IPN.

Así como en el Laboratorio de Neuropatología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de la Secretaría de Salud bajo la codirección del Dr. Citlaltepeltl Salinas Lara, Anatomopatólogo e investigador adscrito al mismo instituto.

Se agradece el apoyo otorgado por parte de la Dra. Patricia Soto Márquez, Dr. Guillermo Valero Elizondo y el Dr. Víctor Gabriel Hernández Chávez anatomopatólogos adscritos al departamento de patología del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social para la obtención de las muestras biológicas utilizadas en este trabajo.

El alumno Carlos Amir Carmona González fue becario a nivel maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, en el periodo del 01 de Febrero de 2010 al 31 de Enero de 2011, Numero de becario: 237288, así como becario a nivel maestría del Programa Institucional de Formación de Investigadores del Instituto Politécnico Nacional de Enero de 2011 a Enero de 2012, Numero de proyecto: 20111231

Dedicado a mi padre, a mi madre y a mi hermana.

Porque estamos tan unidos... y no solo por la sangre; sino también por las almas, que si tuviera que elegir, a alguien que me acompañe, en la gran osadía que se llama vida, solo en ustedes pensaría.

A ti mi niña por convertirte en mi cobijo, mi refugio, mi fuerza y mi ilusión.

A mis amistades por refrescarme e inspirarme por dejarme descansar, a mis enemistades por hacerme reaccionar

Pero sobre todo **DEDICADO** a aquellos que viven la aventura de seguir siendo humanos, a pesar de los años y seguir amando con gran pasión el regalo que se nos ha otorgado: LA VIDA

Carlos Amir Carmona González

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a mi tutora de posgrado la Dra. Paula Figueroa Arredondo de la E.N.M.y H. del I.P.N. por su trato humano y su visión crítica de muchos aspectos académicos así como cotidianos de la vida, que ayudan a formarte como persona e investigador.

Mis agradecimientos sinceros a mi director y tutor de proyecto de posgrado, pero sobre todo amigo, al Dr. Salinas Lara, por su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación como un médico integral.

También me gustaría agradecer los consejos recibidos a lo largo de los últimos años por otros profesores que he tenido la suerte de encontrar a lo largo de esta senda, que de una manera u otra han aportado su granito de arena a mi formación. Destacar al Dr. Ángel Esquivel, a la M. en C. Ana Laura Luna Torres, al Dr. Mario Alberto Juárez Millán y al Dr. Víctor García Acosta.

A mis dos amigos y compañeros de aventura M.C. Omar Jorge Castellón Benavides y M.C. Nidia Karen Castellón Benavides los mejores compañeros que se pueden tener.

Gracias a mis Universidades

Gracias a la **F.E.S. Iztacala U.N.A.M.**

Gracias a la **E.N.M. y H. I.P.N.**

Carlos Amir Carmona González

Lista de Figuras

Figura 1. Proyecciones de mortalidad por enfermedad isquémica del corazón. (INEGI, 2002)

Figura 2. Histología de Arteria Coronaria Normal

Figura 3. Efectos activadores de la infiltración de las LDL en la inflamación arterial. (Hansson, 2005, NEJM)

Figura 4. Macrófagos Espumosos

Figura 5. Efectos de la activación del sistema inmunológico en la inflamación arterial. (Hansson, 2005, NEJM)

Figura 6. Placa de fibroateroma coronario y placa calcificada coronaria

Figura 7. Clasificación histopatológica de la Asociación Americana del Corazón para aterosclerosis.

Figura 8. Clasificación histopatológica de la Organización Mundial de la Salud.

Figura 9. Papel del sistema fibrinolítico en la activación de las MMP's (Rodríguez-Fragoso L, 2000, Rev Inst Nal Cancerol)

Figura 10. Estructura general de Metaloproteasas de matriz. (González-Avila, 2009, Rev Inst Nal Enf Resp Mex)

Figura 11. Estructura general por familia de Metaloproteasas de Matriz Extracelular (Bustos-Jaimes, 2008, Mensaje Bioquímico, Vol XXXII, U.N.A.M.)

Figura 12. A. Activación del sistema de coagulación por ruptura de placa ateromatosa (Hansson, 2005, NEJM)

B. Histopatología de placa ateromatosa trombosada.

Figura 13. Esquema de estrategia experimental

Figura 14. Modelo de estrategia de análisis estadístico.

Figura I. Frecuencia de la prevalencia Diagnósticos Médicos al momento de la defunción

Figura II. Frecuencia de la prevalencia de factores de riesgo cardiovascular.

Figura III. Frecuencia de la prevalencia de obesidad acorde a índice de masa corporal.

Figura IV. Frecuencia de la prevalencia de enfermedad hipertensiva acorde a la Clasificación del Joint National Comitee 7

Figura V. Representación de la medición de la luz remanente y obstrucción por placa ateromatosa

Figura VI Representación de luces vasculares remanentes de distintas arterias coronarias

Figura VII. Representación de distintos grados de aterosclerosis acorde a la A.A.C.

Figura VIII. Correlación estadística entre Edad y Obstrucción.

Figura IX. Correlación estadística entre Factores de riesgo y Obstrucción.

Figura X. Correlación estadística entre Hipertensión Arterial y Obstrucción.

Figura XI. Representación de la presencia de MMP-1 en distintos estadios de aterosclerosis acorde a la A.A.C.

Figura XII. Representación de la presencia de MMP-9 en distintos estadios de aterosclerosis acorde a la A.A.C.

Figura XIII. Representación de la presencia de MMP-10 en distintos estadios de aterosclerosis acorde a la A.A.C.

Figura XIV. Representación de la presencia de TIMP-1 en distintos estadios de aterosclerosis acorde a la A.A.C.

Figura XV. Representación de la obtención de unidades colorimétricas decimales RGB.

Figura XVI. Correlación estadística entre MMP-1 y Grado Histopatológico

Figura XVII. Correlación estadística entre MMP-9 y Clasificación de la O.M.S.

Figura XVIII. Correlación estadística entre MMP- 9 y Clasificación de la A.A.C.

Figura XIX. Correlación estadística entre MMP-10 y Grado Histopatológico

Figura XX. Correlación estadística entre TIMP-1 y Grado Histopatológico.

Lista de Tablas

Tabla 1. Niveles Lipídicos Plasmáticos

Tabla 2. Clasificación O.M.S. y A.A.C.

Abreviaturas

LDL	Lipoproteína de Baja Densidad
LDLox	Lipoproteína de Baja Densidad Oxidada
HSP	Proteína de Choque Térmico
EAC	Enfermedad Arterial Coronaria
IAM	Infarto Agudo del Miocardio
MMP	Metaloproteasa de Matriz Extracelular
MMP's	Metaloproteasas de Matriz Extracelular
IL	Interleucina
IFN-α	Interferón Alfa
IFN-γ	Interferón Gamma
NK	Asesinas Naturales (Natural Killers)
CD	Clúster de Diferenciación
t-PA	Activador del Plasminogeno Tisular
PAI-1	Inhibidor de Activador del Plasminogeno
u-PA	Activador del Plasminogeno Tipo Uroquinasa
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
TIMP	Inhibidor Tisular de Metaloproteasa
TIMP's	Inhibidores Tisulares de Metaloproteasas

Resumen

La aterosclerosis es una enfermedad de la pared arterial caracterizada por el depósito e infiltración de sustancias lipídicas que provocan una reacción inflamatoria excesiva involucrando los mecanismos de la inmunidad celular y humoral, en las arterias de mediano y grueso calibre, la disfunción del endotelio vascular considerado como el primer eslabón en la cadena de formación del ateroma, secundario a distintos eventos lesivos que involucran hipertensión, obesidad, tabaquismo, infecciones, así como la retención de lipoproteínas séricas en la íntima arterial por proteoglicanos expuestos.

Otro factor contribuyente en este proceso es la activación del sistema fibrinolítico. Debido al estímulo del fibrinógeno que penetra en la capa íntima arterial por disfunción y permeabilidad endotelial previa, se tiene como consecuencia la activación de plasminógeno a plasmina, la cual a su vez procesa y permite el inicio del procesamiento proteolítico y por tanto activación de las pro-metaloproteasas producidas por macrófagos, linfocitos T, linfocitos B y células endoteliales. Las células mencionadas continúan produciendo pro-metaloproteasas, citocinas y quimiocinas, activadas constantemente por la interacción con plasmina, creando un círculo vicioso de mayor atracción de células inmunitarias que producen aún mayores cantidades de metaloproteasas que se activan, causando la degradación de matriz extracelular, conllevando a una remodelación vascular patológica, aunada a la internalización lipídica estos factores predisponen la formación de placas ateroscleróticas.

Este proceso fisiopatológico culmina con la oclusión del lumen arterial, ya sea por progresión de la formación de la placa aterosclerótica, o por la ruptura de esta, provocando la aparición de las distintas manifestaciones clínicas que van desde un cuadro anginoso, infarto agudo al miocardio, accidente cerebrovascular e inclusive la muerte.

Abstract

Atherosclerosis is a disease of the arterial wall characterized by the deposition and infiltration of lipid substances that cause an inflammatory reaction involving mechanisms of cellular and humoral immunity in the arteries of medium and large size, the vascular endothelial dysfunction considered the first link in the chain of atheroma formation, is secondary to various damaging events involving hypertension, obesity, smoking, infections, as well as the retention of serum lipoproteins in the arterial intima proteoglycans exposed.

Another contributing factor in this process is the activation of the fibrinolytic system. Due to stimulation of fibrinogen which penetrates the arterial intima due endothelial permeability and dysfunction, it results in activation of plasminogen to plasmin, which processes and allows the start of proteolytic activation of pro - metalloprotease produced by macrophages, T lymphocytes, B lymphocytes and endothelial cells. Mentioned cells continue to produce pro-metalloproteases, cytokines and chemokines, constantly activated by interaction with plasmin, creating a vicious cycle of increased attraction of immune cells that produce even greater amounts of metalloproteases that are activated, causing degradation of extracellular matrix, leading a pathological vascular remodeling, coupled with lipid internalization of these factors predispose the formation of atherosclerotic plaques.

This pathophysiological process culminates with occlusion of the arterial lumen, either due to progression of atherosclerotic plaque formation, or the rupture of this, causing the appearance of the various clinical manifestations ranging from angina, myocardial infarction, stroke or death.

Introducción.

La afección miocárdica originada por un desequilibrio entre el flujo sanguíneo coronario y las necesidades miocárdicas, causado por alteración de la circulación coronaria es conocida como cardiopatía isquémica. La cual en su mayoría es causada por un proceso vascular, inflamatorio crónico, conocido como aterosclerosis; caracterizado por el engrosamiento de la capa íntima y media arterial de los vasos de mediano y gran calibre con pérdida de elasticidad con la presencia de una lesión de ateroma compuesta por lípidos, colágeno, tejido fibroso y células inflamatorias.¹ La patología cardiovascular secundaria a la Enfermedad Arterial Coronaria (EAC) causada por aterosclerosis, actualmente es la primera causa de mortalidad en el mundo occidental y para el año 2020 será la principal y primera causa de mortalidad en todo el planeta.^{1,2}



Figura 1. Proyecciones de mortalidad por enfermedad isquémica del corazón. (INEGI, 2002)

A nivel miocárdico, las arterias coronarias son los vasos encargados de transportar sangre rica en oxígeno y nutrientes, son vasos de mediano calibre que se van ramificando en otros más estrechos hasta dar lugar a los de pequeño calibre o arteriolas, que preceden inmediatamente a los capilares sanguíneos y conforman la red nutricia y funcional cardiaca.⁴ Las arterias coronarias se encuentran conformadas por tres capas de tejido; la capa más externa se denomina túnica adventicia, se trata de una capa rica en colágeno y fibras elásticas que confieren a las arterias, respectivamente, resistencia y elasticidad para evitar colapso o ruptura.⁵ La capa intermedia se denomina túnica intermedia o muscular, es la capa más gruesa de las tres. Está formada por músculo liso y por fibras elásticas. Esto permite la adaptación del calibre al flujo sanguíneo en cada momento mediante la contracción y la dilatación arterial.⁵ La capa más interna, que está en contacto directo con la sangre, se denomina túnica íntima o endotelio. La cual es una capa muy delgada y lisa de células endoteliales con función endocrina e inmunológica. Cualquier irregularidad o daño en esta capa desencadena distintas respuestas inmunológicas así como la pérdida del flujo laminar dentro de la arteria lo cual podría activar el sistema de coagulación y la consiguiente formación de coágulos dentro de las arterias.⁵ Algunos factores de riesgo bien establecidos se han asociado con el desarrollo aterosclerótico, incluyendo diabetes mellitus, hipertensión, hiperlipidemia, tabaquismo, e historia familiar positiva de cardiopatía isquémica, evento vasculocerebral entre otros.⁷ Los cuales se han reconocidos como factores que pueden desencadenar la aparición de Infartos Cerebrales, Miocárdicos, e inclusive intestinales.⁷

Generalidades de la Aterosclerosis

La aterosclerosis resulta en la infiltración progresiva de la pared vascular por células de músculo liso, células inmunológicas como macrófagos, linfocitos T y B; así mismo por lípidos del tipo de las lipoproteínas séricas, mayormente de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que se depositan con mayor frecuencia en las arterias, coronarias, femorales, carótidas, aorta.³

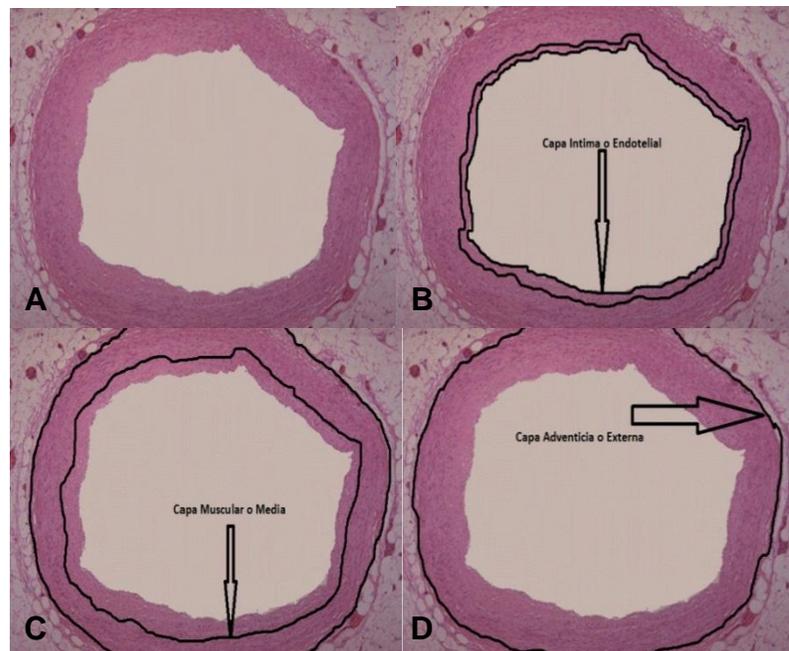


Figura 2. Anatomía microscópica de una arteria. A. Arteria coronaria histológicamente normal, B. Capa Intima o endotelial, C. Capa Muscular, D. Capa Adventicia.

Mientras la placa ateromatosa madura a través de distintos mecanismos, la capa íntima que recubre el material aterosclerótico tiende a adelgazarse y a ser degradada por distintas proteasas producidas por macrófagos, células

endoteliales y linfocitos, presentes en el sitio de lesión lo cual le confiere el potencial de ruptura y trombosis.^{4,5} La trombosis aguda que es el desenlace del cuadro de aterosclerosis coronaria, puede resultar en consecuencias que van de lo peligroso a lo letal, como puede ser una angina inestable, infarto agudo al miocardio (IAM) o muerte súbita.⁶

La detección de inflamación crónica puede ayudar a predecir la EAC en pacientes con IAM que han sido reconocidos previamente, con marcadores pro inflamatorios como la tasa elevada de eritrosedimentación y tasas aumentadas de proteína C reactiva.⁸ La Inflamación Crónica, evidenciada con niveles elevados de Proteína C reactiva está asociada directamente con el desarrollo de EAC.⁹

Formación de la placa Ateromatosa.

Existen distintas teorías fisiopatológicas para comprender la formación de la placa aterosclerótica, dentro de las que cuentan con mayor aceptación se encuentra la teoría multifactorial que describe que el proceso se inicia con una lesión endotelial, lo cual produce disfunción en el endotelio, provocando cambios en la permeabilidad, en la adhesión y una respuesta a varios factores estimulantes y de crecimiento, de esta manera las células endoteliales y las células musculares lisas interactúan con los monocitos, linfocitos T y plaquetas dando lugar al componente celular de la respuesta fibroproliferativa que finalmente tendría como resultado la formación de la placa aterosclerótica.⁴²

La teoría monoclonal de la formación de la placa de ateroma partió de la observación que las placas ateroscleróticas frecuentemente aparecen de forma aislada formando nódulos rodeados por áreas de tejido normal. Así se sugiere que cada lesión aterosclerótica deriva de una única célula muscular lisa, siendo la aterosclerosis una forma de neoplasia. Llegando a la conclusión que cada

lesión arterial representa un clon derivado de una única célula muscular lisa, al que se le llamó monotipo, sugiriendo de esa forma que la transformación celular inicial podría ser provocada por virus, agentes químicos u otros mutágenos.⁴⁶

La teoría la disfunción endotelial toma en cuenta esta, así como los niveles elevados de colesterol circulante, primordialmente lipoproteínas de baja densidad oxidadas (OxLDL)^{21, 22} La acumulación inicial, reversible aún de macrófagos asociados a lípidos en el espacio subendotelial, es una consecuencia de la migración de células derivadas de monocitos.

Las células que se acumulan en puntos focales dentro de la pared vascular en arterias de mediano y pequeño calibre atraídas por citocinas y moléculas de adhesión, que son producidas por el endotelio dañado. Los Monocitos se diferencian *In Situ* en macrófagos los cuales expresan receptores de membrana como los Tipo Toll (Toll-like) y los receptores “Scavenger” que participan en la limpieza y eliminación de oxLDL.^{23,24} Los linfocitos pueden a su vez migrar y acumularse dentro de la pared arterial desde las etapas más tempranas.²⁵

Cuando el proceso inflamatorio se torna crónico, las células musculares lisas también pueden migrar y formar parte de la capa íntima arterial, en respuesta a las citocinas presentes, en este proceso interviene la liberación de Metaloproteasas (MMP's) de membrana que les permiten penetrar a través de la íntima elástica hacia el espacio subendotelial.²⁶

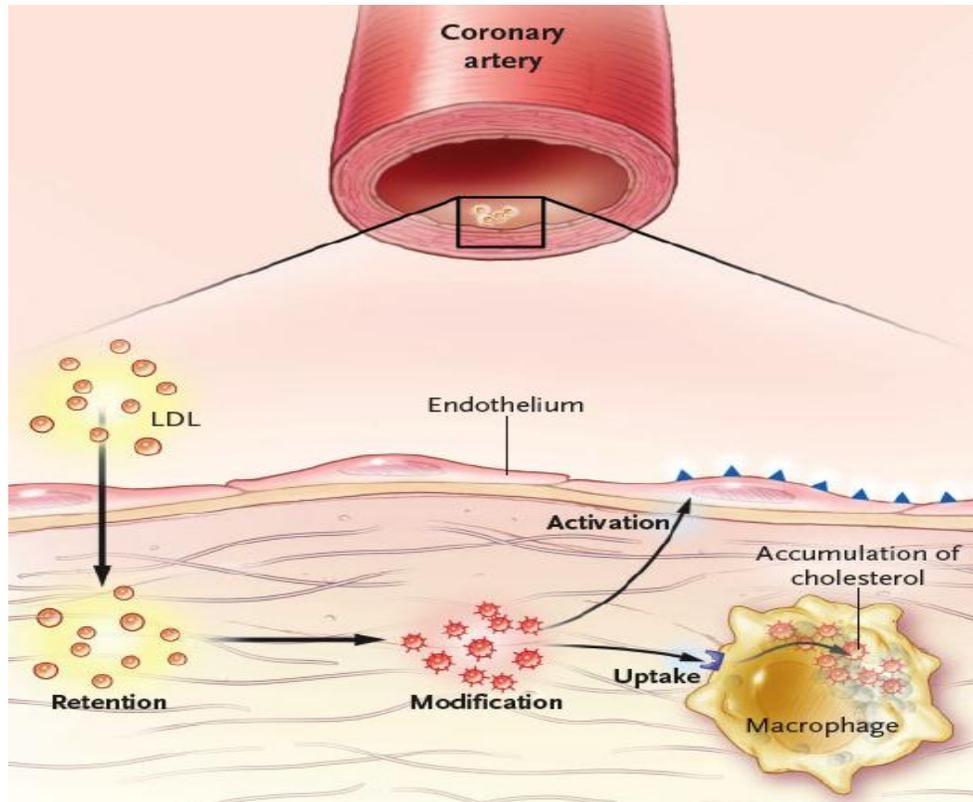


Figura 3. Efectos activadores de la infiltración de las LDL en la inflamación arterial. (Hansson, 2005, NEJM)

La persistencia de la inflamación crea un círculo vicioso de migración celular, diferenciación de las células musculares lisas, producción de mediadores pro-inflamatorios y quimiotácticos, así como muerte celular, lo que conduce a una remodelación de la pared vascular y la formación de una nueva capa llamada neo-íntima, la cual se forma en el espacio formado entre la capa muscular y la íntima.²⁷

La formación de la neo-íntima es un fenómeno complejo que ocurre en respuesta al daño de la pared vascular en la cual, el proceso de reparación y daño endotelial inician áreas ricas en células pro-inflamatorias y deposición de colágeno.²⁸ La acumulación crónica de monocitos, macrófagos, células musculares lisas y linfocitos T en respuesta a la acumulación y liberación de

moléculas pro inflamatorias dentro de la pared vascular, constituyen la base del desarrollo de la placa aterosclerótica.

