



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

**DPTO. DE CIRUGÍA, OFTALMOLOGÍA,
OTORRINOLARINGOLOGÍA Y FISIOTERAPIA**

TESIS DOCTORAL:

***ESTUDIO DEL NIVEL DE ESTRÉS OXIDATIVO Y
VALORACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES
RELACIONADOS EN LA ATEROSCLEROSIS
CAROTÍDEA***

Presentada por Nuria Zamora González para optar al grado de
doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

**Dr. José Antonio González Fajardo
Dr. Carlos Vaquero Puerta**

2015

A mis padres, mi marido Jesús y a mi hija Sara

AGRADECIMIENTOS

Quiero manifestar mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido en el terreno profesional al desarrollo de este trabajo y a aquellas que me han ofrecido su apoyo en el ámbito personal.

En especial,

Al Dr. José Antonio González Fajardo y al Dr. Carlos Vaquero Puerta, por su desinteresado asesoramiento y colaboración en la elaboración de este trabajo, sus consejos y enseñanzas, sin los cuales no habría sido posible llevar a cabo este proyecto.

A todo el personal del Servicio de Análisis Clínicos por colaborar en la realización de pruebas de laboratorio, y en especial a las Dras. Beatriz Aguirre, M^aDolores Calvo, Encarnación Largo, Hortensia Marcos e Inmaculada Vidriales, que participaron en el proyecto de investigación y sin las cuales no habría sido posible llevar a cabo este trabajo. Agradecerles también las enseñanzas y apoyo prestado durante los años de residencia y posteriormente.

A los Drs. M^aDolores Ganfornina y Diego Sánchez, del Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM), por su participación en el proyecto, por su ayuda y por los múltiples conocimientos transmitidos en el área del estrés oxidativo y la genética. También agradecerles su disponibilidad y facilidad para acceder a su laboratorio de investigación.

Al Servicio de Anatomía Patológica, al Dr. Gerardo Martínez por colaborar en el análisis histológico de las muestras y su interpretación, y particularmente, al Dr. Tomás Álvarez, quien me ha facilitado además el trabajo de iconografía de las muestras.

A mi familia por la paciencia y el apoyo prestado incondicionalmente.

INDICE

1.	RESUMEN	11
2.	INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	17
2.1.	ATEROSCLEROSIS	19
2.1.1.	Patogénesis de la aterosclerosis.....	19
2.1.2.	Aspectos morfológicos de la aterosclerosis	31
2.1.2.1.	Estructura de la pared arterial normal	31
2.1.2.2.	Estadíos de la placa aterosclerótica.....	32
2.1.2.3.	Vulnerabilidad de la placa.....	37
2.1.3.	Manifestaciones clínicas de la aterosclerosis	38
2.1.4.	Evaluación de la estenosis carotídea. Métodos diagnósticos	40
2.1.4.1.	Eco-Doppler carotídeo	42
2.1.4.2.	Doppler Transcraneal	43
2.1.4.3.	Angiografía cerebral convencional	44
2.1.4.4.	Angio-Resonancia Magnética	44
2.1.4.5.	Antio-Tomografía Computerizada	45
2.1.5.	Manejo y tratamiento de la aterosclerosis carotídea	45
2.1.5.1.	Tratamiento de la aterosclerosis carotídea sintomática.....	45
2.1.5.2.	Tratamiento de la aterosclerosis carotídea asintomática	47
2.2.	ESTRÉS OXIDATIVO	48
2.2.1.	Biomarcadores de estrés oxidativo.....	50
2.2.1.1.	Radicales libres	50
2.2.1.2.	Otros oxidantes.....	50
2.2.1.3.	Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	51
2.2.1.4.	Peroxidación lipídica.....	53
2.2.1.5.	LDL oxidadas	55
2.2.1.6.	Proteínas nitrosiladas.....	56
2.2.1.7.	Mieloperoxidasa	56
2.2.1.8.	Proteína C reactiva	59
2.2.2.	Estrés oxidativo y enfermedad cardiovascular.....	60
2.2.3.	La función endotelial.....	60
2.3.	ANTIOXIDANTES	63
2.3.1.	Antioxidantes enzimáticos	63
2.3.1.1.	Superóxido dismutasa (SOD).....	63
2.3.1.2.	Catalasa y peroxidasas	64
2.3.1.3.	Glutation peroxidasas	65
2.3.1.4.	Tiol-disulfuro oxidorreductasas	65
2.3.1.5.	Peroxiirredoxinas.....	66