Hoy en día está bien establecido que la lesión aterosclerótica es un proceso inflamatorio en donde la respuesta inmune, innata, celular y humoral, juegan un papel crucial.³⁷ En placas ateroscleróticas desarrolladas tanto en humanos³⁸ como en animales experimentales³⁹ se ha evidenciado el infiltrado de células T CD4+ capaces de reconocer a las LDL modificadas⁴⁰ y a las proteínas de shock térmico (HSP)⁴¹, dos de los principales auto antígenos encontrados en la lesión aterosclerótica, evidenciando el papel de la inmunidad adquirida en la aterogénesis.

En modelos animales se han definido dos tipos de linfocitos T cooperadores Th-1 y Th-2 basados en el perfil de citocinas que sintetizan. Las citocinas de tipo Th1 son importantes promotores de la respuesta inmune mediada por células, mientras que las citocinas Th2 inducen la respuesta inmune mediada por anticuerpos.⁴³ La principal citocina producida por las células Th-1 es el Interferón Gamma (IFN- γ), ésta ha sido identificada en placas ateroscleróticas humanas⁴⁴ y la deficiencia de su receptor en ratones apoE -/- se asocia con una reducción en el tamaño de la lesión aterosclerótica.⁴⁵ El desbalance entre la respuesta Th1 y Th2 puede influenciar la progresión de diversas enfermedades inflamatorias incluyendo aterosclerosis.⁴⁷

Aunque las lesiones ateroscleróticas, presentan Th1, principalmente⁵¹, es importante señalar que los Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, involucradas en la proliferación y diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas secretoras de anticuerpos.⁵² Las evidencias disponibles en la actualidad sugieren un potencial papel protector de la IL-10 en el desarrollo de la aterosclerosis.⁵⁹

Por otra parte el discutido papel de los antígenos externos como virus y bacterias, en el proceso aterogénico como un fenómeno causal, aumenta el grado de complejidad del panorama para descifrar el rol de cada uno de los participantes.²⁹ Las OxLDL son consideradas neo-antígenos, un término usado para describir auto-antígenos para los cuales normalmente el sistema inmune presenta tolerancia, pero que al presentar ligeras modificaciones existe la posibilidad de que se inicie una respuesta autoinmune. Las partículas de lipoproteínas modificadas tienen la capacidad de interactuar con el endotelio, iniciando su acumulación y retención en el espacio subendotelial.³⁰ Las partículas retenidas de OxLDL inducen a la formación de células espumosas que son macrófagos convertidos en receptáculos de OxLDL que finalmente mueren porque a pesar de que la finalidad de endocitar estas partículas es eliminarlas, no se cuenta con un mecanismo adecuado de retroalimentación negativa, por lo tanto el macrófago endocita más lípidos de los que puede lisar y transportar, produciendo así su muerte, vertiendo su contenido lipídico en el tejido subendotelial.³¹ Así mismo la migración y proliferación de células musculares lisas así como la estimulación en la secreción de citocinas pro inflamatorias son factores causantes de la formación de células espumosas.³¹ Las OxLDL también son inductoras de la expresión de moléculas de adhesión, promotoras de disfunción endotelial y extravasación leucocitaria.³²

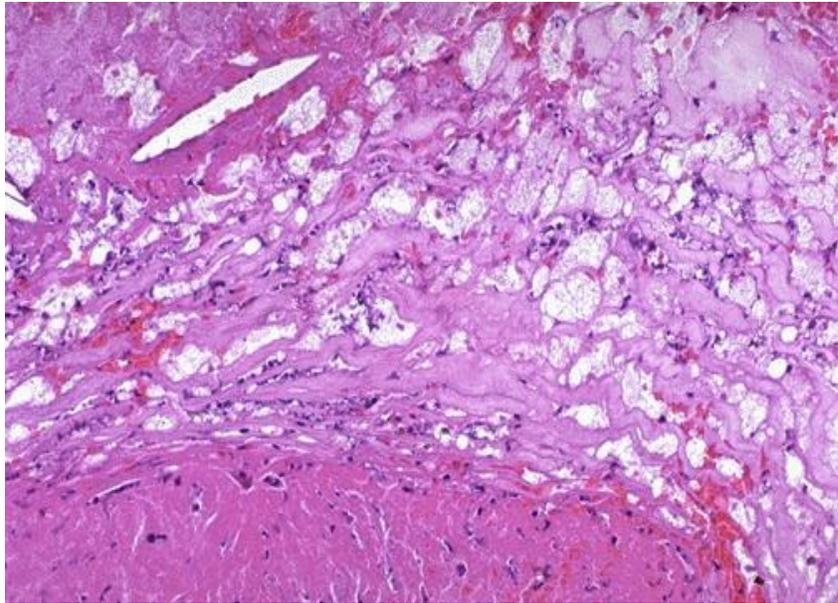


Figura 4. Presentación Histológica de Macrófagos Espumosos

La placa aterosclerótica estable está caracterizada por una capa íntima engrosada, algunas células espumosas y ausencia de células inflamatorias. Por otro lado la placa inestable está caracterizada por una capa fibrosa delgada y una cantidad considerable de células de la respuesta inflamatoria que presentan linfocitos T y macrófagos activados. Se ha determinado que la presencia de linfocitos T en la lesión aterosclerótica aumenta el riesgo de desarrollo acelerado y desestabilización de la placa. Las células T activadas así como la producción de plasmina en la placa ateromatosa, estimulan la activación de macrófagos⁵⁷ en la placa que liberan y activan a las pro-metaloproteasas de matriz extracelular y otras enzimas con el potencial de degradar el colágeno intersticial y debilitar la capa íntima.¹⁰⁻¹³

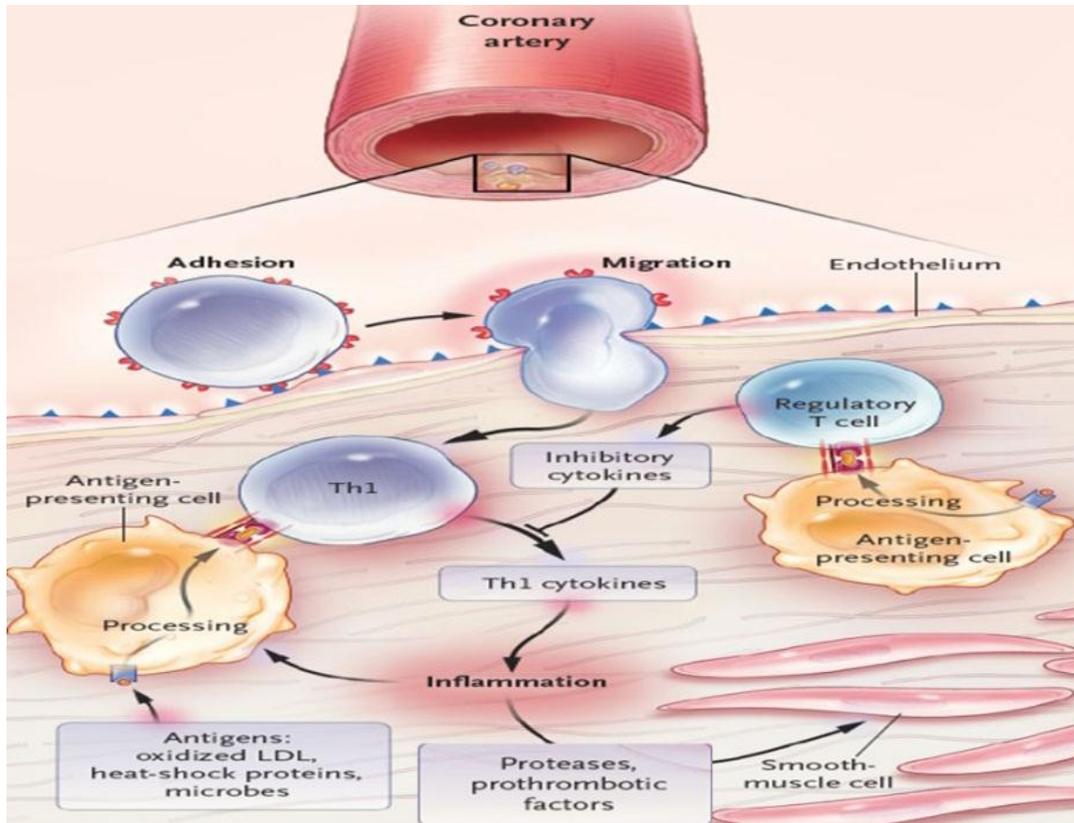


Figura 5. Efectos de la activación del sistema inmunológico en la inflamación arterial. (Hansson, 2005, NEJM)

Metaloproteasas y Aterosclerosis.

La Matriz extracelular está formada por muchos componentes distintos interconectados que se pueden clasificar en tres grandes grupos: proteoglicanos y glucosaminoglicanos, proteínas estructurales (como el colágeno y la elastina), y proteínas de adhesión (como la fibronectina y la laminina). Tal variedad de componentes requieren toda una familia de enzimas líticas para su degradación: las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP), que son endopeptidasas dependientes de zinc.

Se han descrito 24 genes distintos que codifican diferentes MMP; éstas se clasificaron en un primer momento en función de la especificidad del sustrato (colagenasas, gelatinasas, estromelinasas y matrilisinas), pero actualmente se clasifican en función de la estructura de la enzima. La estructura básica de las MMP presenta una serie de dominios característicos: un péptido señal que dirige la secreción al exterior de la célula, un propéptido que mantiene a la enzima inactiva hasta que sufre un corte proteolítico y un dominio catalítico carboxiterminal que une zinc. Sobre esta estructura básica aparecen diversas variantes, como un dominio de tipo hemopexina que media en la especificidad del sustrato y las interacciones con inhibidores endógenos, o un dominio transmembranario en el caso de las MMP asociadas a la membrana plasmática. Así, en la clasificación estructural se distinguen ocho grupos: cinco grupos de MMP secretadas y tres de MMP asociadas a la membrana (MT-MMP por *membrane type MMP*)^{43,44}

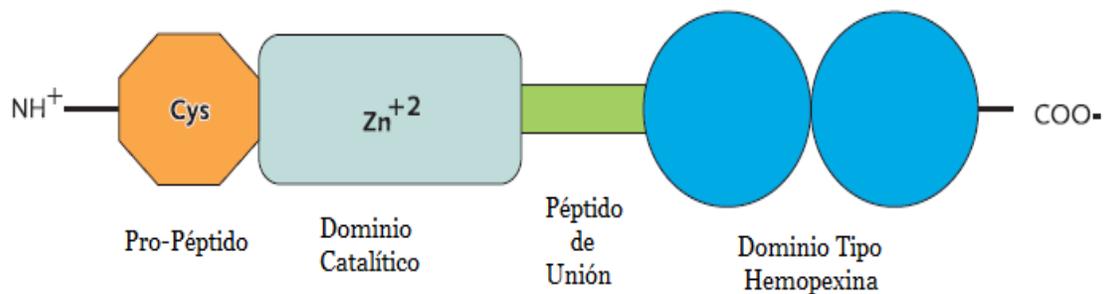


Figura 10. Estructura general de una Metaloproteasa de matriz extracelular. (González-Avila, 2009, REV INST NAL ENF RESP MEX)

Las MMP se sintetizan como zimógenos y es necesario activarlas con un corte proteolítico en el propéptido del dominio aminoterminal. El proceso de activación de las proMMP varía según la enzima, pero suelen intervenir otras proteasas, como el activador de plasminógeno del tipo urocinasa (uPA) y las propias MMP.

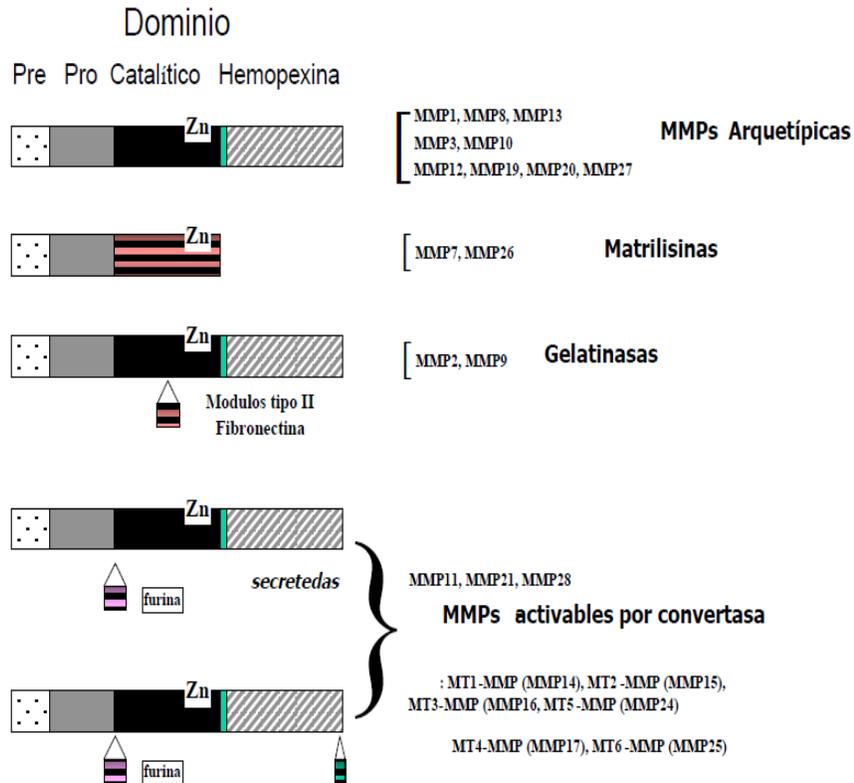


Figura 11. Estructura general por familia de Metaloproteasas de Matriz Extracelular (Bustos-Jaimes, 2008, Mensaje Bioquimico, Vol XXXII, U.N.A.M.)

Como contrapartida a la actividad de las MMP, existen muchas moléculas endógenas capaces de inhibir su acción: los inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMP) y los inhibidores plasmáticos, como la macroglobulina α_2 . Además, las MMP están reguladas también tanto trascricional como post-transcripcionalmente (estabilización del mRNA, glucosilaciones), y su transcripción se induce en respuesta a las citocinas, los factores de crecimiento, los agentes químicos, el estrés físico, los oncogenes

activados y las interacciones con la MEC. Con estas herramientas se ejerce una fina regulación de la actividad de las MMP y su acción se restringe a determinados procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario, procesos reproductivos y la remodelación de los tejidos. Por el contrario, muchos estados patológicos están asociados a una desregulación de las MMP.

La remodelación de la matriz extracelular tiene lugar durante todas las fases de la aterosclerosis humana. En el desarrollo de la lesión arteriosclerótica, que puede durar décadas, están implicados la infiltración de células inflamatorias, la migración de células musculares lisas, el grosor de la íntima, un acumulo de componentes de la matriz extracelular, la formación de una cubierta fibrosa y la angiogénesis³.

La inestabilidad de la placa se pone de manifiesto por la ulceración de la cubierta fibrosa, la ruptura de la placa o una hemorragia intraplaca y es la responsable de los síntomas clínicos de una angina inestable, un infarto de miocardio y accidente cerebrovascular⁵⁴. La evolución de la placa requiere una modificación de la matriz extracelular, este es un proceso regulado por la síntesis y la degradación de los componentes que la constituyen. Diversos estudios "in vitro" descubrieron que las células vasculares producían enzimas de la familia de las MMP's, estudios posteriores han puesto de manifiesto que estos enzimas juegan un papel crucial en la remodelación vascular durante el desarrollo, el crecimiento y en los procesos patológicos⁵⁵.

Las metaloproteasas pueden degradar la mayoría de componentes de la matriz extracelular además de tener un papel importante en la activación y procesamiento de citocinas o factores de crecimiento¹⁴, en la exposición de receptores de membrana, en la liberación del ligando Fas o en la inactivación del TNF- α ⁵⁷. La degradación de la matriz extracelular es por lo tanto un proceso necesario para permitir la migración celular y la remodelación de los tejidos. Todo ello juega un papel crucial en muchos procesos tanto fisiológicos como

patológicos La acción de las MMP's está regulada a tres niveles: inducción de la expresión, activación de las formas latentes y regulación por los TIMP's. El sistema de las MMP's está formado por más de 20 metalo endopeptidasas zinc-calcio dependientes que poseen una actividad catalítica sobre componentes de la matriz extracelular⁶⁰.

La actividad de las MMP se regula por su unión a Inhibidores Tisulares de Metaloproteasas (TIMP's). Se han caracterizado 4 miembros de la familia llamados: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. La expresión de los TIMP's en los tejidos también se controla durante la remodelación y en condiciones fisiológicas para mantener el balance en el metabolismo de la matriz extracelular. La ruptura de este equilibrio induce un descontrol en el balance de la matriz causando patología como artritis, cáncer, enfermedad cardiovascular, nefritis, desórdenes neurológicos y fibrosis de tejidos).⁶³

El Inhibidor tisular de metaloproteasas 1, también conocido como TIMP-1, es una glicoproteína expresada en diferentes tejidos del organismo. Siendo un inhibidor natural todas las metaloproteasas de matriz extracelular, además de su función inhibitoria, esta proteína tiene la capacidad de promover la proliferación celular en un amplio espectro de estirpes celulares, y probablemente tenga funciones anti-apoptóticas que actualmente se encuentran en estudio.

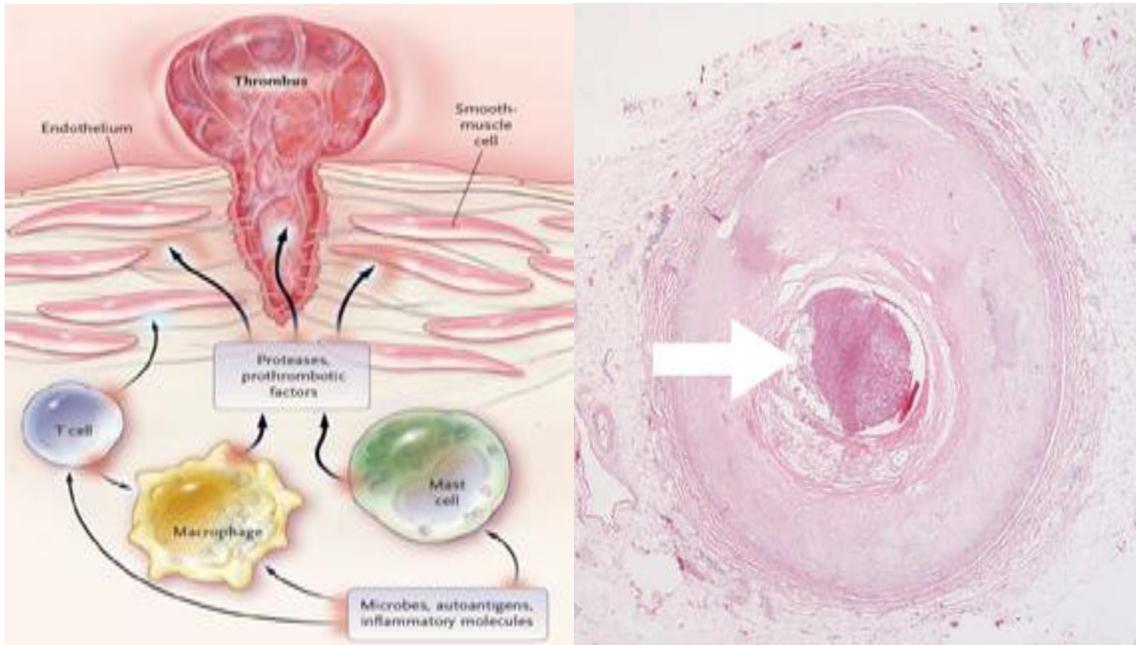


Figura 12. A. Activación del sistema de coagulación por ruptura de placa aterosclerótica (Hansson, 2005, NEJM) B. Histopatología de placa aterosclerótica trombosada.

Sistema Fibrinolítico en Aterosclerosis.

Como consecuencia del daño, el endotelio se torna permeable a distintos tipos de moléculas propias del torrente sanguíneo, una de ellas es el fibrinógeno el cual al entrar en contacto con la capa subendotelial promueve la activación del sistema fibrinolítico, el cual es el encargado de disolver la fibrina por acción enzimática.⁴⁶ Simultáneamente al proceso de formación del trombo se produce la lisis del mismo, previniendo la formación de coágulos que induzcan una trombosis intravascular masiva.

La reacción central del sistema fibrinolítico es la activación del plasminogeno a plasmina por los activadores (PA's) t-PA y el activador del plasminogeno tipo urocinasa (u-PA) ¹⁶ y su regulación por los inhibidores entre ellos el PAI-I, teniendo como consecuencia la conversión y activación de plasminogeno en plasmina. Así mismo puede activar "in vitro" MMP's latentes como la 1, 3, 9, 10, 13 ¹⁸; elastasas, factores de crecimiento del tipo TGF- β ¹⁹ o el bFGF ²⁰ liberándolo de la matriz a la que está unido en forma latente. Los receptores celulares para la plasmina y sus activadores dirigen su acción a zonas de la superficie celular donde su actividad es requerida o bien intervienen en la eliminación de los activadores.