2.3.2.	Antioxidantes no enzimáticos	66
2.3.2.1.	Proteínas biológicas secuestradoras de hierro y cobre	66
2.3.2.2.	Hemo-oxigenasas	67
2.3.2.3.	Antioxidantes hidrosolubles	67
2.3.2.4.	Antioxidantes liposolubles	68
2.4.	APOLIPOPROTEÍNA D	69
2.4.1.	ApoD y el metabolismo lipídico	72
2.4.2.	Acciones vasculares de ApoD	73
2.4.3.	ApoD y estrés oxidativo	73
2.4.4.	ApoD y aterosclerosis	75
2.4.5.	ApoD en el sistema nervioso	75
2.5.	PARAOXONASA-1	76
2.6.	OSTEOPONTINA	77
2.6.1.	Osteopontina e inflamación	78
2.6.2.	Osteopontina y aterosclerosis	79
2.7.	APOLIPOPROTEÍNA A1 Y APOLIPOPROTEÍNA B	82
2.7.1.	Apolipoproteínas en suero	83
2.7.2.	Apolipoproteínas en la placa aterosclerótica	85
2.7.3.	ApoA1 e inflamación	86
2.8.	FOSFOLIPASA A2	88
2.8.1.	Fosfolipasa A2 como agente antioxidante	89
2.8.2.	Lp-PLA2 e inflamación	90
2.8.3.	Lp-PLA2 y aterosclerosis	90
2.8.4.	Lp-PLA2 como marcador de riesgo cardiovascular	94
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS	95
4.	OBJETIVOS	99
5.	MATERIAL Y MÉTODOS	103
5.1.	Diseño del estudio	105
5.2.	Sujetos incluidos en el estudio	105
5.2.1.	Pacientes intervenidos de endarterectomía carotídea	105
5.2.2.	Sujetos control	106
5.2.3.	Agrupación de pacientes	106
5.3.	Materiales y variables a estudio	107
5.3.1.	Historia clínica	107
5.3.2.	Determinaciones analíticas	108
5.3.2.1.	Medida de parámetros en suero	108

5.3.2.2.	Medida de parámetros en plasma.....	108
5.3.2.3.	Medida de parámetros en tejido.....	109
5.3.2.3.1.	Recogida y homogeneización del tejido.....	109
5.3.2.3.2.	Medida de Lípidos peroxidados (TBARS).....	110
5.3.2.3.3.	Medida de ApoD.....	111
5.3.2.3.4.	Medidas de expresión de genes.....	111
5.4.	Distribución de pacientes en base a las variables estudiadas.....	112
5.5.	Análisis estadístico.....	112
6.	RESULTADOS.....	115
6.1.	Estudio descriptivo de características demográficas.....	117
6.1.1.	Controles, Asintomáticos y Sintomáticos.....	117
6.1.2.	Controles y Enfermos.....	119
6.1.3.	Asintomáticos y Sintomáticos.....	120
6.2.	Estudio de variables analíticas medidas en suero o plasma.....	122
6.2.1.	Controles, Asintomáticos y Sintomáticos.....	123
6.2.2.	Controles y Enfermos.....	125
6.2.3.	Asintomáticos y Sintomáticos.....	128
6.3.	Estudio de variables en tejido.....	130
6.3.1.	TBARS.....	130
6.3.2.	ApoD.....	130
6.3.3.	Medida de expresión de genes.....	132
6.3.3.1.	Genes relacionados con el estrés oxidativo.....	132
6.3.3.2.	Gen de ApoD.....	141
6.3.3.3.	Gen de PON1.....	142
7.	DISCUSIÓN.....	143
7.1.	Características demográficas.....	145
7.2.	Variables analíticas medidas en suero o plasma.....	147
7.3.	Variables analíticas en tejido.....	152
8.	CONCLUSIONES.....	165
9.	BIBIOGRAFÍA.....	169
	ANEXO I.....	197

1. RESUMEN

La aterosclerosis es una patología importante en nuestro medio, cuyas consecuencias pueden suponer secuelas importantes e incluso la muerte. Por ello, es interesante profundizar en el conocimiento de la patogenia implicada en este proceso para poder tomar medidas en un estadio temprano de la enfermedad.

En el desarrollo del proceso aterosclerótico a todos los niveles, está presente el aumento del estrés oxidativo, que se define como el desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de neutralizar los productos intermedios altamente reactivos o de reparar el daño celular resultante. Los peróxidos y radicales libres producen un daño celular fundamentalmente a nivel de proteínas, lípidos y DNA. Las células presentan un entorno reductor gracias a las enzimas, que lo mantienen así a través de un gasto de energía metabólica constante.

Los pacientes con una estenosis carotídea mayor del 70% medido por Eco-doppler son sometidos a tratamiento quirúrgico debido al riesgo que supone dicha estenosis desde el punto de vista de complicaciones neurológicas. Dentro de estos pacientes encontramos dos grupos, los que ya presentan sintomatología neurológica y los que no. Hasta ahora en la literatura se habían estudiado en conjunto desde el punto de vista del estrés oxidativo. El objetivo fundamental del presente trabajo ha sido esclarecer estos niveles en los pacientes que presentan síntomas neurológicos con respecto a los que no presentan síntomas. De esta manera establecemos una relación entre el incremento de los niveles de oxidación en la placa y la aparición de sintomatología. Este incremento se debe valorar como un factor de riesgo predictor de sintomatología. De tal manera, se podría identificar aquellos pacientes con una estenosis significativa (con síntomas o sin ellos) susceptibles de tratamiento quirúrgico. Para ello consideramos fundamental medir los niveles de estrés oxidativo en el tejido carotídeo afectado por la placa de aterosclerosis, ya que si a ese nivel no hubieran existido diferencias tampoco las hubieramos hallado en plasma. En esta línea, también consideramos medir los niveles de estrés oxidativo a nivel plasmático. Aunque no hemos encontrado diferencias significativas, esto posiblemente sea debido a la reducida gama de marcadores que hemos utilizado o la interferencia con otras patologías.

Dada la relación del estrés oxidativo con el daño producido a nivel de los lípidos consideramos también realizar un estudio del perfil lipídico. Hemos encontrado en este

punto una disminución de los niveles de Apo A1 en pacientes sintomáticos con respecto a los asintomáticos. Este hallazgo no está descrito en la literatura y supone un importante avance a la hora de encontrar marcadores plasmáticos que diferencien estos grupos. De hecho, aunque ApoA1 no es considerado un marcador de oxidación podríamos considerarlo así ya que su expresión está modulada por los niveles de oxidación según algunos autores.

La mieloperoxidasa, marcador de inflamación que se eleva en situaciones de estrés oxidativo, resultó significativamente mayor en enfermos que en sanos, aunque entre sintomáticos y asintomáticos la diferencia no fue significativa.

Por otra parte, se han estudiado los niveles plasmáticos de osteopontina, que es una proteína que está presente en lesiones ateroscleróticas asociada con macrófagos y células espumosas, lo cual sugiere que participa en la progresión de la enfermedad, ya que permite diferenciar entre individuos sanos y pacientes afectados de aterosclerosis, en los cuales se encuentran valores más elevados.