La interacción entre la sangre y la pared arterial lesionada es un mecanismo que refuerza la progresión de la enfermedad cardiovascular. La ruptura de la placa arterial con una exposición súbita de los componentes subendoteliales de la pared es seguida de una deposición de plaquetas y una activación de la coagulación, llevando todo ello a una trombosis mural oclusiva o subclínica⁵³. Diversos estudios han sugerido que en la pared arterial hay una continua deposición y lisis de fibrina ⁵³. Se ha descrito que en el interior de la íntima arteriosclerótica hay una continua formación de fibrina y una fibrinólisis continua, que generaría fragmentos con propiedades aterogénicas. Se observan productos de degradación del fibrinógeno solo en placas fibrosas y placas avanzadas junto con fibrinógeno y fibrina (I y II).⁵³

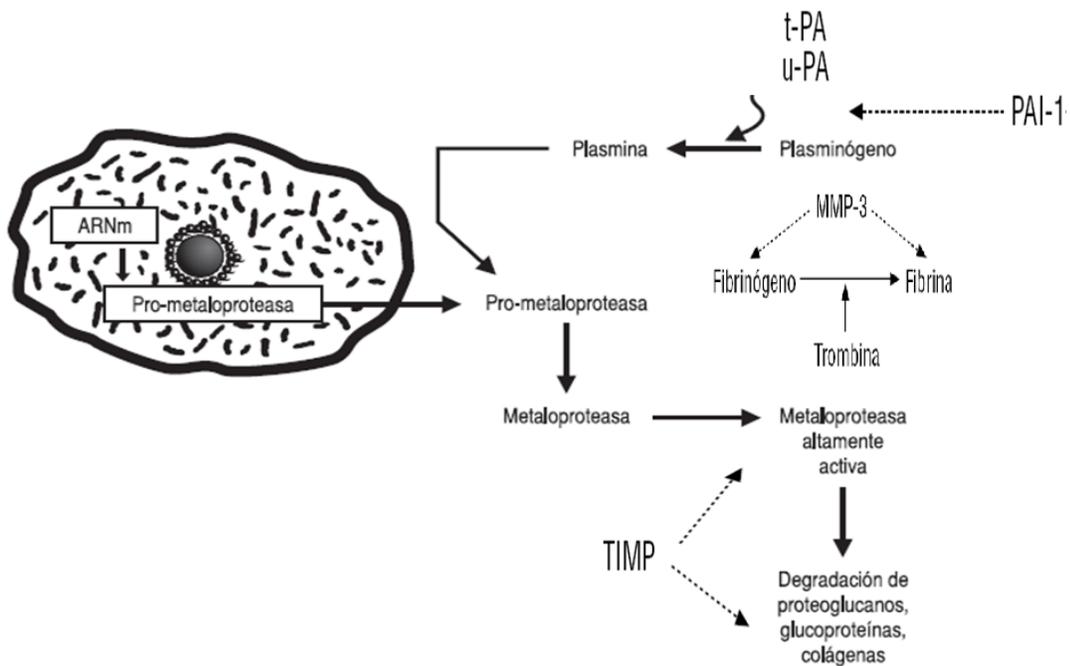


Figura 9: Papel del sistema fibrinolítico en la activación de las MMP's
Rodríguez-Fragoso L y cols. Proteólisis y cáncer, Rev Inst Nal Cancerol
(Mex) 2000; 46 (1).

Morfología Histopatológica

Para clasificar de manera adecuada a nivel histopatológico, actualmente se utilizan 2 clasificaciones la primera se dividió en 6 grados de acuerdo a presentación histológica basada en la clasificación de la Asociación Americana del Corazón la cual toma en cuenta los siguientes parámetros.

1. Tipo I: inicial, macrófagos y células espumosas.
2. Tipo II: estría grasa, lípidos intracelulares.
3. Tipo III: tipo II y pequeños depósitos de lípidos extracelulares.
4. Tipo IV: ateroma, tipo II y acúmulos de lípidos extracelulares.
5. Tipo V: fibroateroma, núcleo de lípidos y capa fibrosa.
6. Tipo VI: complicada, Defecto en la superficie, hemorragia o trombo.

La segunda se dividió en 3 grados de acuerdo a presentación histológica basada en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud que a su vez toma en cuenta lo siguiente.

1. Banda adiposa 0 - < 33% de oclusión de la luz vascular.
2. Placa Fibrosa 34% - < 66% de oclusión de la luz vascular.
3. Placa Grave 67% - < 99% de oclusión de la luz vascular.

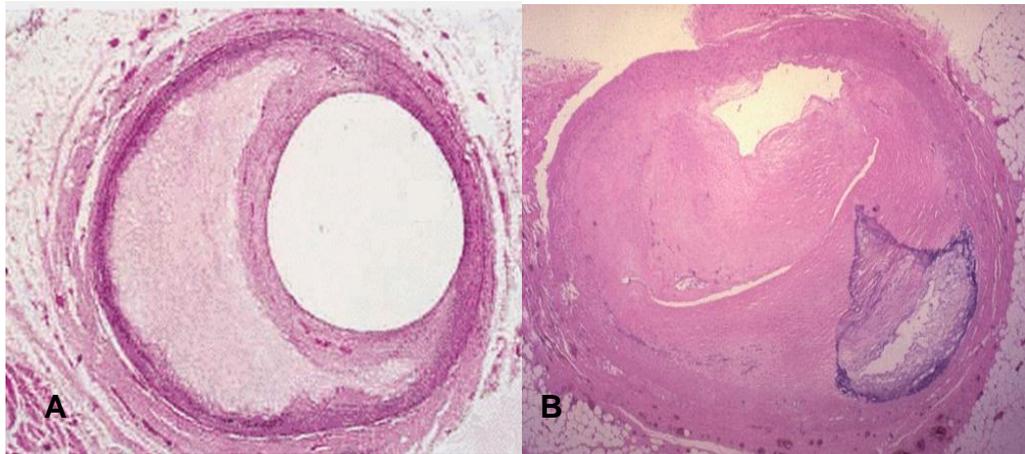


Figura 6. A. Placa de fibroateroma coronario B. Placa Calcificada Coronaria

Nomenclatura e histología principal	Secuencia de progresión	Mecanismo principal de crecimiento	Comienzo más temprano	Correlación clínica
Lesión tipo I (inicial) Macrófagos aislados y células espumosas		Crecimiento principalmente por acumulación de lípidos	Desde la primera década	Clínicamente silente
Lesión tipo II (estría grasa) Principalmente, acumulación intracelular de lípidos			Desde la tercera década	
Lesión tipo III (intermedia) Cambios del tipo II y pequeños depósitos de lípidos extracelulares				
Lesión tipo IV (ateroma) Cambios del tipo II y núcleo de lípidos extracelulares		Aumento acelerado de músculo liso y colágeno	Desde la cuarta década	Clínicamente silente o manifiesta
Lesión tipo V (fibroateroma) Núcleo de lípidos y capa fibrosa, o múltiples núcleos de lípidos y capas fibrosas, o principalmente depósitos de calcio, o principalmente fibrosis				
Lesión tipo VI (complicada) Defecto de la superficie, hematoma-hemorragia, trombo		Trombosis, hematoma		

Figura 7. Clasificación histopatológica de la Asociación Americana del Corazón para aterosclerosis. (R.S. Cotran, Robbins. Patología estructural y funcional 7 Edición 664-681)



Figura 8. Clasificación histopatológica de la Organización Mundial de la Salud. (Fernández-Britto JE. Berlin, 1987)

Antecedentes.

Las células endoteliales activadas expresan moléculas de adhesión como VCAM-1 que promueven la infiltración de monocitos circulantes y de linfocitos T⁶⁴. La adhesión de linfocitos T a las células endoteliales a través del receptor VCAM-1 induce la producción de MMP-2. Esta metaloproteasa facilita la degradación de la matriz extracelular. Degradación que es necesaria para la migración a través de la capa endotelial y la membrana basal de los linfocitos T y de los monocitos aunque en este último caso no está demostrado⁶⁴. Durante la migración de los monocitos su interacción con los componentes de la matriz extracelular especialmente con el colágeno tipo I, predominante en la pared arterial normal⁶⁵ también estimula la degradación de esta matriz. El contacto con colágeno tipo I ⁶⁶ y la laminina incrementa la expresión de MMP-9 por estas células. La interacción de los monocitos con el colágeno tipo I también induce la proteólisis favoreciendo la producción de superóxido ⁶⁷ y la secreción de IL-1 que puede activar a la pro-MMP-2 y 9 producidas por las células musculares ⁶⁸ e incrementar la producción de MMP-9, 1 y 3 por células musculares lisas. Aunque no se conoce claramente como la composición de la matriz induce la producción de MMP sí se sabe que es necesaria la presencia de MMP's para que se produzca la infiltración de monocitos y linfocitos T a través de la matriz durante el desarrollo de la placa arteriosclerótica. Los macrófagos y las plaquetas en la superficie liberan múltiples factores entre los que se encuentran IL-1, factor de necrosis tumoral y factor de crecimiento derivado de plaquetas y pueden inducir la migración de células musculares lisas de la media a la íntima que proliferarán y producirán matriz extracelular.

La formación de neo vasos también puede jugar un papel importante en el desarrollo de la placa arteriosclerótica, tanto por la provisión de componentes sanguíneos que favorecerán el crecimiento de la placa, como causando hemorragias repetidas a nivel de la íntima que podrán desencadenar una

trombosis arterial.⁷⁰ Para que haya angiogénesis debe haber una degradación de la membrana basal vascular que permita la migración y proliferación de las células endoteliales, por lo que las MMP's son esenciales en este proceso. Esta descrito que TIMP-1 y TIMP-2 así como Ab anti-MMP-2, y anti-MMP-9 inhiben la formación de túbulos por células endoteliales "*in vitro*"⁷¹ y que la inhibición de MMP reduce "*in vivo*" la angiogénesis en cornea.⁷⁹ La localización de macrófagos que expresan MMP's (incluyendo MMP-9) en áreas con "*vasa vasorum*" en adventicia sugiere que además de la implicación de la MMP-9, derivada de macrófagos, en las alteraciones de la matriz que están asociadas con neo vascularización en aterogénesis, los macrófagos pueden liberar citocinas que estimularían la secreción de MMP por células endoteliales.⁸⁰

El papel de la trombina también es importante en la angiogénesis debido a la activación de la pro-MMP-2 en células endoteliales o libre en el espacio extracelular⁸¹ así como incrementando la expresión de MMP-1 y MMP-3.⁸²

En conejos con aterosclerosis experimental se pone de manifiesto que una reducción de lípidos induce una reducción del número de macrófagos, una disminución en la expresión de MMP-1 e incrementa el contenido de colágeno intersticial en la placa reforzándola.⁸⁸ Estudios inmunohistoquímicos también demuestran una elevada prevalencia de MMP-9 en lesiones de coronarias arterioscleróticas y demuestran la síntesis de esta MMP en forma activa por macrófagos y células musculares lisas y su fuerte asociación con síndromes de angina inestables.⁸⁹ Los macrófagos también influyen en la degradación de la matriz extracelular indirectamente secretando citocinas y factores de crecimiento que pueden estimular a las células musculares lisas vecinas a producir MMP's, Estudios "*in vitro*" demuestran que las células musculares lisas en cultivo estimuladas con IL-1 o TNF- α inducen un incremento de la producción de MMP-2, MMP-3, MMP-1, en cambio células no expuestas a estos mediadores de la inflamación expresan constitutivamente pro-MMP-2 y TIMP's.⁸¹

Los mecanismos de activación de las MMP's en las placas arterioscleróticas todavía no están bien conocidos aunque en estudios relativamente recientes⁸⁸ se ha visto que las LDL oxidadas estimulan la transcripción y secreción de MMP-1 por células endoteliales, así como otras moléculas pro inflamatorias regulan la expresión de MT1-MMP.⁹⁰ Es posible que los radicales libres y las LDL oxidadas que generan las células espumosas, estimulen la secreción de MMP's. La combinación de estos procesos resulta en el adelgazamiento y la final ruptura de la capa fibrosa, un proceso que culmina en procesos isquémicos ya mencionados. Así mismo un factor mayor contribuyente para la inestabilización de la placa parece ser el linfocito T y el macrófago activado. La MMP-3 puede también degradar fibrinógeno directamente o fibrina polimerizada.⁶² La u-PA por una parte puede tener un papel en la activación de la pro-MMP-3 por la vía de la generación de plasmina y por la otra la MMP-3 activa puede evitar la unión al receptor de la u-PA. Esta interacción puede tener un papel en la regulación de las células con una actividad asociada a u-PA y puede representar el mecanismo por el cual son controladas las funciones de u-PAR dependientes e independiente de u-PA.⁸⁴ La MMP-3 también puede generar a partir del plasminógeno angiotatina y así ejercer un papel regulador de la angiogénesis. La MMP7 y MMP-9 también pueden generar este fragmento a partir de plasminógeno. En las fases más tardías del proceso, las MMP's podrían estar implicadas en la reestructuración de la matriz extracelular y eventualmente en la desestabilización de la placa arteriosclerótica.

En las placas ateroscleróticas, la MMP 3 ha sido detectada en células de musculo liso y macrófagos. La producción de MMP-1, MMP-2 y MMP-9 también se ha visto de forma primaria en macrófagos y células de musculo liso de lesiones ateroscleróticas. Se cree que participan en el debilitamiento del tejido conectivo presente en la capa intima vascular, lo cual provoca la ruptura, trombosis aguda así como proliferación y migración de células de musculo liso.

El análisis de polimorfismo de la MMP 3 se ha asociado con una mayor progresión de aterosclerosis coronaria que otros genotipos, por lo cual se ha postulado que los niveles reducidos de MMP 3 contribuyen al depósito neto de matriz extracelular, lo cual provocaría un mayor y más rápido crecimiento de la placa aterosclerótica.⁷⁵ Las metaloproteasas del tipo colagenasas y gelatinasas se encuentran sobreexpresadas en placas inestables.⁷⁶

Las células inmunitarias producen abundante MMP 9 para facilitar su entrada a través del endotelio degradando la lámina basal. Se ha asociado el aumento de MMP 3 sérica con un mayor grado de extensión de la enfermedad vascular coronaria.⁷⁷ Sin embargo aún no se sabe si los marcadores séricos presentes en pacientes con infarto agudo al miocardio, de distintas metaloproteasas son causados por ruptura o remodelación de la placa. Al saber que las metaloproteasas tienen un papel importante en aterosclerosis, se realizó un estudio en el cual a nivel sérico se midieron las MMP's 8 y 10 así como el TIMP-1, encontrando que los niveles de MMP 10 y TIMP-1 aumentados se asociaron a un mayor grado de enfermedad arterial aterosclerótica.⁷⁸

Como ya se ha mencionado existen estudios acerca de la presencia de distintas MMP's en el proceso aterosclerótico, se sabe actualmente que solo la MMP 2 se expresa constitutivamente, de las MMP's presentes en tejido patológico la más estudiada es la MMP 3, sin embargo hay reportes de distintas MMP's presentes, como la 1,9 y 10, ya sea en tejido con aterosclerosis, a nivel sérico en pacientes o modelos experimentales, sin embargo la mayoría de estos estudios se han centrado en el proceso final, el cual es el cuadro de desestabilización de la placa de ateroma, y no se ha estudiado su presencia a distintos niveles de desarrollo que van desde el inicio hasta la desestabilización, así mismo, se han realizado en tejido vascular braquiocefálico, femoral y carotideo, teniendo solo muy pocos reportes a nivel coronario. Así mismo la

presencia de MMP's séricas no se ha dilucidado si es causada eminentemente por la ruptura o el proceso de remodelación patológico.

Esta tesis se propuso para establecer preliminarmente una posible relación clínico-patológica-molecular de la expresión diferencial las MMP's seleccionadas así como un probable desequilibrio funcional de los sistemas fibrinolítico y de metaloproteasas de matriz extracelular, con el desenlace de los portadores, analizando pacientes seleccionados con base al estadio de la placa ateromatosa, desde los perfiles clínicos, bioquímicos y electrocardiográficos, tomando en cuenta el desarrollo histopatológico de la propia placa.

Justificación.

Dada la gran incidencia y prevalencia de esta patología que conllevan a un gran impacto económico y social por las consecuencias características de esta patología como son la insuficiencia cardíaca y muerte, es necesario continuar la investigación en este ámbito, ya que la remodelación vascular, la inflamación y la desestabilización de la placa mediada por el sistema inmune es reconocida como un contribuyente mayor en el desarrollo de las complicaciones de esta enfermedad a través de sus diversos efectos en el metabolismo lipoproteico y la biología de la pared vascular. Actualmente se ha avanzado de manera importante en la comprensión de la fisiopatología de esta enfermedad, sin embargo aún existen varias dudas y resultados contradictorios debido a la complejidad que implica un proceso como este, en distintos estudios se ha demostrado la participación de algunas MMP's en el proceso aterogénico, sin embargo las investigaciones se han centrado en la etapa de desestabilización de la placa y no en su proceso de formación, por lo que al estudiarse nos permitiría tener una visión más amplia de las consecuencias de la participación de las MMP's tanto a nivel molecular, histológico y clínico.

Pregunta de investigación.

¿Cuál es la relación de la expresión diferencial de las metaloproteasas 1, 9 y 10 y su inhibidor TIMP-1 en las distintas etapas de desarrollo de la lesión aterosclerótica?

Hipótesis.

El desarrollo de la lesión aterosclerótica, probablemente está relacionado con una expresión diferencial de las metaloproteasas 1, 9 y 10 y su inhibidor TIMP-1 en cada una de las etapas. Por lo tanto estas proteasas podrían usarse como predictores del desarrollo, obstrucción, ruptura de la placa aterosclerótica y complicaciones cardiovasculares

Objetivos.

General

- Correlacionar la expresión diferencial de las metaloproteasas 1, 9 y 10 con la progresión clínico-patológica en la historia natural de la aterosclerosis coronaria.

Objetivos particulares.

1. Determinar las **características clínicas** de los pacientes incluidos en el estudio.
2. Determinar las **características histopatológicas** de las arterias coronarias con aterosclerosis.
3. Determinar si las **metaloproteasas** 1, 9 y 10 modifican su perfil de expresión conforme la gravedad de la lesión histopatológica de la aterosclerosis coronaria va aumentando y en comparación con el tejido adyacente que no forma parte de la placa.
4. Determinar si los **el inhibidor** específico, TIMP-1 de dichas metaloproteasas modifican su perfil de expresión, en comparación con el tejido arterial adyacente que no pertenece a la placa.
5. Determinar si existe **correlación** entre el perfil de expresión de las metaloproteasas y sus inhibidores con el grado de lesión en la enfermedad de la aterosclerosis coronaria.

Metas

1. Realizar un escrutinio de selección de la muestra, basado en las historias clínicas de los pacientes con los diferentes grados de aterosclerosis coronaria, para obtener datos de gabinete y de laboratorio bioquímico, a fin de correlacionar la clínica con los resultados de ésta investigación molecular (regulación de metaloproteasas).
2. Seleccionar mediante el diagnóstico patológico, 10 pacientes por grado histológico de lesión, que representen un espectro de evolución de la aterosclerosis coronaria para realizar las determinaciones de las metaloproteasas seleccionadas y su inhibidor.

3. Determinar la expresión a nivel de proteína, de las **metaloproteasas** 1, 3 y 9 mediante semicuantificación de la inmunohistoquímica, en cortes histológicos con los diferentes grados de aterosclerosis.
4. Determinar la expresión a nivel de proteína, del **inhibidor** de las metaloproteasas TIMP-1 mediante inmunohistoquímica en cortes histológicos con los diferentes grados de aterosclerosis, seguido de una cuantificación.

Estrategia Experimental.

Se realizó la búsqueda en el libro registro de realización de necropsias del departamento de patología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía S.S.A. de la Secretaría de Salud fechadas del 1° de enero de 1999 al 31 de diciembre de 2008, posteriormente se realizó la revisión de expedientes y selección de los casos que cumplan los criterios de inclusión así como la obtención del espectro clínico el cual se capturara en la hoja universal de recolección de datos.

De los casos seleccionados se obtuvieron de los bloques de parafina así como las laminillas del material efecto de estudio para ser teñidas con hematoxilina-eosina de las cuales se realizó la descripción histopatológica acorde a la clasificación histología de la American Heart Association y de la Organización Mundial de la Salud, para placa ateromatosa.

Se procedió al corte de los bloques a dos micras para inmunohistoquímica en laminillas silanizadas a las cuales se realizó inmunohistoquímica revelada por técnica de inmunoperoxidasa con diaminobencidina.

Al finalizar se analizaron los resultados con el programa computacional SPSS Versión 18, realizando la correlación de resultados clínicos, patológicos e inmunohistoquímica.