El uso de antioxidantes para prevenir la aterosclerosis es controvertido. Sin embargo, parece que los niveles de antioxidantes alcanzados a nivel plasmático pueden tener cierta importancia en el mantenimiento del estado reductor.

La ApoD es una proteína implicada en el estrés oxidativo, de manera que aumenta su expresión ante patologías que cursan con aumento de niveles de oxidación, actuando como protector a nivel celular. Por esta razón, se ha estudiado tanto la presencia de esta proteína como la expresión del gen que codifica ApoD en tejido aterosclerótico de pacientes intervenidos de endarterectomía carotídea, con el fin de esclarecer si existen diferencias entre pacientes que presentan síntomas y aquellos que permanecen asintomáticos a pesar de presentar una estenosis suficientemente importante como para ser intervenidos.

Dentro del estudio de la expresión génica en tejido carotídeo, se incluye además el estudio de expresión de un conjunto de genes implicados en el estrés oxidativo, con el fin de describir diferencias entre los pacientes sintomáticos y asintomáticos. Es en este punto donde hemos encontrado diferencias significativas. Podemos afirmar que los

pacientes sintomáticos tienen menores niveles de expresión de aquellos genes que codifican proteínas protectoras frente al estrés oxidativo. Esto constituye un hecho novedoso y no descrito hasta la fecha en la literatura. De esta manera podemos decir que en el proceso patogénico de la enfermedad intervienen mecanismos que silencian estos genes, dando lugar a un aumento de los niveles de estrés oxidativo en la placa. La aparición de la sintomatología es por tanto un proceso consecuencia de este cese de expresión de genes protectores y de un aumento más o menos brusco de los niveles de oxidación sobre los niveles basales de estos enfermos (ya elevados sobre los controles). Este hallazgo es importante en la patogénesis de la enfermedad, pues constituye un punto de inflexión entre los mecanismos de defensa y los mecanismos de daño, produciendo un hecho relevante clínicamente como es la aparición de complicaciones neurológicas de la enfermedad.

De forma global podemos concluir que los pacientes con aterosclerosis carotídea poseen unos niveles más elevados de estrés oxidativo. Este aumento puede ser consecuencia de una menor ingesta de sustancias antioxidantes, lo que se demuestra por una menor concentración de estos metabolitos en suero, por una alteración a nivel de la expresión de genes antioxidantes o por una combinación de ambas situaciones. Si a los individuos enfermos los clasificamos como sintomáticos y asintomáticos podemos concluir que los sujetos sintomáticos tienen niveles más elevados de estrés oxidativo que los asintomáticos, al menos en tejido. Además, este aumento de los niveles de estrés oxidativo en tejido viene acompañado de la disminución de la expresión de genes que codifican proteínas protectoras frente al estrés oxidativo. Esto indica que existe algún mecanismo en la fisiopatología de la enfermedad que consigue silenciar estos genes permitiendo la progresión de la misma. Este es un hecho novedoso que pone de manifiesto la importancia de los niveles de estrés oxidativo en la fisiopatología de la enfermedad. A partir de aquí se pueden generar nuevas estrategias tanto preventivas como diagnósticas y terapéuticas.

2. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ATEROSCLEROSIS

La aterosclerosis es una causa importante de morbimortalidad en el mundo desarrollado. Se trata de un problema importante que se cobra más vidas que incluso los cánceres y que supone un gasto económico considerable (1,2). En sociedades occidentales llega a ser responsable de hasta un 50% de las muertes (3).