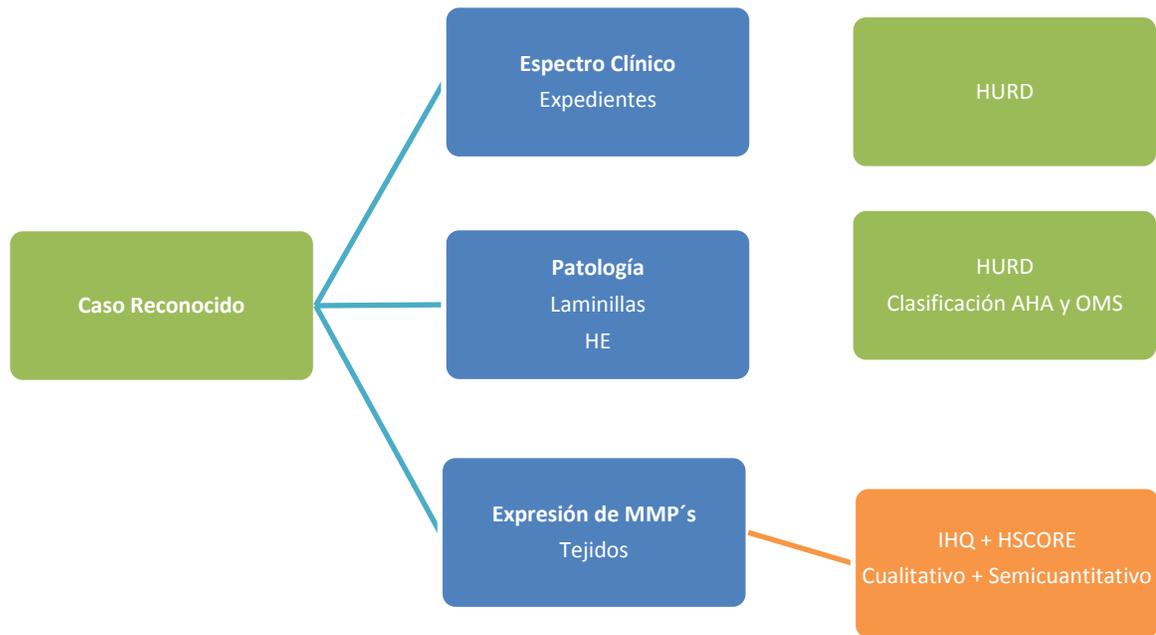


Figura 13. Esquema de estrategia experimental

Material y Métodos.

Tipo y Diseño De Estudio.

Descriptivo, Transversal, Retrospectivo.

Universo de estudio.

Tejido de autopsias de arterias que cumplieron los criterios de inclusión de Pacientes de 0 a 99 años de edad, de sexo indistinto, del archivo del departamento de patología del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social, fechadas entre el 1° de Enero de 1999 y el 31 de Diciembre de 2008.

Tamaño de muestra.

Se analizaron 612 casos de los cuales cumplieron cabalmente los criterios 138 del archivo del departamento de patología del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Tejidos Utilizados

Los tejidos utilizados fueron de arterias coronarias tanto descendentes, ascendentes y circunflejas que cumplieron los criterios de inclusión, del archivo del departamento de patología del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social, fechadas entre el 1° de Enero de 1999 y el 31 de Diciembre de 2008.

Criterios de Inclusión.

- Bloques de parafina de arterias coronarias con aterosclerosis coronaria de necropsias.

Criterios de No Inclusión.

- Pacientes con diagnóstico de enfermedad autoinmune.
- Pacientes con diagnóstico de dislipidemia familiar.
- Pacientes con arteritis diferente por otras causas diferentes a aterosclerosis.
- Pacientes con diagnóstico de miocarditis.
- Pacientes con VIH o cualquier inmunodeficiencia primaria.
- Pacientes con neoplasia con o sin tratamiento.
- Pacientes con tratamiento esteroideo.
- Pacientes Post-Trasplantados.

Criterios de Exclusión.

- Muestras con tejido insuficiente para descripción histopatológica
- Pacientes con bloques o expedientes extraviados
- Tejido en mal estado y autólisis
- Expedientes clínicos incompletos

Variables Dependientes.

- Morfología histopatológica (Grado de Placa)
- Espectro clínico
- Edad
- Electrocardiograma
- Perfil lipídico

- Enzimas cardíacas
- Proteína C reactiva
- Velocidad de sedimentación globular
- Hipertrofia cardíaca

Variables Independientes.

- Ateroesclerosis
- Respuesta Inmunológica

Definición Operacional de Las Variables.

- **Morfología histopatológica (Grado de Placa):** Sera valorada con 2 escalas histopatológicas.

La primera se dividió en 6 grados de acuerdo a presentación histológica basada en la clasificación de la Asociación Americana del Corazón

7. Tipo I: inicial, macrófagos y células espumosas.
8. Tipo II: estría grasa, lípidos intracelulares.
9. Tipo III: tipo II y pequeños depósitos de lípidos extracelulares.
10. Tipo IV: ateroma, tipo II y acúmulos de lípidos extracelulares.
11. Tipo V: fibroateroma, núcleo de lípidos y capa fibrosa.
12. Tipo VI: complicada, Defecto en la superficie, hemorragia o trombo.

La segunda se dividió en 3 grados de acuerdo a presentación histológica basada en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud.

4. Banda adiposa 0 - < 33% de oclusión de la luz vascular.
 5. Placa Fibrosa 34% - < 66% de oclusión de la luz vascular.
 6. Placa Grave 67% - < 99% de oclusión de la luz vascular.
- **Espectro Clínico:** Gama De Signos y Síntomas Secundarios al Proceso Patológico Intrínseco.
 - **Dolor torácico:** definido como opresión, ardor, tumefacción, constricción, con inicio gradual, de intensidad variable y duración mayor de 30 minutos. En región retroesternal, con irradiación a cuello, mandíbula, hombro izquierdo, parte interna de brazo, ambos brazos, codos o muñecas.
 - **Edad:** Tiempo en años o meses que una persona, ha vivido desde que nació.
 - **Electrocardiograma:** Registro Grafico de la actividad eléctrica cardiaca, correlacionado con síndromes isquémicos agudos al encontrar, elevación segmento ST igual o superior a 0,2 mV de V1-V3 o mayor o igual a 0,1 mV en el resto. Asi como bloqueo completo de rama izquierda del haz de his, en fase hiperaguda ondas T altas acuminadas. Una vez establecido el infarto aparecen ondas Q.
 - **Perfil Lipídico:** Serie de determinaciones bioquímicas en sangre que miden niveles totales de colesterol así como sus subcomponentes y triglicéridos.
 - **Enzimas Cardíacas:** Marcadores bioquímicos determinantes de lesiones miocárdicas como la determinación de troponina y CPK MB.

- **Proteína C Reactiva:** Sustancia Proteica utilizada como marcador de injuria somática aguda y crónica.
- **Velocidad de Sedimentación Globular:** Es la precipitación de los eritrocitos en un tiempo determinado utilizado como marcador de inflamación.
- **Hipertrofia cardíaca:** El aumento de la masa miocárdica caracterizada por un incremento del tamaño individual de los miocitos y una expansión de la matriz extracelular en respuesta a estímulos mecánicos, hemodinámicos, neurohumorales, hormonales o patológicos.
- **Ateroesclerosis:** Variedad de esclerosis arterial caracterizada por la acumulación de lípidos amorfos en la túnica interna del vaso la cual se denomina ateroma.
- **Cardiopatía Isquémica:** Desequilibrio entre el aporte y la demanda de oxígeno miocárdico que puede conducir a lesión o necrosis miocárdica.
- **Respuesta Inmunológica:** Reacción del sistema inmunológico ante la presencia de un antígeno, mixta: celular y humoral.

La morfología histopatológica, se obtuvo a través del procesador de imágenes tpsDig el porcentaje de luz vascular remanente y la cantidad obstruida por placa ateromatosa, así mismo con la obtención de esos datos y la visión directa al microscopio óptico se clasificaron las piezas histopatológicas de arterias coronarias acorde a la Clasificación de la O.M.S. y de la Asociación Americana del Corazón; el promedio de obstrucción vascular fue de 78.95% con una Desv. Std. De 12.3%.

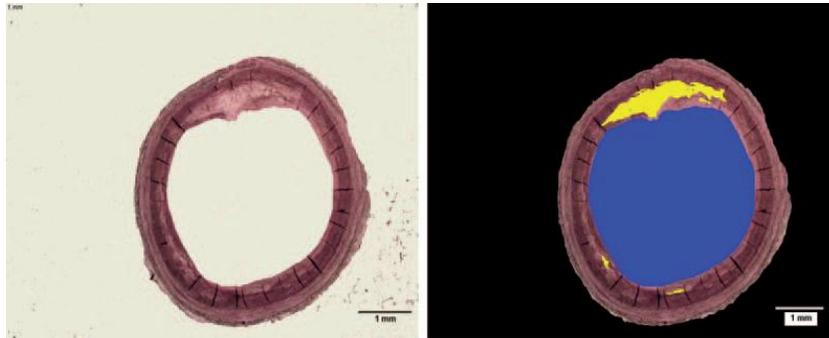


Figura V. Representación de la medición de la luz remanente y obstrucción por placa ateromatosa

Así mismo se obtuvo a través del software de imagen NIS-Elements de Nikon la conversión a unidades colorimétricas RGB Decimal para así realizar el análisis estadístico a través de la prueba de correlación no paramétrica de Spearman.

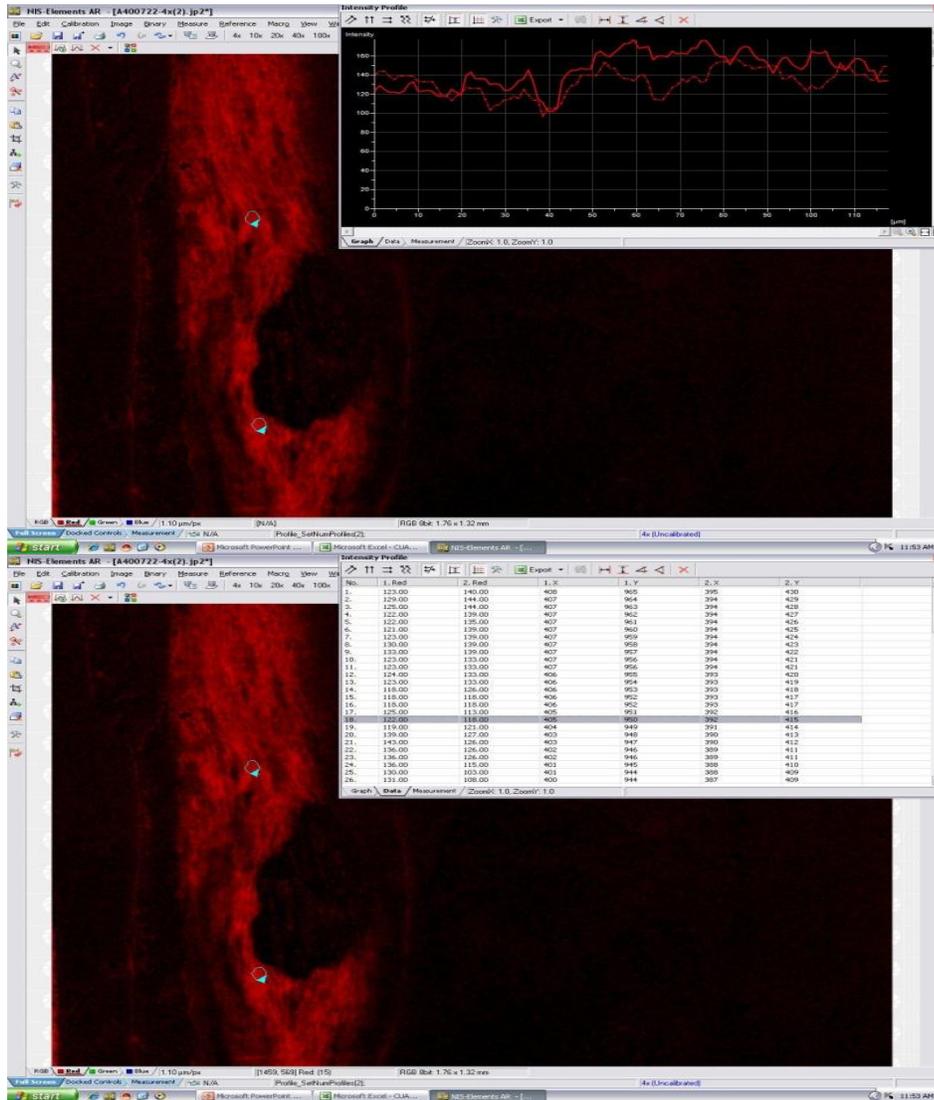


Figura XV. Representación de la obtención de unidades colorimétricas decimales RGB.

Técnica de Inmunohistoquímica

El estudio de inmunohistoquímica se realizó en 90 de los casos aplicando la técnica para las moléculas, MMP-1,9, 10 y TIMP-1, a cada caso problema correspondieron de 4-5 laminillas más dos laminillas de control.

1. Los especímenes histológicos fueron fijados en formalina al 10% amortiguada (PH. 7.4) y embebidas en parafina.
2. Se realizaron cortes en blanco y se montaron en laminillas previamente silanizadas.

Técnica

- A) Los cortes fueron desparafinados con xilol y rehidratadas con distintos grados de etanol y lavados en solución amortiguadora de fosfatos.
- B) La recuperación antigénica se realizó colocando las laminillas en solución de citrato de sodio 0.1M (pH 6.0) a baño María por 10 minutos en cámara de presión.
- C) Posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 20 minutos, lavándose con solución amortiguadora de fosfatos(pH 6.0)
- D) Se bloqueó con la peroxidasa endógena adicionando peróxido de hidrogeno al 3% durante cinco minutos a temperatura ambiente.
- E) Se lavó nuevamente con solución amortiguadora de fosfatos
- F) Se evaluó la presencia de las siguientes metaloproteasas empleando las subsecuentes diluciones de anticuerpos
MMP 1 (Collagenase-1) Ab-7 anticuerpo policlonal-conejo diluido 1:100
MMP 9 (92kDa Collagenase IV) Ab-9 anticuerpo policlonal-conejo diluido 1:100
MMP 10 (Collagenase V) Ab-10 anticuerpo policlonal-conejo diluido 1:100
TIMP-1 Ab-2 anticuerpo monoclonal-ratón diluido 1:50

Ética

De acuerdo al reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, expedida por la Secretaria de Salud en el año de 1987, en su título 2º; Capitulo 1º; Artículo 17; Categoría 1; se considera INVESTIGACION SIN RIESGO, ya que son estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y observacionales en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada en las variables fisiológicas, psicológicas y sociales de los individuos que participan en el estudio, entre los que se consideran: revisión de expedientes clínicos, cuestionarios, entrevistas y otros en los que no se identifique ni se traten aspectos sensitivos de su conducta.

Resultados

Métodos Estadísticos y Análisis de Resultados

Se realizó el análisis descriptivo y exploratorio de las variables de estudio, aplicando la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar si la distribución de la población es normal o anormal, en caso de ser normal, se aplicaron estadística paramétrica como T de Student y coeficiente de Pearson, al ser de tipo anormal se aplicaron la prueba de Chi-2, coeficiente no paramétrico de Spearman y tablas de contingencia, en ambos casos se realizara regresión lineal simple y múltiple para establecer significancia estadística, la cual se establece al nivel de $p < 0,05$. Para el estudio de los factores de riesgo se utilizó la prueba de Chi cuadrado y el coeficiente de Phi-Cramers. Para el estudio comparativo de los valores de medias se ha aplicado: la prueba de t de Student para datos no apareados para la comparación de dos grupos, y para el análisis de tres grupos se utilizó el test One Way Anova y el análisis de la varianza para grupos desiguales de Student-Newman-Keuls. Para el estudio de la correlación entre variables se ha calculado el coeficiente de correlación (r) y la significatividad de dicha correlación (p). Los cálculos estadísticos y las gráficas se han realizado utilizando el programa SPSS Versión 18.

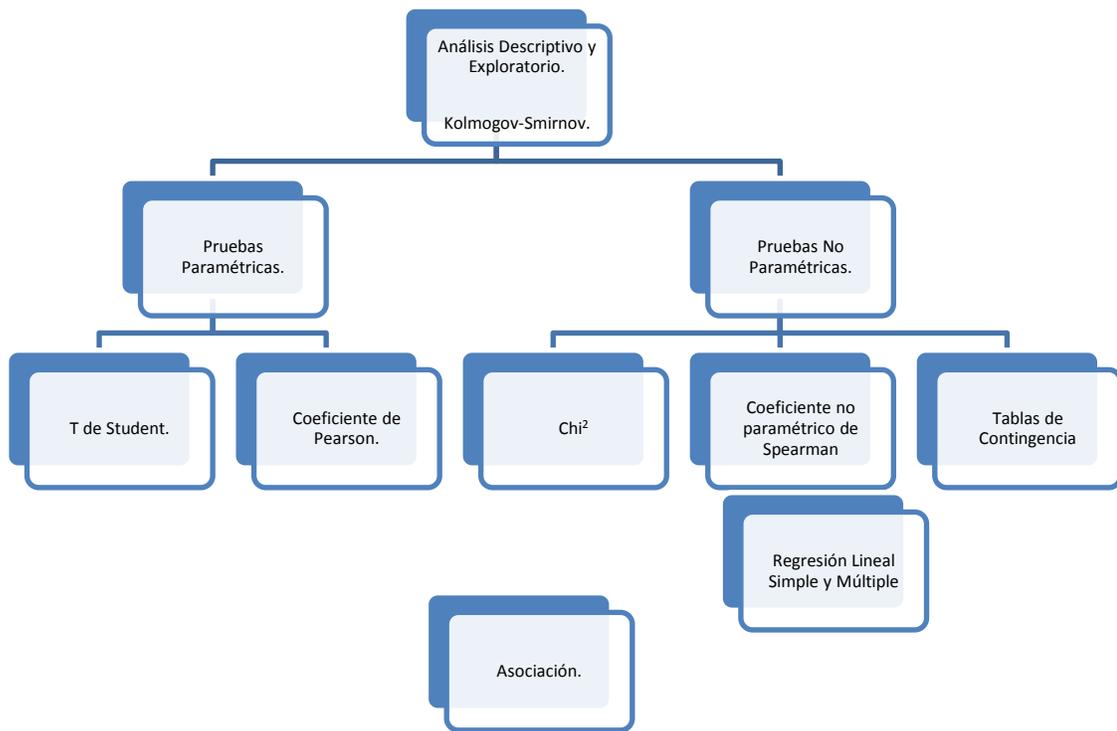


Figura 14. Modelo de estrategia de análisis estadístico.

Características Clínicas

Acorde al primer objetivo de realizar la caracterización clínica de nuestra muestra se realizó el análisis estadístico exploratorio, aplicando estadística descriptiva obteniendo los siguientes resultados; tomando en cuenta una muestra con $n= 160$, se encontró que los diagnósticos médicos al momento de la defunción en esta población fueron de, Cardiopatía isquémica crónica en 26 pacientes (16.1%), Sx. Isquémico Coronario Agudo en 86 pacientes (54.3%), Cardiomiopatía Dilatada en 6 pacientes (4%), Cardiomiopatía Hipertrofica en 3 pacientes (2%), Cardiopatía reumática crónica en 12 pacientes en (8%), Insuficiencia Cardíaca Congestiva en 13 pacientes (8.7%), Disrritmias en 3 pacientes (2%), Tromboembolia Pulmonar en 4 pacientes (4%).

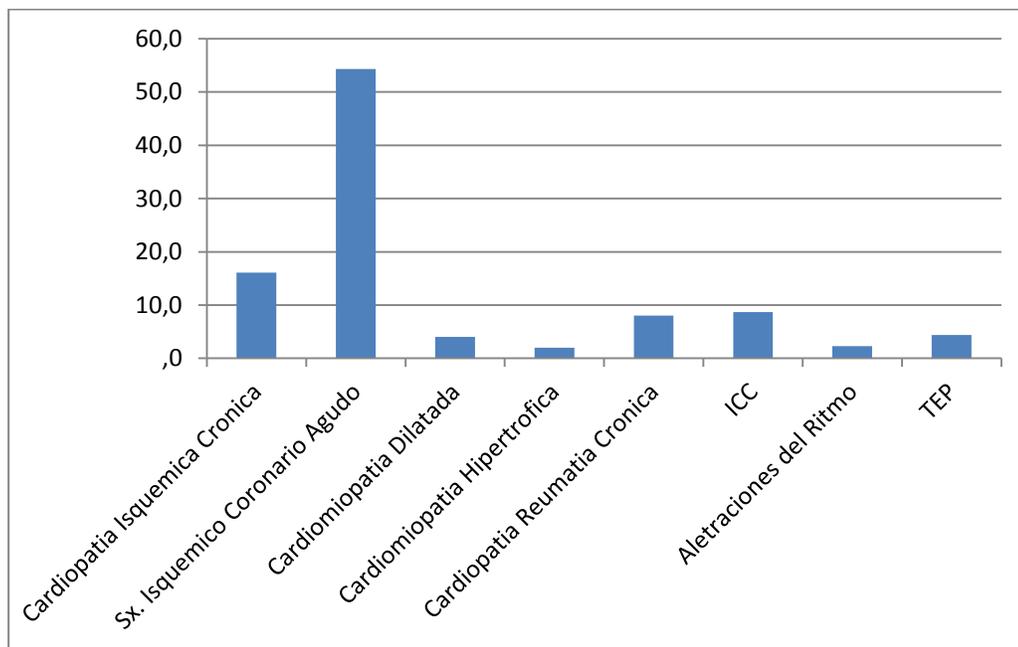


Figura I. Frecuencia de la prevalencia Diagnósticos Médicos al momento de la defunción

Se encontró que la prevalencia de factores de riesgo cardiovascular considerando, dislipidemia, tabaquismo, obesidad, hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus, sobrepeso y obesidad por índice de masa corporal, género masculino, edad e inactividad física fue de 0 factores de riesgo en 1 paciente (0.7%), 1 factor de riesgo en 7 pacientes(4.3%), 2 factores en 20 pacientes (13%), 3 factores en 29 pacientes (18.1%), 4 factores en 33 pacientes (21.7%), 5 factores en 30 pacientes(18.8), 6 factores en 26 pacientes (15.9%) y 7 factores en 11 pacientes(7.2%).

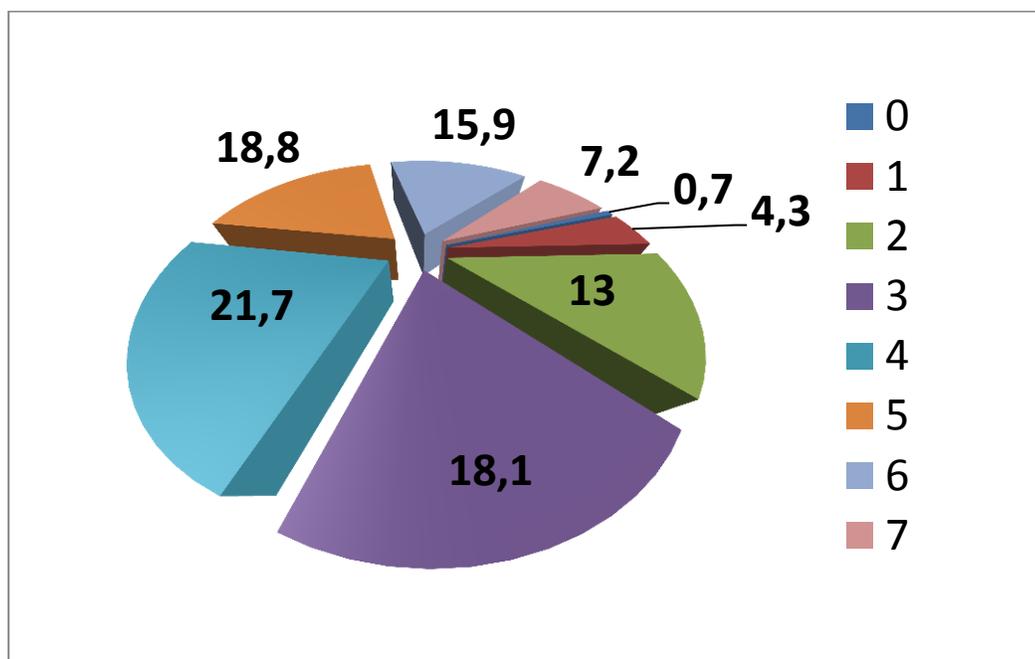


Figura II. Frecuencia de la prevalencia de factores de riesgo cardiovascular.

La prevalencia de obesidad en esta población acorde a índice de masa corporal fue de peso insuficiente en 6 pacientes (4%), Peso Normal en 34 pacientes (21.5%), Sobrepeso en 64 pacientes (40.5%), Obesidad grado I en 33 pacientes (21%), Obesidad grado II en 11 pacientes (7%), Obesidad mórbida en 10 pacientes (9.6%).

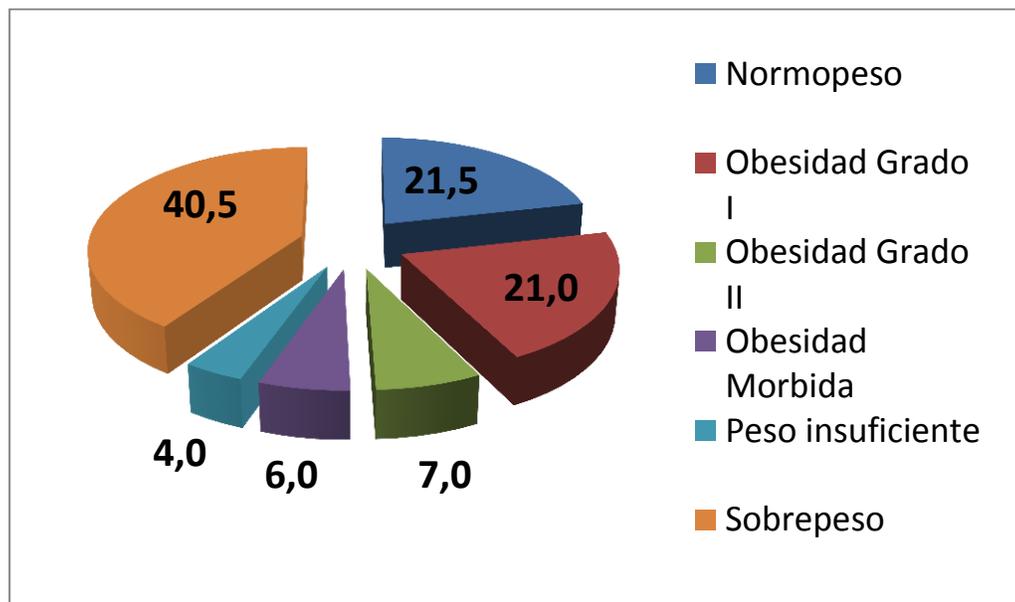


Figura III. Frecuencia de la prevalencia de obesidad acorde a índice de masa corporal.

La frecuencia de prevalencia de enfermedad hipertensiva acorde a la clasificación del Joint National Comitee 7 fue Optima en 37 pacientes (36.8%), Pre hipertensión en 64 pacientes (39.9%), Estadio 1 en 44 pacientes (28.3%) y Estadio 2 en 14 pacientes (8.7%).

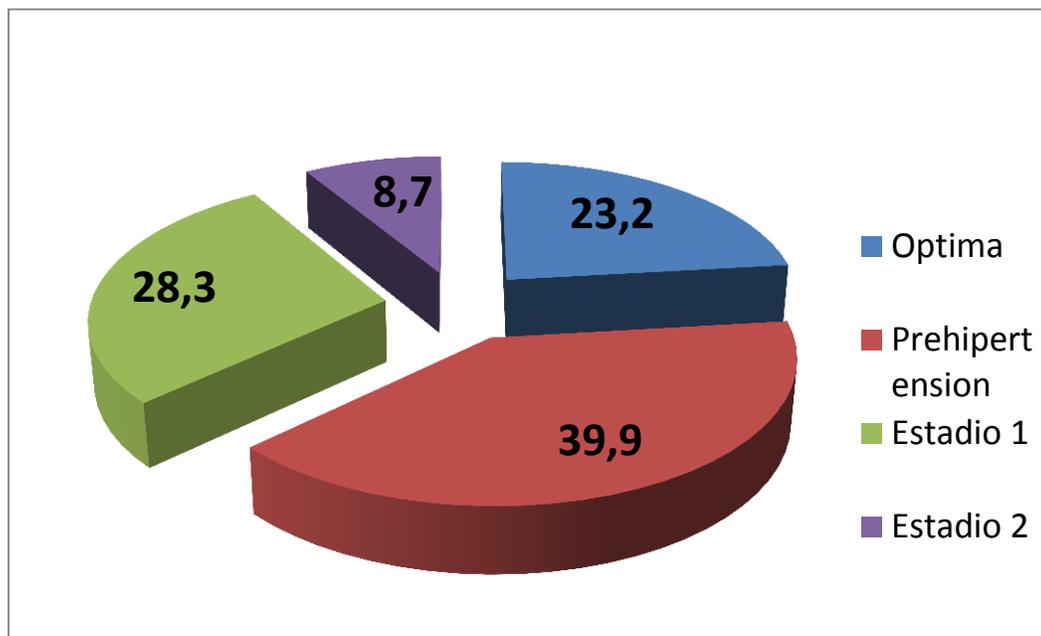


Figura IV. Frecuencia de la prevalencia de enfermedad hipertensiva acorde a la Clasificación del Joint National Comitee 7

En cuanto a las determinaciones bioquímicas que otorgan riesgo aterosclerótico se encontró que en esta población los niveles plasmáticos de Beta-Lipoproteínas (LDL) fueron de 112.3 mg/dl Desv. Std. +/- 24.44, Alfa-Lipoproteínas 30.3 mg/dl Desv. Std. +/- 3.44, Triacilgliceroles 188.9 mg/dl Desv. Std. +/- 18.34, Colesterol 198.75 mg/dl Desv. Std. +/- 32.

Tabla I. Niveles Lipídicos Plasmáticos

Beta-Lipoproteínas	Alfa-Lipoproteínas	Triacilgliceroles	Colesterol
112.3 mg/dl	30.3 mg/dl	188.9 mg/dl	198.75 mg/dl
Desv. Std. +/- 24.44	Desv. Std. +/- 3.44	Desv. Std. +/- 18.34	Desv. Std. +/- 32

Características Histopatológicas

Acorde a la clasificación de la O.M.S. se obtuvo que 11 pacientes (7.2%) presentaron obstrucción entre 25-50%, 48 pacientes (29.7%) presentaron obstrucción entre 50-75%, 101 pacientes (63%) presentaban obstrucción entre 75-100%. Por otra parte acorde a la clasificación de la Asociación Americana del Corazón 3 pacientes (2%) se encontraron en grado I, 18 pacientes (12%) se encontraron en grado II, 9 pacientes (6%) se encontraron en grado III, 27 pacientes (18%) se encontraron en grado IV, 56 pacientes (35%) se encontraron en grado V, 43 pacientes (27%) se encontraron en grado VI.

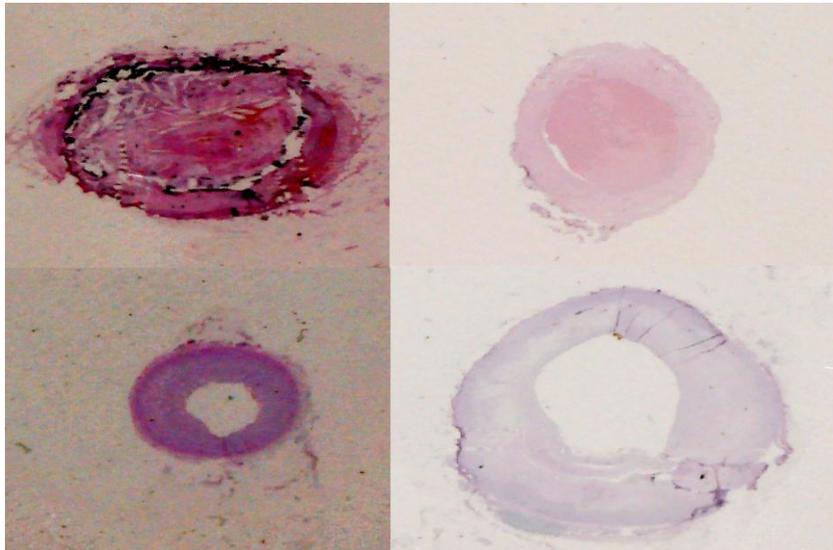


Figura VI Representación de luces vasculares remanentes de distintas arterias coronarias

Tabla II. Frecuencia de prevalencia acorde a grado histológico.

OMS	%	A.A.C.	Porcentaje	A.A.C.	Porcentaje
1	7.2	1	2%	4	18%
2	29.7	2	12%	5	35%
3	63.1	3	6%	6	27%
Total:	100%		Total:	100%	

A continuación se muestran representaciones histológicas de fotomicrografías representantes de los 6 grados de daño aterosclerótico acorde a la asociación americana del corazón.

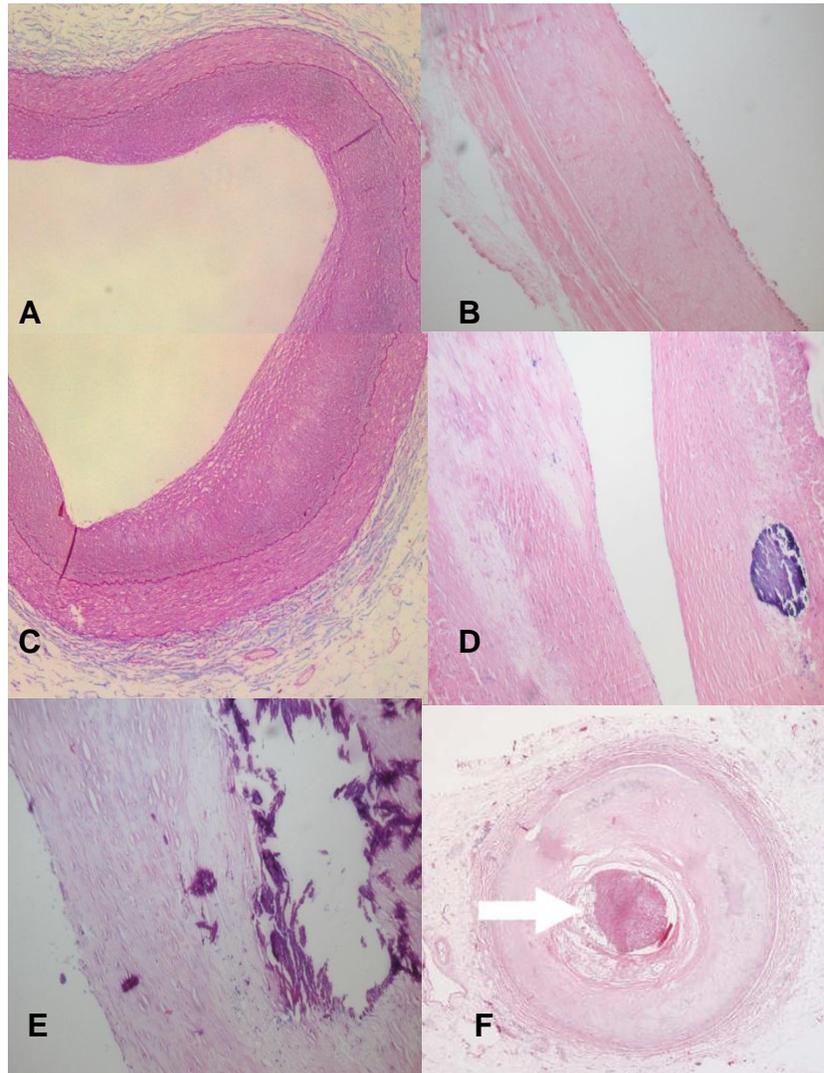


Figura VII. Representación de distintos grados de aterosclerosis acorde a la A.A.C. A) Grado I, B) Grado II, C) Grado III, D) Grado IV, E) Grado V, F) Grado VI. (Fotomicrografías con acercamiento x100)

Se realizó la prueba de Correlación no Paramétrica de Spearman, para buscar correlaciones entre factores de riesgo y porcentaje de obstrucción vascular, encontrando que al confrontar edad con obstrucción se obtuvo $P = .063$ con $RR = .547$.

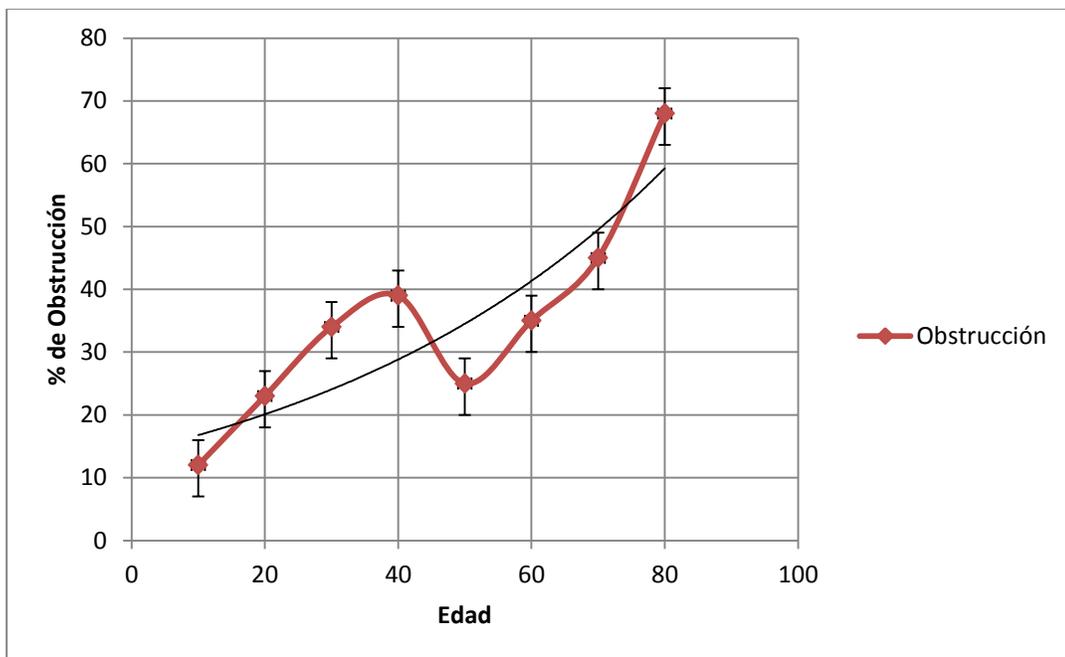


Figura VIII. Correlación estadística entre Edad y Obstrucción. $P = .063$ con $RR = .547$

Se realizó la prueba de Correlación no Paramétrica de Spearman, para buscar correlaciones entre Cantidad de Factores de riesgo contra obstrucción donde se obtuvo $P=.056$ con $RR= .453$

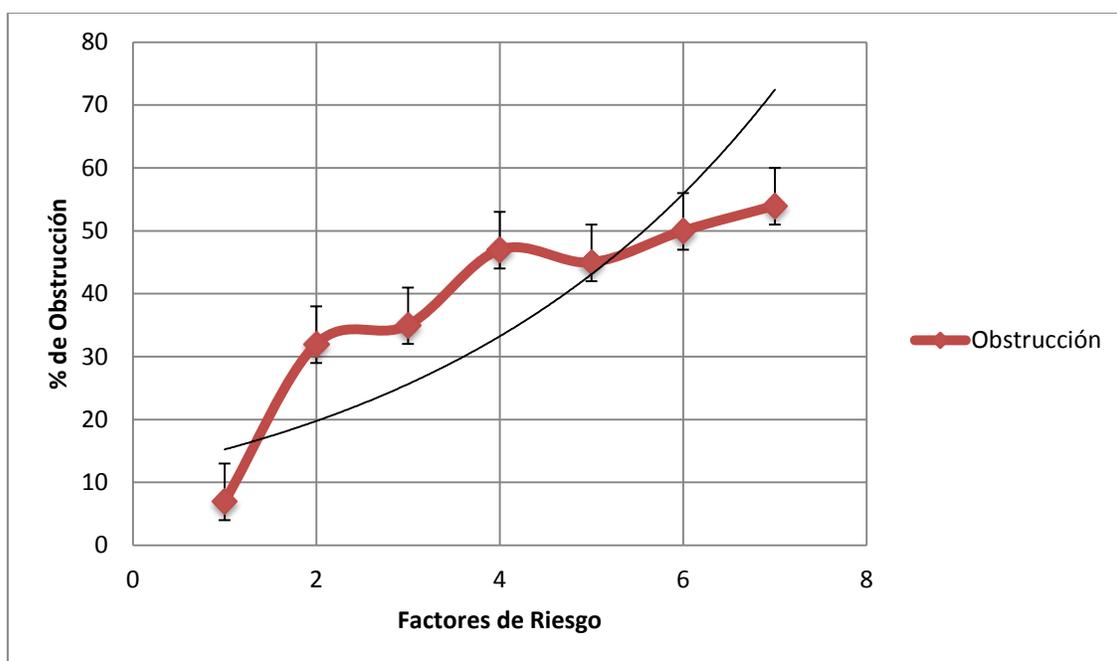


Figura IX. Correlación estadística entre Factores de riesgo y Obstrucción.
 $P=.056$ con $RR= .453$

Se realizó la prueba de Correlación no Paramétrica de Spearman, para buscar correlaciones y al confrontar Grado de hipertensión arterial con obstrucción se obtuvo significancia estadística con *P= .002 con *RR= .956.

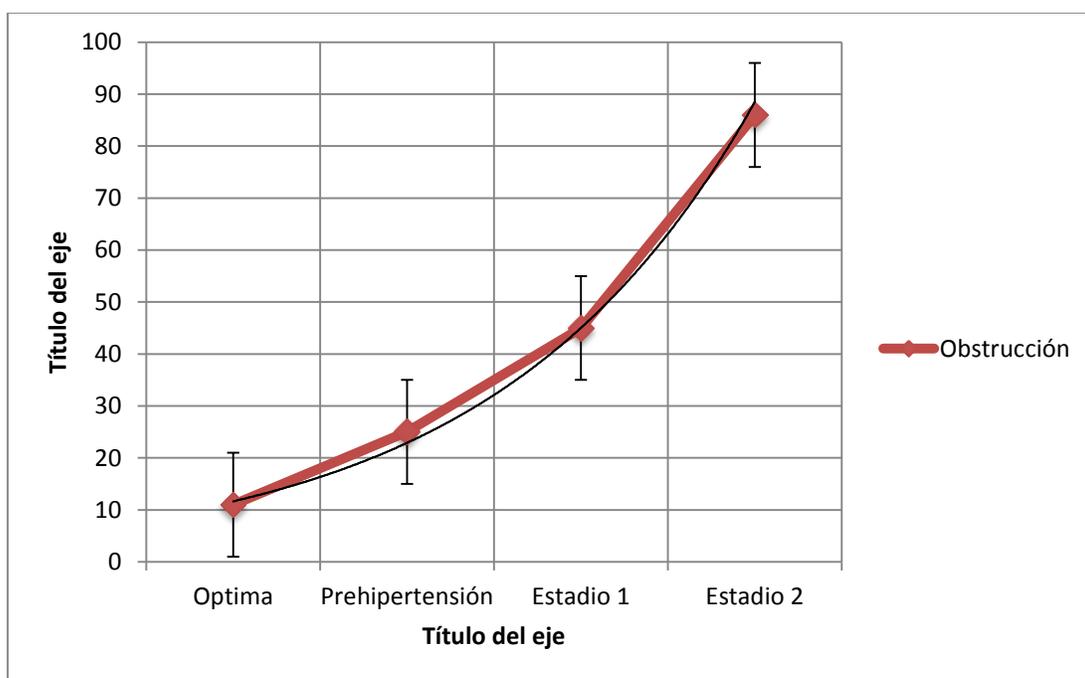


Figura X. Correlación estadística entre Hipertensión Arterial y Obstrucción.

***P= .002 con *RR= .956.**

Características Inmunohistoquímicas

Se realizaron inmunohistoquímicas para valorar la expresión de MMP - 1 en diferentes estadios de la clasificación de la asociación americana del corazón. Mostrando una expresión errática en los diferentes grados.

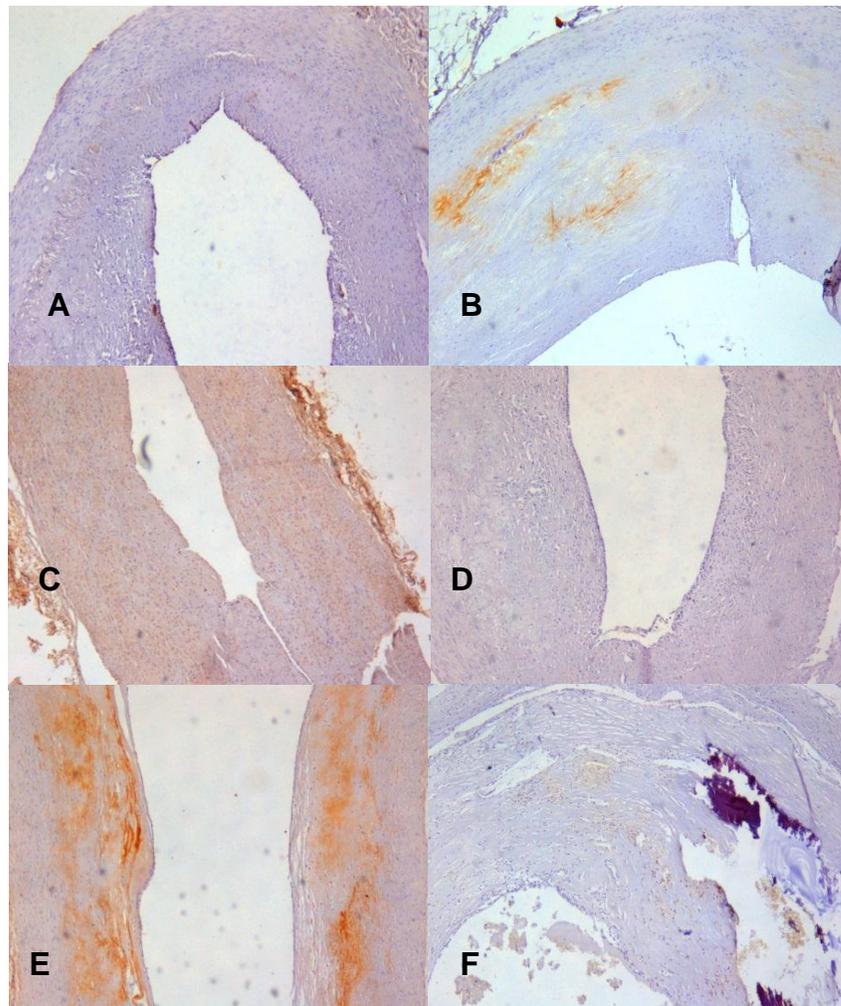


Figura XI. Representación de la presencia de MMP-1 en distintos estadios de aterosclerosis acorde a la A.A.C. A) Grado I, B) Grado II, C) Grado III, D) Grado IV, E) Grado V, F) Grado VI. (Fotomicrografías aumento x100)

Representación histológica de la expresión de MMP - 9 en diferentes estadios de la clasificación de la asociación americana del corazón. Mostrando una aparente expresión en aumento de intensidad acorde al grado histológico clasificado.

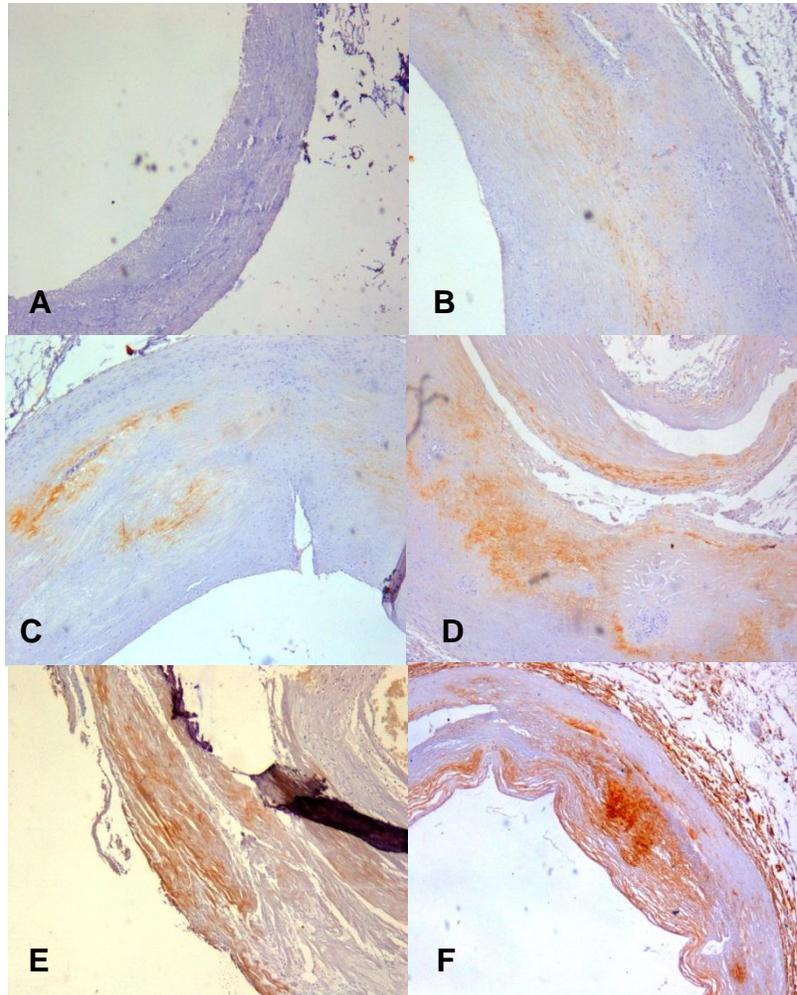


Figura XII. Representación de la presencia de MMP-9 en distintos estadios de aterosclerosis acorde a la A.A.C. A) Grado I, B) Grado II, C) Grado III, D) Grado IV, E) Grado V, F) Grado VI. (Fotomicrografías aumento x100)

Representación histológica de la expresión de MMP - 10 en diferentes estadios de la clasificación de la asociación americana del corazón. Mostrando una expresión sin aparente asociación entre los grados histopatológicos.

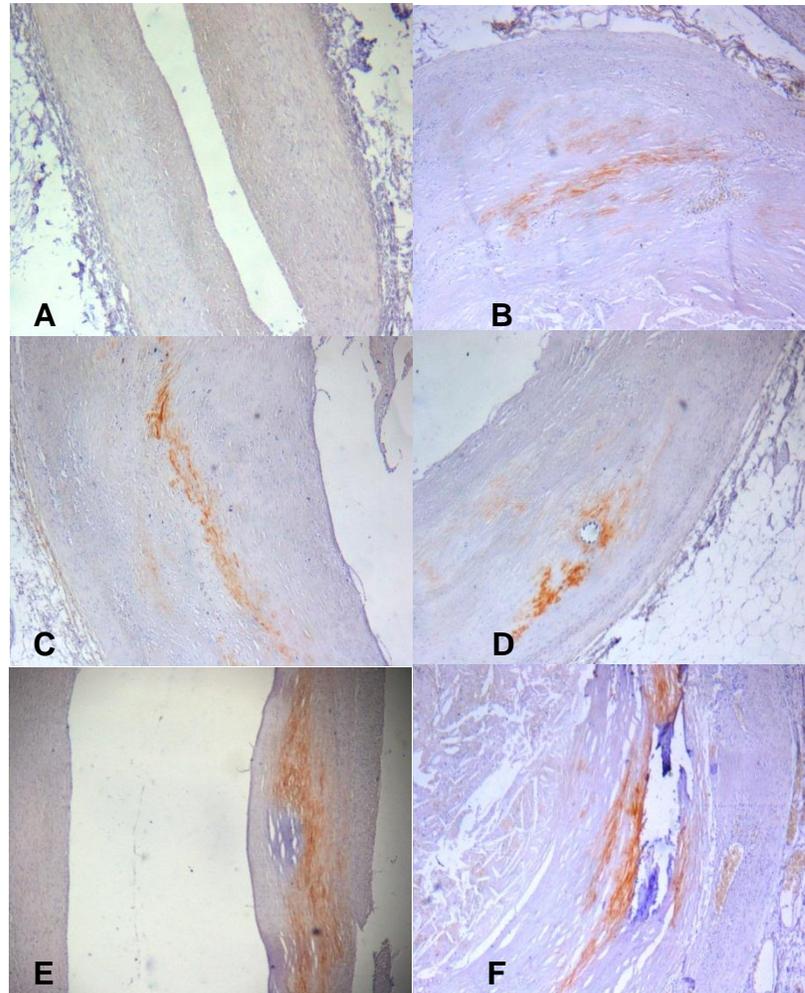


Figura XIII. Representación de la presencia de MMP-10 en distintos estadios de aterosclerosis acorde a la A.A.C. A) Grado I, B) Grado II, C) Grado III, D) Grado IV, E) Grado V, F) Grado VI. (Fotomicrografías aumento x100)

Representación histológica de la expresión de TIMP-1 en diferentes estadios de la clasificación de la asociación americana del corazón. Mostrando una expresión creciente acorde al grado histopatológico con un mayor aumento de la expresión a partir del grado IV.

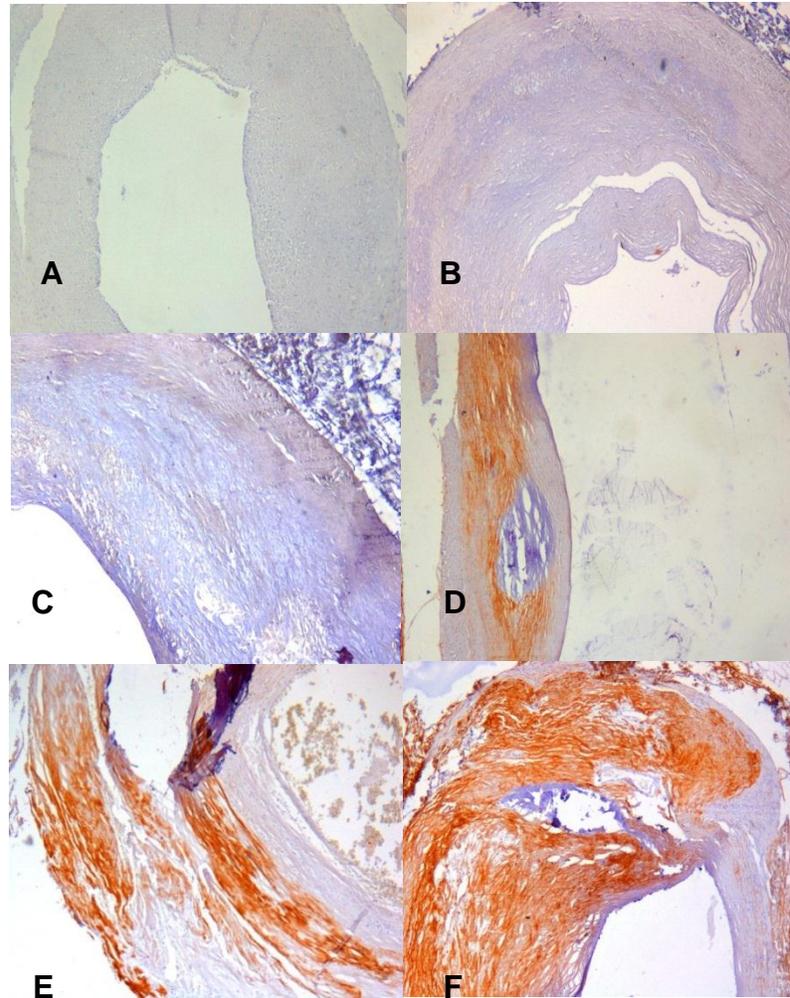


Figura XIV. Representación de la presencia de TIMP-1 en distintos estadios de aterosclerosis acorde a la A.A.C. A) Grado I, B) Grado II, C) Grado III, D) Grado IV, E) Grado V, F) Grado VI. (Fotomicrografías aumento x100)

Correlaciones Estadísticas

Al confrontar la expresión de MMP-1 contra la severidad de grado histopatológico obtuvimos $P = .364$ con $RR = .234$

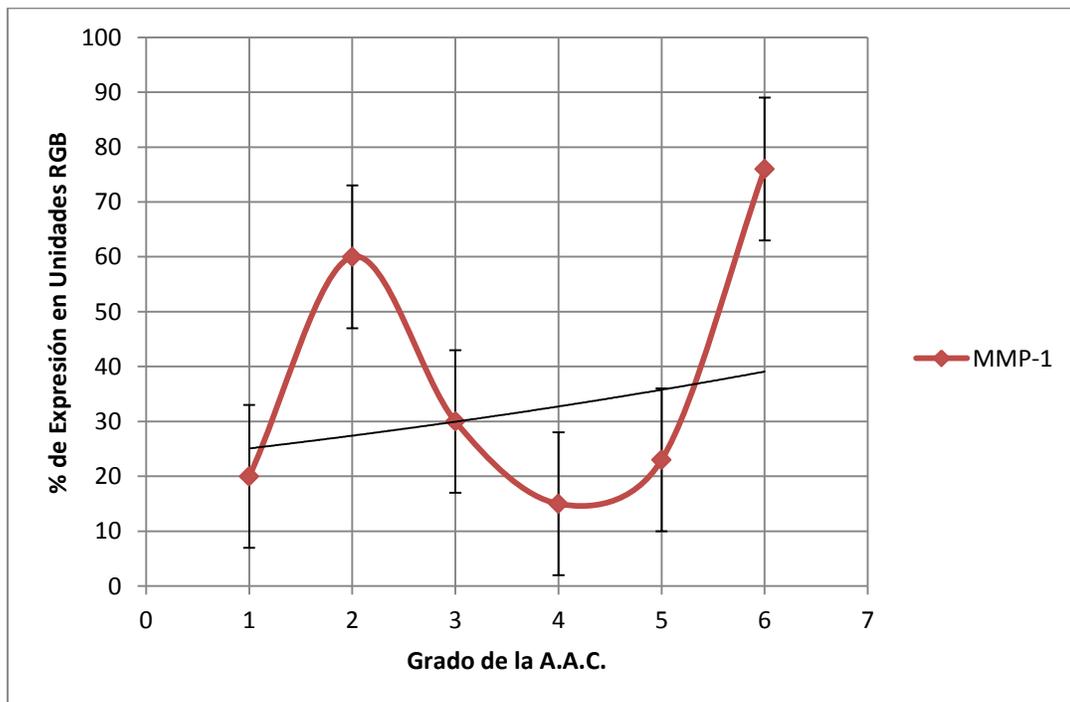


Figura XVI. Correlación estadística entre MMP-1 y Grado Histopatológico de la A.A.C. $P = .364$ con $RR = .234$

Al confrontar MMP-9 contra la severidad de grado histopatológico acorde a la clasificación de la O.M.S. obtuvimos significancia estadística * P=.004 con *RR= .887 así como con la Clasificación de la A.A.C. *P=.001 con *RR= .796.

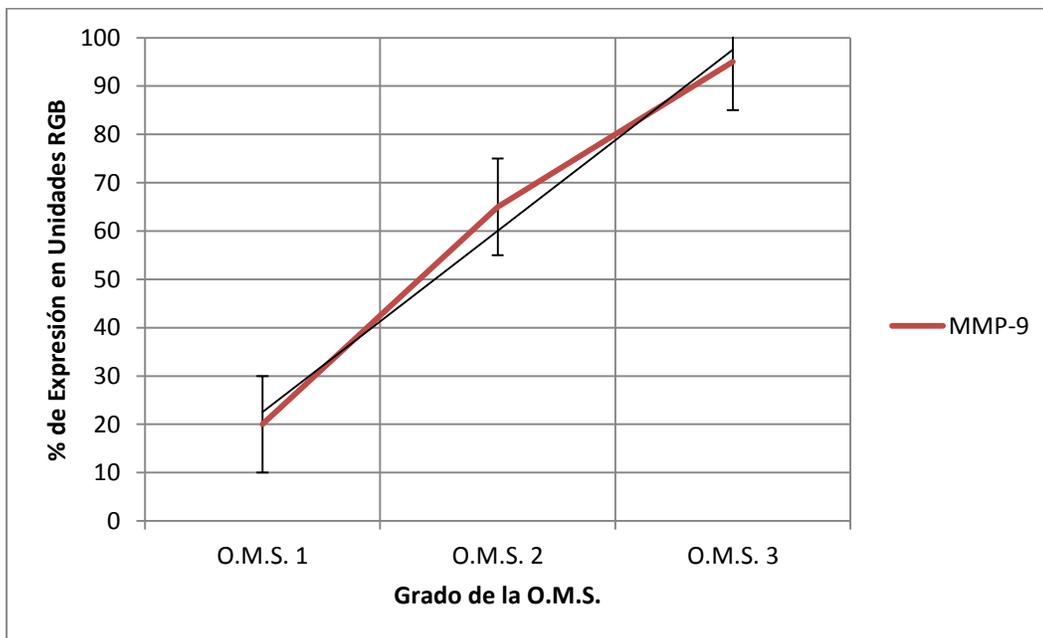


Figura XVII. Correlación estadística entre MMP-9 y Clasificación de la O.M.S. * P=.004 con *RR= .887

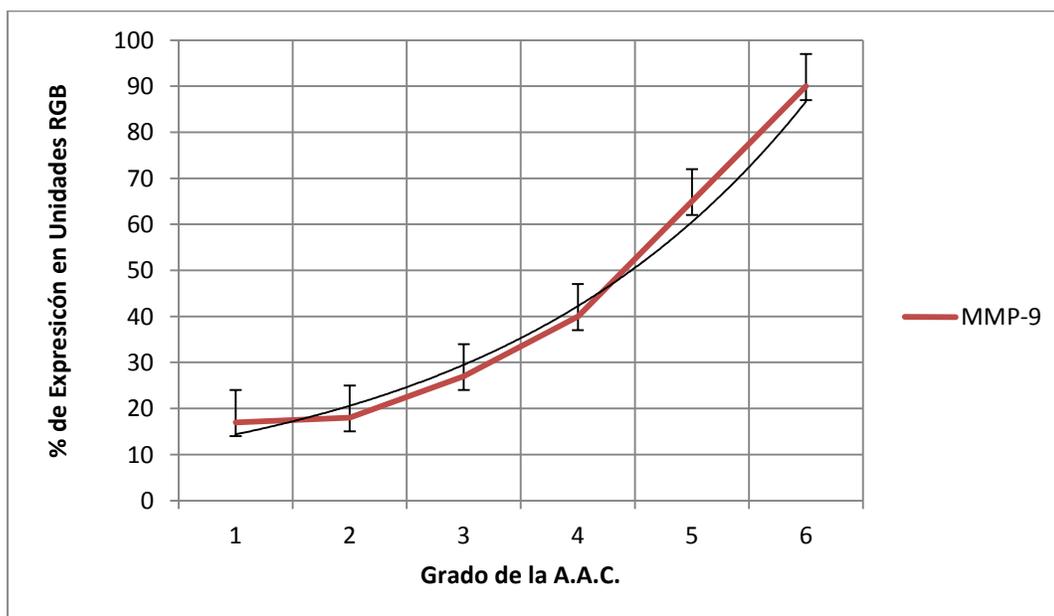


Figura XVIII. Correlación estadística entre MMP- 9 y Clasificación de la A.A.C. *P=.001 con *RR= .796

Con la confrontación de la MMP-10 contra grado histopatológico obtuvimos $P = .069$ con $RR = .346$

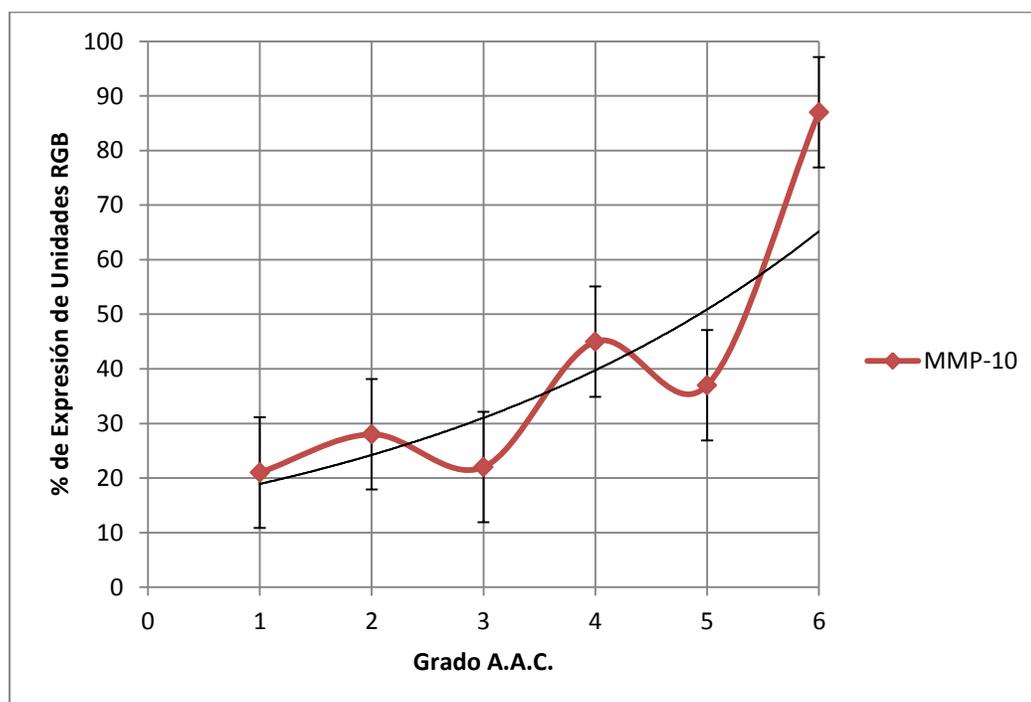


Figura XIX. Correlación estadística entre MMP-10 y Grado Histopatológico A.A.C. $P = .069$ con $RR = .346$

Al valorar el TIMP-1 contra el grado de obstrucción obtuvimos significancia *P= .006 con *RR= .859.

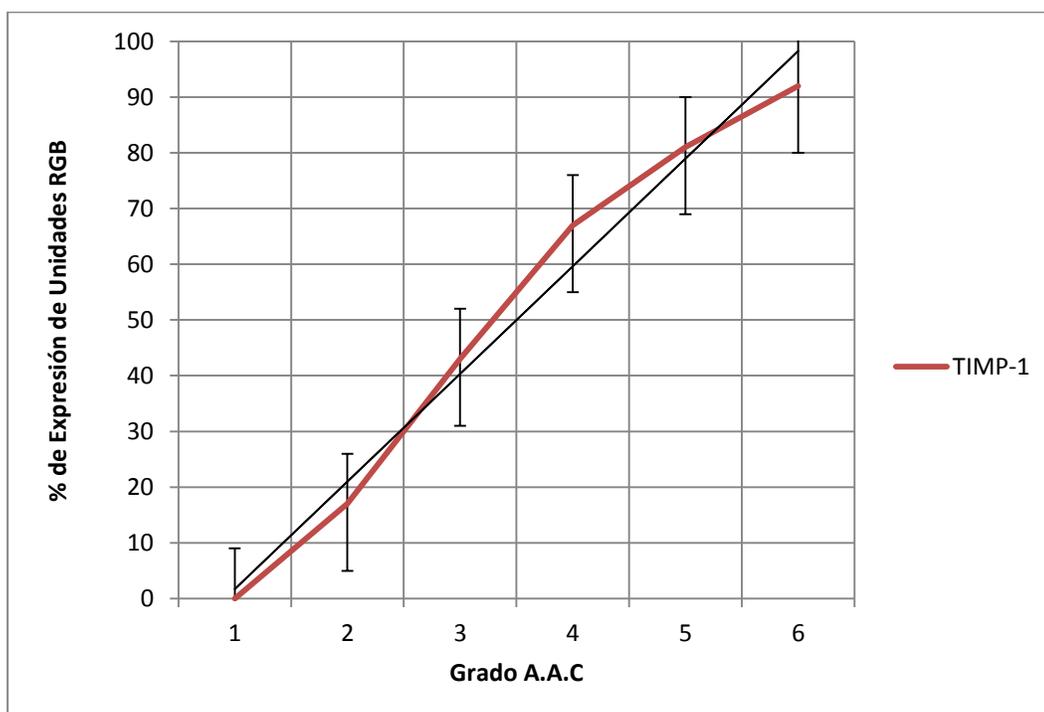


Figura XX. Correlación estadística entre TIMP-1 y Grado Histopatológico.

***P= .006 con *RR= .859.**

Discusión

Los resultados encontrados en cuanto los factores de riesgo cardiovascular en este trabajo muestran que la población estudiada poseía una gran prevalencia de múltiples factores concomitantes, aproximadamente el 75% de la población presentaba 3 o más factores de riesgo por lo que se podría inferir que este elevado porcentaje de patología metabólica coloca a esta población en susceptibilidad de padecer síndrome metabólico.

La hipertensión arterial es uno de los factores de riesgo que juega un papel importante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. La ENSANUT 2006 identificó que el 26.3% de la población total tenía hipertensión, y que entre los 20 y los 50 años de edad la prevalencia aumentó de 10.5% hasta 41.5%,³ situación que no coincide con los resultados de este trabajo ya que se encontró que el 41% y 42% tenían cifras de presión arterial (sistólica y diastólica) en rangos de prehipertensión mientras que un 37% se presentó con cifras tensionales de estadio 1 y 2 condicionando esto una mayor prevalencia de hipertensión en esta población que la reportada para la población mexicana por la ENSANUT 2006

Los pacientes de nuestro estudio se caracterizaron por una elevada prevalencia de sobrepeso u obesidad, posiblemente resultado de estilos de vida inadecuados como el sedentarismo y una dieta con alto contenido de carbohidratos y grasas saturadas.¹¹ Esto preocupa pues la obesidad, se encuentra asociada con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

La proporción de hombres obesos ante mujeres obesas en esta muestra es prácticamente (2:1). Así mismo de manera separada la presencia de sobrepeso u obesidad, con la consecuente elevada prevalencia de dislipidemias se encontró en aproximadamente el 70% de la muestra, así mismo En cuanto a las determinaciones bioquímicas que otorgan riesgo aterosclerótico se encontró que en esta población los niveles plasmáticos LDL se encontraron en promedio

42 mg/dl por encima de los valores de referencia para nuestra población, lo cual es compatible con los datos proporcionados por la ENSANUT 2006. La dislipidemia es un hallazgo frecuente y común al estudiar poblaciones adultas de origen latino y asiático con un incremento paulatino de su prevalencia asociado con la edad. Estudios realizados en México,^{12,13} España^{14,15} y Turquía¹⁶ han informado de la elevada prevalencia de dislipidemias, especialmente de hipoalfalipoproteinemias y de hipertrigliceridemia, sobre todo en las mujeres de mayor edad. Según cifras reportadas por la ENSANUT 2006 el 40.8% de las mujeres tenía cifras menores a 35 mg/dl de colesterol HDL.¹⁷

El incremento en las cifras séricas de colesterol y triglicéridos relacionados con la edad es tema controvertido y es un proceso multifactorial que incluye tanto factores propios del individuo como los genéticos, los endocrinos y los metabólicos hasta aquellos asociados al medio ambiente como la dieta, la actividad física o la ocupación laboral. Los niveles elevados de TAG seguidos por los de colesterol y por la hiperglucemia inducirían o colaborarían en agravar la disfunción endotelial. El papel de los TAG no ha sido bien establecido como factor de riesgo, sin embargo parece haber una interconexión entre niveles elevados de TAG y colesterol con el riesgo de padecer infarto de miocardio³¹. Nuestros resultados parecen sugerir que niveles elevados de TAG combinados con otros factores de riesgo pueden tener un valor predictivo y terapéutico en el inicio de la lesión, también sugerido por Rubins⁴⁹ Es preciso evaluar cada uno de estos factores a fin de ponderar su participación en incremento de dislipidemias relacionadas con el envejecimiento.^{12,18,19}

Los resultados confirman que el desarrollo de la Aterosclerosis coronaria y sus consecuencias, como el resto de las lesiones ateroscleróticas en otros sectores vasculares, es progresivo desde la infancia (6) y evoluciona con el desarrollo del hombre, ejerciendo su gran influencia el medio ambiente y siendo el responsable de infartos de miocardio y muerte súbita. La Arteria Coronaria Epicárdica

Descendente Anterior, es la más dañada en nuestra casuística, siendo la responsable de la incidencia de una mayor presencia de superficie relativa ocupada por placas fibrosas y graves, de ello depende que el total de aterosclerosis y los índices de obstrucción y estenosis muestren también mayores valores de sus medias. Numerosos estudios realizados han demostrado que la arteria descendente anterior resulta ser la más afectada dentro de los 3 vasos coronarios, siendo su afectación por la aterosclerosis la causante de una gran morbilidad y mortalidad por enfermedades cardiovasculares.

La gravedad del proceso aterosclerótico se hace manifiesto en los hombres jóvenes con respecto a las mujeres coetáneas, para mostrar un grado similar a medida que avanza la edad, planteamiento que se avala por la acción protectora de los estrógenos en la mujer premenopáusica⁹. Además, al subdividir a la población por grupo etario se observó mayor severidad del proceso aterosclerótico en el sexo femenino en relación con el masculino, pudiendo observar que la arteria descendente anterior fue la más comprometida en el sexo femenino, lo cual puede estar en relación con el hecho de que en esta muestra la mayor cantidad de mujeres estuvo en el grupo de edad entre 56 y 70 años, que corresponde con el período postmenopáusico, en el cual la intensidad del proceso aterosclerótico se hace más severo por existir disminución significativa de los niveles sanguíneos de estrógenos, que muchos autores aseguran que causan el fenómeno arterosclerótico^{10,11}.

A pesar de estas diferencias, en cada grupo de edad de cada población por separado, la severidad del proceso aterosclerótico aumenta con la edad, pues este comienza desde la propia concepción del ser humano y después del nacimiento; cuando se incorporaran hábitos y estilos de vida más o menos saludables, se van añadiendo el impacto de los conocidos como factores de riesgo aterosclerótico, desarrollándose el proceso con diferente intensidad pero

siempre de forma ascendente en el transcurso de los años. Ya por encima de los 70 años se iguala prácticamente el desarrollo de este proceso en los grupos, tenga o no factores de riesgo, ya que los no protegidos genéticamente ya han sido víctimas de las consecuencias de la enfermedad aterosclerótica.

Nuestros resultados reflejan que los más afectados por la aterosclerosis coronaria fueron los diabéticos y obesos. Desde hace varios años se sabe que la diabetes, predispone a las enfermedades vasculares, pero aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual la hiperglicemia representa un factor de riesgo.

Se han observado ciertas relaciones entre la hiperglicemia y el aumento de la adhesión de las plaquetas, así como otros trastornos de la coagulación e insulinoresistencia¹². En cuanto a la obesidad, aunque es un factor predisponente, recientemente se ha puesto en duda que desempeñe un papel independiente, ya que según varios estudios, la relación entre obesidad y cardiopatía isquémica puede explicarse por la aparición de otros factores de riesgo¹³. La Hipertensión Arterial¹⁰, con el aporte de placas fibrosas y la Diabetes Mellitus ¹¹, con el de placas graves y la acción mecánica sobre el endotelio aceleran el proceso y al acompañarse de hipertrofia ventricular el riesgo de la enfermedad es mayor ^{2,3}. Estudios realizados por otros autores han demostrado la relación entre la gravedad de las lesiones arteriales y las lesiones de isquemia y necrosis aparecidas en el músculo cardíaco, como consecuencia del proceso hipóxico- isquémico desencadenado por ellas¹².

Al comparar los diabéticos e hipertensos se puede observar que la arteriosclerosis fue más grave en los diabéticos, lo cual coincide con investigaciones realizadas que plantean de la hipertensión arterial afecta más los vasos cerebrales que los coronarios¹⁴.

El diabético tiene una gran incidencia como factor de riesgo para la aterosclerosis y enfermedades isquémicas del corazón. En nuestro medio se debió esperar, como lo demuestra la literatura consultada que entre los grupos de estudio: diabéticos y los sin factor de riesgo conocido, se presentara una significación estadística destacable al analizar las variables arteriales del sistema aterométrico, a favor de los diabéticos, por el impacto que esta entidad produce sobre la íntima arterial. La mayoría de los factores clásicos de riesgo aterosclerótico se han relacionado con cambios en las concentraciones de diversos biomarcadores de matriz extracelular así como con el riesgo vascular global de Framingham^{41,42}, si bien el mecanismo que relaciona ambos hechos no se ha establecido.

Es posible que los factores de riesgo modulen la estructura vascular y la estabilidad de la placa, y que esto tenga influencia en las concentraciones de MMP o TIMP, o a través de una regulación de la producción de colágeno. Tampoco puede descartarse que los valores alterados de los biomarcadores sean un epifenómeno o una respuesta adaptativa al propio proceso aterosclerótico. Así como las alteraciones en la homeostasis de la MEC, como consecuencia de cambios en la síntesis y/o la degradación, se han asociado con enfermedades vasculares. Nosotros encontramos una correlación entre la gravedad de la lesión aterosclerótica y el aumento de señal en la inmunohistoquímica de MMP-9 y TIMP-1, si bien se encuentran presentes la MMP-1 y MMP-10 estas se presentan sin un patrón definido en distintas lesiones. Hay evidencia de que las MMP están involucradas en todas las fases del proceso aterosclerótico, desde la lesión inicial a la ruptura y la trombosis.

Es importante señalar que no todas las MMP reaccionan de forma similar ante los mismos estímulos y que el impacto de varios factores puede ser específico del tipo celular implicado. Variaciones en la secuencia de la región promotora de

genes que codifican MMP pueden ser otro de los mecanismos implicados en la regulación de la actividad proteolítica.

Se ha observado, a escala experimental y clínica, mediante estudios inmunohistoquímicos y zimográficos, un aumento de la expresión de MMP en diferentes tipos de lesiones ateroscleróticas³⁹⁻⁴¹. Galis et al, en un modelo de lesión carotídea en ratones knock-out para MMP-9, observaron descenso de la hiperplasia de la íntima y acumulación de colágeno intersticial en el sistema vascular⁴². En otro estudio, en ratones knock-out para TIMP-1 (en los que la actividad MMP-1 estaba aumentada), se observó una reducción del tamaño de la placa aterosclerótica⁴³. La conclusión de estos estudios es que la inhibición de MMP podría contribuir a la estabilidad de la placa al promover un incremento del contenido de colágeno.

En nuestro estudio medimos la expresión de MMP-1,9 y 10, y de TIMP-1, así como el contenido de colágeno en secciones vasculares coronarias, nuestros resultados demostraron un incremento significativo de MMP en lesiones avanzadas, sobre todo en áreas con alto contenido en macrófagos y, por tanto con mayor inflamación⁴⁵. En concreto, observamos una mayor expresión de MMP 9 y TIMP 10, que se correlacionó con una reducción del contenido de colágeno en las lesiones ateroscleróticas avanzadas, mayor expresión de MMP 9 en las lesiones aneurismáticas, aumento de TIMP-1 en las que mostraban calcificación. Estos resultados indican un papel preponderante de las MMP en lesiones ateroscleróticas avanzadas y que las diferencias observadas en el balance proteolítico en los distintos lechos vasculares pueden estar implicadas en la evolución final de la lesión aterosclerótica humana y en la formación de aneurismas^{37,38,46}

Nuestros resultados estarían de acuerdo con otros estudios que han demostrado un aumento de MMP-9 en placas coronarias y carotideas inestables ⁴⁷, así mismo podríamos valorar la utilidad de la MMP-9 como un marcador adecuado ya que en este estudio encontramos asociación entre su intensidad de expresión y gravedad de la lesión.

Se ha observado aumento de MMP-9 y TIMP-1 en pacientes diabéticos y con síndrome metabólico^{50,51}. En estudios experimentales se ha observado que las concentraciones elevadas de glucosa inducen la expresión de MMP-1 y 2 por células endoteliales y de MMP-9 por macrófagos, sin efecto en el TIMP-1⁵².

La concentración de TIMP-1, pero no de MMP-9, se ha relacionado con el índice de masa corporal⁴¹. Finalmente, en un estudio realizado en mujeres obesas se observó un descenso de MMP-1 un año después de practicar una reducción gástrica⁵⁴. Se ha observado un aumento de MMP-9 circulante, pero también de TIMP-1 en sujetos con hipertensión y engrosamiento de la pared arterial⁵⁵. En la hipertensión arterial, habría un patrón caracterizado por un incremento de la síntesis de colágeno y una reducción de su degradación.

Hay un aumento de MMP-9 y TIMP-1 en fumadores, en parte relacionado con la duración de la exposición al tabaco⁵⁷. No se ha observado ninguna asociación entre la ingesta abusiva de alcohol y los valores circulantes de TIMP-1 y MMP-2⁵⁸, aunque sí se ha encontrado un aumento en la expresión de MMP-9 y 2 en los macrófagos alveolares, probablemente relacionado con el remodelado pulmonar en el contexto del síndrome de distres respiratorio agudo⁵⁹. Por otra parte, se ha podido observar una asociación inversa entre el consumo moderado de alcohol y las concentraciones circulantes de TIMP-1⁴¹

Si bien, a escala vascular, existen evidencias de una estrecha asociación entre MMP y la vulnerabilidad de la placa, hay más controversia con los resultados observados en la clínica². Un estudio analizó los valores de MMP-9 y TIMP-1 en pacientes con lesiones coronarias diagnosticadas angiográficamente. Se observó un aumento significativo de ambos parámetros en sujetos con IAM y angina inestable en relación con aquellos con síndrome coronario estable⁴⁹.

La edad es un factor de riesgo para las enfermedades vasculares, como la hipertensión y la aterosclerosis. Se ha observado desorganización en la lámina elástica interna en ausencia de lesión vascular en relación con la edad, por aumento de la expresión de diversas MMP con actividad elastasa, como MMP-2 y 9. Estímulos inflamatorios presentes en aortas de sujetos de edad avanzada, como TNF-3a y TGF- β , están involucrados en una mayor activación de MMP a escala vascular. Estos cambios moleculares observados durante el proceso de envejecimiento pueden representar nuevas dianas para la prevención y tratamiento de enfermedades vasculares relacionadas con la edad²⁰.

Conclusiones

1. La severidad de la Aterosclerosis Coronaria aumenta con la edad en ambos sexos, aunque las mujeres se ven afectadas tardíamente acelerándose el proceso a partir de la cuarta década de la vida. Ya que las variables que indican gravedad del proceso en edades tempranas son mucho más evidentes en el sexo masculino, se puede observar como el desarrollo de las lesiones, expresión clínica y complicaciones, tiene lugar mas tardíamente en la mujer donde la influencia beneficiosa de los estrógenos sobre el endotelio las hace diferentes, por lo que el conocimiento de la predisposición del hombre de sufrir de aterosclerosis coronaria en cualquiera de sus formas clínicas a la cuarta década de la vida nos llevan a tomar acciones de vigilancia y cambio de estilo de vida para prevenir complicaciones.^{9,10}
2. Los factores de riesgo cardiovasculares de manera individual no se correlacionan con el grado de obstrucción a excepción de la Hipertensión Arterial.
3. Los dos factores de riesgo con más presencia en pacientes con lesiones iniciales fueron: hipertensión (50 %) y glucemia (50 %), tabaco (80 %) e hipertrigliceridemia (57 %).
4. Globalmente el % de participación de los factores de riesgo fue: 1º hipertensión (63%), 2º tabaco (56%), 3º hiperglicemia (51%), 4º alcohol (39%), 5º hipertrigliceridemia (28,5%) y 6º hipercolesterolemia (28%).
5. La arteria más afectada fue la Descendente Anterior, coincidiendo con trabajos anteriores, responsable de las lesiones en infartos cardiacos y muerte súbita
6. Los obesos y diabéticos fueron los que más daño aterosclerótico presentaron en las tres arterias.
7. La Hipertensión Arterial y la Diabetes Mellitus, favorecen que de forma acelerada evolucione el proceso aterosclerótico en las arterias coronarias.

8. En los pacientes fumadores se encontraron las arterias coronarias más afectadas que en los no fumadores.
9. El Sistema Aterométrico es un método efectivo y válido en la caracterización del proceso aterosclerótico en el sector vascular coronario.
10. Existe diferencia en el patrón de expresión de metaloproteasas 1,9 y 10 acorde a la clasificación histopatológica.
11. Aparentemente el TIMP-1 expresado de manera ascendente por placas ateroscleróticas
12. La MMP-9 presenta una intensidad creciente acorde a la gravedad de la lesión aterosclerótica.
13. La presencia de MMP-10 en tejido aterosclerótico no correlaciona con la gravedad de la lesión histopatológica
14. Las MMPs de la pared arterial se modifican con la evolución del ateroma. Las variaciones que sufren son iguales en las diferentes arterias coronarias.
- 15.** La MMP 9 y la MMP 10 se manifiestan de forma diferente en las lesiones iniciales y avanzadas: las pro-formas de las MMPs 9 y 10 están presentes en La MMP-9 activa se manifiesta en lesión avanzada coronaria. La MMP-10 activa está presente en las lesiones iniciales.

Perspectivas

Teniendo en cuenta el papel de las MMP en la aterosclerosis no es sorprendente que su inhibición pueda representar una estrategia terapéutica potencial encaminada a la estabilización de las placas de ateroma, reduciendo la degradación de la MEC y restaurando el equilibrio MMP/TIMP. Teóricamente, los métodos de inhibición de MMP incluirían agentes inhibidores de la actividad y producción de MMP y aumento de TIMP-1^{53,54}, si bien existen resultados contradictorios sobre el efecto beneficioso de la inhibición selectiva de MMP⁵⁵.

Diversos fármacos empleados en el tratamiento de la aterosclerosis pueden tener un efecto modulador de la actividad proteolítica celular y/o sistémica. Por lo que se abre un campo de amplias posibilidades al intentar modular este sistema que juega un papel principal en el desarrollo de las lesiones ateromatosas.

ANEXO 1

HOJA UNIVERSAL DE RECOLECCION DE DATOS:

FICHA DE IDENTIFICACION



No. NECROPSIA |_|_|_|_|_|_|_| No. DE EXPEDIENTE |_|_|_|_|_|_|_|

NOMBRE:

Ocupación: Edad:..... Género: Masculino Femenino

INFORMACION CLINICA

1. Diagnóstico Clínico (CIE 10): _____

Antecedentes Personales:

2. DM Si No En Tx. Si No

Valor de Laboratorio

3. HAS Si No En Tx. Si No

4. Dislipidemia Si No En Tx. Si No

5. Obesidad **Peso** _____ **Talla** _____ **IMC** _____

Clasificación _____

Signos y Síntomas:

8. Precordalgia: Si No

9. Disnea: Si No

10. Diaforesis: Si No

11. Nausea: Si No

12. Vomito: Si No

13. Sincope: Si No

14. Confusión Aguda: Si No

15. Descompensación de IC: Si No

16. Ansiedad: Si No

17. Palidez: Si No

18. Astenia: Si No

19. Taquicardia: Si No

20. Bradicardia: Si No

21. 3° Ruido Si No

22. 4° Ruido Si No

23. Soplo Si No

Especifique _____

24. Estertores Si No Especifique _____

25. TA: _____ Clasif. JNC VII _____

Sist. Diast. TAM Sist. Diast. TAM Sist. Diast. TAM Prom. _____

26. Motivo de ingreso: _____

27 Inicio de síntomas Súbito Paulatino

28 Tiempo de evolución _____

31. Antecedentes familiares de Cardiopatía Isquémica

Si No

32. Antecedentes familiares de Enfermedad Autoinmune

Si No

33. Antecedentes familiares de Dislipidemia Familiar

Si No

Datos de Laboratorio:

	1.	2.	3.	4.	Prom.
34.Hb. _____	_____	_____	_____	_____	_____
35.Hto. _____	_____	_____	_____	_____	_____
36.VSG. _____	_____	_____	_____	_____	_____
37.Leuc _____	_____	_____	_____	_____	_____
38.Neut _____	_____	_____	_____	_____	_____
39.Linf. _____	_____	_____	_____	_____	_____
40.Gluc _____	_____	_____	_____	_____	_____
41.Urea _____	_____	_____	_____	_____	_____
42.Creat _____	_____	_____	_____	_____	_____
43.Col. . _____	_____	_____	_____	_____	_____
44.LDL. _____	_____	_____	_____	_____	_____
45.HDL. _____	_____	_____	_____	_____	_____
46.TGL. _____	_____	_____	_____	_____	_____
47.CPK . _____	_____	_____	_____	_____	_____
48.MB. _____	_____	_____	_____	_____	_____
49.Trop. _____	_____	_____	_____	_____	_____

Datos de Gabinete:

50. Placa de Tórax: Sin Alteraciones Aparentes Prominencia del Botón Aórtico Cardiomegalia

51. ECG: Normal Isquémico Lesión Necrosis Hipertrofia Sobrecarga Bloqueo

Diagnósticos Anatómo-patológicos.

Hallazgos

52. Corazón Peso _____ VEVD _____ VSVD _____ VEVI _____ VSVI _____

DTVD _____ DTVI _____

Cardiomegalia Si No

Hipertrofia Dilatación Ambas

53. TEP Si No

54. Edema Pulmonar Si No

Cardiogénico No Cardiogénico

55. Patrón Microscópico (AHA): 1 2 3 4 5 6

56. Patrón Macroscópico (OMS): 1a 2 1b 3 1c

4 2a 5 2b 6 2c

7 3a 8 3b 9 3c

57. Patrón Histopatológico de IC _____

58. Enfermedad Principal. _____

59. Alteración Predisponente. _____

60. Alteración Concomitante. _____

61. Alteración Independiente. _____

62. Causa Inmediata de Muerte. _____

ANEXO 2

Técnica de Inmunohistoquímica

La inmunotinción puede llevarse a cabo en la forma tradicional o bien mediante métodos semiautomáticos y automáticos los cuales en el mercado podemos encontrar de diferentes marcas, modelos, capacidad y con diferentes sistemas ya sean abiertos o cerrados, todos los equipos sin excepción cumplen con los estándares de calidad; las marcas que respaldan estos equipos de inmunotinción son DAKO, BIOGENEX, VENTANA, FISHER Y SHANDON, sin embargo cada laboratorio implementará aquel que vaya acorde con sus necesidades.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Formaldehído amortiguado al 10%

Formaldehído 37-40%	100 ml/lit
Fosfato de Potasio monobásico	4.0 g/lit.
Fosfato de Potasio dibásico	6.5 g/lit.
Agua desionizada	c.b.p. 1000 ml.

Citrato de Sodio 0.1 M

Citrato de Sodio (P.M. 294.2)	29.4 g/lit.
Agua desionizada	900 ml.
pH 6, ajustar pH con HCl conc.	pH 6
Tween 20	1 ml
Agua Desionizada	c.b.p.1000 ml.

PBS

Agua desionizada	900 ml.
Fosfato de Potasio monobásico	0.24 g/lt
Fosfato de Potasio dibásico	1.44 g/lt.
KCl	0.2 g/lt.
NaCl	8.0 g/lt.
Agua desionizada	c.b.p. 1000 ml.

TBST

Agua desionizada	750 ml
Tris	6.05 g/lt.
NaCl	8.76 g/lt.
Tween 20	1 ml.
Etanol absoluto (opcional)	50 ml /lt.
pH ajustar pH con HCl conc.	7.5
Agua desionizada	c.b.p. 1000 ml.

Albúmina Bovina 1%

Albúmina sérica bovina	1 g/100 ml.
PBS (agua estéril)	100 ml.

Peróxido de Hidrógeno 0.3%

Agua destilada	70 ml.
Peróxido de Hidrógeno 30%	3 ml.
Agua destilada	c.b.p. 100 ml.

PBS/diluyente de anticuerpos

Agua desionizada estéril	90 ml.
Fosfato de Potasio monobásico	0.024 g/100ml
Fosfato de Potasio dibásico	0.144 g/100 ml.
KCl	0.02 g/100 ml.
NaCl	0.80 g/100 ml.
Agua desionizada estéril	c.b.p. 100 ml.
NaN ₃ 15 mM.	0.975 g/100 ml.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Yusuf S, Hawken S, Ôunpuu S, Dans T, Avezum A, on behalf of the INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with MI in 52 countries. *Lancet* 2004; 364: 937-52.
2. Bethesda, Md, National Heart, Lung, and Blood Institute fact book: fiscal year 1995. 1996: US Dept of Health and Human Services. p. 30–52.
3. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. A perspective for the 1990's. *Nature* 1993;362:801–9.
4. Van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, et al. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994;89:36–44.
5. Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring: the cause of acute myocardial infarction causing sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br Heart J* 1985; 53: 363–73.
6. Shah PK. New insights into the pathogenesis and prevention of acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* 1997;79:17–23.
7. Farmer JA, Gotto AM Jr. Dyslipidemia and other risk factors for coronary artery disease. In: Braunwald E, editor. *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*. 5th edition. Philadelphia: WB Saunders; 1997; p. 1126–60
8. de Beer FC, Hind CR, Fox KM, et al. Measurement of serum C-reactive protein concentration in myocardial ischemia and infarction. *Br Heart J* 1982;47:239–43.
9. Ridker PM, Cushman M, Stampher MJ. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997;336:973–9.
10. Galis Z, Sukhova G, Lark M, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;94:2493–503.
11. Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy J-Y. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation* 1997;96:396–9.

12. Warner SJC, Friedman GB, Libby P. Regulation of major histocompatibility gene expression in cultured human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis* 1989;9:279–88.
13. Alexander RW. Inflammation and coronary artery disease. *N Engl J Med* 1994;331:468–9.
14. Wakefield TW, Strieter RM, Prince MR, Downing LJ, Greenfield LJ. Pathogenesis of venous thrombosis: a new insight. *Cardiovasc Surg* 5:6-15, 1997
15. Gelehrter T D; Sznycer-Laszuk R Thrombin induction of plasminogen activator-inhibitor in cultured human endothelial cells. *The Journal of clinical investigation* 1986;77(1):165-9.
16. Collen D, Stump DL, Gold HK: Thrombolytic therapy. *Annu Rev Med* 1988;39:405-423
17. Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor. Sadler JE, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Harlan JM, Titani K, Davie EW. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Oct;82(19):6394-8.
18. Pendás AM, Knäuper V, Puente XS, Llano E, Mattei MG, Apte S, Murphy G, López-Otín C Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics and tissue distribution. *J Biol Chem.* 1997 Feb 14;272(7):4281-6.
19. Rifkin DB, Mazziere R, Munger JS, Noguera I, Sung J, Proteolytic control of growth factor availability. *APMIS.* 1999 Jan;107(1):80-5.
20. Falcone DJ, McCaffrey TA, Haimovitz-Friedman A, Vergilio JA, Nicholson AC. Macrophage and foam cell release of matrix-bound growth factors. Role of plasminogen activation. *J Biol Chem.* 1993 Jun 5;268(16):11951-8.
21. P. Shashkin, B. Dragulev, and K. Ley, Macrophage differentiation to foam cells, *Current Pharmaceutical Design*, vol. 11, no. 23, pp. 3061–3072, 2005.
22. W. Shi, X.Wang, D.M. Shih, V. E. Laubach, M. Navab, and A. J. Lusis, “Paradoxical reduction of fatty streak formation in mice lacking endothelial nitric oxide synthase,” *Circulation*, vol. 105, no. 17, pp. 2078–2082, 2002.
23. J. H. Pan, G. K. Sukhova, J. T. Yang, et al., “Macrophage migration inhibitory factor deficiency impairs atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice,” *Circulation*, vol. 109, no. 25, pp. 3149–3153, 2004.

24. K. S. Michelsen and M. Arditi, "Toll-like receptor signaling and atherosclerosis," *Current Opinion in Hematology*, vol. 13, no. 3, pp. 163–168, 2006.
25. L. Jonasson, J. Holm, O. Skalli, G. Bondjers, and G. K. Hansson, "Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque," *Arteriosclerosis*, vol. 6, no. 2, pp. 131–138, 1986.
26. Z.-Q. Yan and G. K. Hansson, "Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis," *Immunological Reviews*, vol. 219, no. 1, pp. 187–203, 2007.
27. M. H. Hoofnagle, J. A. Thomas, B. R. Wamhoff, and G. K. Owens, "Origin of neointimal smooth muscle: we've come full circle," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 26, no. 12, pp. 2579–2581, 2006.
28. G. R. De Meyer and H. Bult, "Mechanisms of neointima formation—lessons from experimental models," *Vascular Medicine*, vol. 2, no. 3, pp. 179–189, 1997.
29. G. K. Hansson and P. Libby, "The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword," *Nature Reviews Immunology*, vol. 6, no. 7, pp. 508–519, 2006.
30. Milioti, N et Al Antigen-Induced Immunomodulation in the Pathogenesis of Atherosclerosis *Clinical and Developmental Immunology Volume 2008*
31. S.-O. Olofsson and J. Bor`en, "Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis," *Journal of Internal Medicine*, vol. 258, no. 5, pp. 395–410, 2005.
32. E´ . Groyer, G. Caligiuri, J. Laschet-Khallou, and A. Nicoletti, "Immunological aspects of atherosclerosis," *La Presse M´edicale*, vol. 35, no. 3, part 2, pp. 475–486, 2006.
33. K. J. Moore and M. W. Freeman, "Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 26, no. 8, pp. 1702–1711, 2006
34. Y. V. Bobryshev, "Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis," *Micron*, vol. 37, no. 3, pp. 208–222, 2006
35. Pepper MS, Montesano R Proteolytic balance and capillary morphogenesis. *Cell Differ Dev.* 1990 Dec 2;32(3):319-27. Review

36. Murphy AN, Unsworth EJ, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol.* 1993 Nov;157(2):351-8.
37. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: Pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006; 86:515-581.
38. Tabas I. Nonoxidative modifications of lipoproteins in atherogenesis. *Annual Rev Nutrition* 1999; 19:123-139.
39. 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; 149:359-366.
40. Henning B, Murarani P, Ramadass P, Watkins B, Toborek M. Fatty acid-mediated activation of vascular endothelial cells. *Metabolism* 2000; 49:1006-1013.
41. Pockley A. Heat shock proteins, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation* 2002; 105:1012-1017
42. Kottke BA, Subbiah MT. Pathogenesis of atherosclerosis. Concepts based on animal models. *Mayo Clin Proc* 1978; 53:35-48.
43. Frostergard J, Ulfgren A, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson G. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: Dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 1999; 145:33-43
44. Gupta S, Pablo A, Jiang X, Wang N, Tall R, Schindler C. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in apoE knockout mice. *J. Clin Invest* 1997; 99:2752-2761.
45. Linton M, Major A, Fazio S. Proatherogenic role for NK cells revealed. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 24: 992-994.
46. Benditt EP, Benditt JM: Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70:1753-1756.
47. Whitman S, Rateri D, Szilvassy S, Yokoyama W, Daugherty A. Depletion of natural killer cell function decreases atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1049-1054.
48. Hajjar KA. Changing concepts in fibrinolysis. *Curr Opin Hematol.* 1995 Sep;2(5):345-50. Review.

49. Robbie LA, Booth NA, Brown AJ, Bennett B. Inhibitors of fibrinolysis are elevated in atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996 Apr;16(4):539-45.
50. Lupu C, Calb M, Ionescu M, Lupu F. Enhanced prothrombin and intrinsic factor X activation on blood platelets from diabetic patients. *Thromb Haemost.* 1993 Oct 18;70(4):579-83.
51. Frostergard J, Ulfgren A, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson G. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: Dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 1999; 145:33-43
52. Robertson A, Hansson G. T cells in atherogenesis: For better or for worse?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2421-2432.
53. Bini A, Mesa-Tejada R, Fenoglio JJ Jr, Kudryk B, Kaplan KL. Immunohistochemical characterization of fibrin(ogen)-related antigens in human tissues using monoclonal antibodies. *Lab Invest.* 1989 Jun;60(6):814-21.
54. Thomas AC, Davies MJ. Post-mortem investigation and quantification of coronary artery disease. *Histopathology.* 1985 Sep;9(9):959-76.
55. Sreenath T, Matrisian LM, Stetler-Stevenson W, Gattoni-Celli S, Pozzatti RO. Expression of matrix metalloproteinase genes in transformed rat cell lines of high and low metastatic potential. *Cancer Res.* 1992 Sep 15;52(18):4942-7
56. Sueishi K, Kumamoto M, Sakuda H, Tanaka K. Angiogenic processes in the pathogenesis of human coronary atherosclerosis. *Curr Top Pathol.* 1993;87:47-58.
57. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature.* 1997 Feb 20;385(6618):729-33
58. Suzuki, M. *et al.* (1997) MMP Modulation of Cytokines *J. Biol. Chem.* **272**:31730.
59. Pérez Fernández R, et al. Interleucina-10 y enfermedad coronaria, *Rev Esp Cardiol* 2002;55(7):738-50

60. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol.* 2000 Mar;18(5):1135-49
61. Arumugam S, Hemme CL, Yoshida N, Suzuki K, Nagase H, Berjanskii M, Wu B, Van Doren SR. TIMP-1 contact sites and perturbations of stromelysin 1 mapped by NMR and a paramagnetic surface probe. *Biochemistry.* 1998 Jul 7;37(27):9650-7.
62. Fields GB, Netzel-Arnett SJ, Windsor LJ, Engler JA, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE. Proteolytic activities of human fibroblast collagenase: hydrolysis of a broad range of substrates at a single active site. *Biochemistry.* 1990 Jul 17;29(28):6670-7.
63. Woessner JF Jr. Role of matrix proteases in processing enamel proteins. *Connect Tissue Res.* 1998;39(1-3):69-73; discussion 141-9. Review.
64. Petzelbauer E, Springhorn JP, Tucker AM, Madri JA. Role of plasminogen activator inhibitor in the reciprocal regulation of bovine aortic endothelial and smooth muscle cell migration by TGF-beta 1. *Am J Pathol.* 1996 Sep;149(3):923-31.
65. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis
A.H.A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Sep;15(9):1512-31.
66. Wesley RB 2nd, Meng X, Godin D, Galis ZS. Extracellular matrix modulates macrophage functions characteristic to atheroma: collagen type I enhances acquisition of resident macrophage traits by human peripheral blood monocytes in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Mar;18(3):432-40
67. Gudewicz PW, Frewin MB, Heinel LA, Minnear FL. Priming of human monocyte superoxide production and arachidonic acid metabolism by adherence to collagen- and basement membrane-coated surfaces. *J Leukoc Biol.* 1994 Apr;55(4):423-9.
68. Southgate KM, Fisher M, Banning AP, Thurston VJ, Baker AH, Fabunmi RP. Upregulation of basement membrane-degrading metalloproteinase secretion after balloon injury of pig carotid arteries. *Circ Res.* 1996 Dec;79(6):1177-87.

70. Campbell GR, Campbell JH. Macrophage influence on smooth muscle phenotype in atherogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 1990;273:147-59.
71. Di Angelantonio E, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK, Thompson A, Wood AM, Lewington S, Sattar N, Packard CJ, Collins R, Thompson SG, Danesh J. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *Emerging Risk Factors JAMA.* 2009 Nov 11;302(18):1993-2000.
72. Johnson MD, Kim HR, Chesler L, Tsao-Wu G, Bouck N, Poverini PJ. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J Cell Physiol.* 1994 Jul;160(1):194-202.
73. Frostegård J, Ulfgrén AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 1999, 145:33–43
74. Gupta S, Pablo AM, Jiang X, Wang N, Tall AR, Schindler C: IFN γ potentiates atherosclerosis in apoE knockout mice. *J Clin Invest* 1997, 99:2752–2761
75. Schönbeck U, Sukhova GK, Gerdes N, Libby P: T(H)2 predominant immune responses prevail in human abdominal aortic aneurysm. *Am J Pathol* 2002, 161:499–506
76. BROWN DL, HIBBS MS, KEARNEY M, LOUSHIN C ISNER JM, *Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina, Circulation,* 1995, 91(8):2125–2131.
77. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994;94:2493–2503.
78. Sluijter JP, Pulskens WP, Schoneveld AH, et al. Matrix metalloproteinase 2 is associated with stable and matrix metalloproteinases 8 and 9 with vulnerable carotid atherosclerotic lesions: a study in human endarterectomy specimen pointing to a role for different extracellular matrix metalloproteinase inducer glycosylation forms. *Stroke.* 2006;37:235–239.
79. Griva M, Naplava R, Spendlikova M, Jarkovsky J, Hlinomaz O, Cihalik C. Potential role of selected biomarkers for predicting the presence and extent of coronary artery disease.

Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2010 Sep;154(3):219-25.

80. Skotnicki JS, Zask A, Nelson FC, Albright JD, Levin JI. Design and synthetic considerations of matrix metalloproteinase inhibitors. *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Jun 30;878:61-72.
81. Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med.* 1995 Dec 28;333(26):1757-63.
82. Galis ZS, Kranzhöfer R, Fenton JW 2nd, Libby Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Mar;17(3):483-9.
83. Duhamel-Clérin E, Orvain C, Lanza F, Cazenave JP, Klein-Soyer C. Thrombin receptor-mediated increase of two matrix metalloproteinases, MMP-1 and MMP-3, in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Oct;17(10):1931-8.
84. Shah PK. Pathophysiology of plaque rupture and the concept of plaque stabilization. *Cardiol Clin.* 1996 Feb;14(1):17-29.
85. Gomis-Rüth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature.* 1997 Sep 4;389(6646):77-81.
86. Cheng GC, Loree HM, Kamm RD, Fishbein MC, Lee RT Distribution of circumferential stress in ruptured and stable atherosclerotic lesions. A structural analysis with histopathological correlation. *Circulation.* 1993 Apr;87(4):1179-87.
87. Richardson PD, Davies MJ, Born GV. Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet.* 1989 Oct 21;2(8669):941-4.
88. Lendon CL, Davies MJ, Born GV, Richardson PD. Atherosclerotic plaque caps are locally weakened when macrophages density is increased. *Atherosclerosis.* 1991 Mar;87(1):87-90.
89. Kinlay S, Selwyn AP, Libby P, Ganz P. Inflammation, the endothelium, and the acute coronary syndromes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;32 Suppl 3:S62-6.

90. Srinivas VS, Vakili BA, Brown DL. Comparison of in-hospital outcomes following early or delayed angioplasty for acute myocardial infarction. *J Invasive Cardiol.* 2002 Dec;14(12):746-50.
91. Rajavashisth TB, Liao JK, Galis ZS, Tripathi S, Laufs U, Tripathi J, Chai NN, Xu XP, Jovinge S, Shah PK, Libby P. Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *J Biol Chem.* 1999 Apr 23;274(17):11924-9.
92. Pinsky DJ, Liao H, Lawson CA, Yan SF, Chen J, Carmeliet P, Loskutoff DJ, Stern DM. Coordinated induction of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and inhibition of plasminogen activator gene expression by hypoxia promotes pulmonary vascular fibrin deposition. *J Clin Invest.* 1998 Sep 1;102(5):919-28.
93. Parsons SL, Watson SA, Brown PD, Collins HM, Steele RJ. Matrix metalloproteinases. *Br J Surg.* 1997 Feb;84(2):160-6