La aterosclerosis es un fenómeno complejo de formación de placa en vasos sanguíneos. Se caracteriza por el acúmulo de depósitos de colesterol en los macrófagos en arterias de mediano y gran calibre. Estos depósitos promueven la proliferación de ciertos tipos celulares en la pared arterial de manera que la luz del vaso se hace más estrecha al formarse una placa ateromatosa, lo que disminuye el flujo normal de la sangre. Los componentes químicos de la placa pueden inducir eventos ateroembólicos. Este proceso puede durar décadas, desde que aparece la lesión aterosclerótica hasta que los componentes de la pared arterial quedan expuestos al flujo sanguíneo y esto lleva a la trombosis y el compromiso de distribución de oxígeno por órganos como el corazón y el cerebro, lo cual lleva a sufrir un infarto en cualquiera de las localizaciones (1,4).

2.1.1. Patogénesis de la aterosclerosis.

Diversos estudios epidemiológicos revelan que existen importantes factores de riesgo ambientales y genéticos que se asocian a la aterosclerosis (3). Los factores que contribuyen a la patogénesis de la aterosclerosis se pueden clasificar en factores de riesgo no modificables, entre los cuales se encuentran la edad, sexo, raza y herencia, y factores de riesgo modificables, cuando una determinada acción terapéutica puede corregir o disminuir su intensidad.

FR No modificables	FR Modificables	Otros FR	
Edad	Obesidad	Lipoproteína (a)	Angiotensina II
Sexo	Sd. Metabólico	Disfunción endotelial	Endotelina-1
Raza	Hipertensión	Inflamación	Moléculas de adhesión
Herencia	Diabetes Mellitus	PCR	Ac anti-LDL oxidadas
	Dislipemia	Lp-PLA2	Daño en DNA mitoc
	Tabaco	Citoquinas	Características del flujo
	Sedentarismo	MMP-7	Rotura de la placa
	Dieta rica en grasas	Citoquinas	Homocisteinemia
	Niv ↓ antioxidantes	Activación de leucocitos	Apolipoproteína E
		Toll-like receptor 4	Infecciones
	Factor tisular		

Tabla 1. Factores de riesgo asociados a aterosclerosis.

Factores de riesgo no modificables:

- **Edad:** Es uno de los factores no modificables que tienen mayor poder predictivo acerca de la enfermedad cardiovascular. La magnitud exacta de la comparación del riesgo cardiovascular con la edad está documentada en el célebre Framingham Heart Study, en el cual se evaluaban los factores de riesgo con una puntuación de hasta 14 puntos para predecir el riesgo de enfermedad cardiovascular a los 10 años. De estos 14 puntos, hasta 7 se pueden atribuir sólo a la edad (1).
- **Sexo:** Muchos estudios han indicado un aumento de riesgo en el género masculino respecto al femenino. Se barajan como protectores los niveles más elevados tanto de estrógenos como de HDL (high-density lipoprotein) en las mujeres. Se constata un mayor riesgo cardiovascular en mujeres postmenopáusicas, sin embargo, hay estudios que no muestran efecto protector de los estrógenos administrados de forma exógena (1).
- **Raza:** La incidencia en afroamericanos es casi el doble que en individuos de raza blanca que viven en la misma región, siendo también mayor la mortalidad y dejando secuelas más graves (5).

- **Herencia:** Se ha observado mayor concordancia en el infarto cerebral en gemelos monocigotos (6). Así mismo, la historia familiar de ictus aumenta el riesgo de padecerlo (7).

Factores de riesgo modificables:

- **Obesidad:** Se entiende por obesidad un exceso de peso corporal con una proporción anormalmente elevada de grasa. Esta condición aumenta el riesgo de enfermedad cardiovascular, aunque la explicación no es demasiado clara ya que junto con la obesidad suelen coexistir otros factores de riesgo como son la hipertensión, niveles bajos de colesterol HDL y diabetes mellitus (1).
- **Síndrome metabólico:** Se trata de una asociación de obesidad, hipercolesterolemia, hipertensión y resistencia a la insulina, que se asocia con un riesgo incrementado de enfermedad cardiovascular (8).
- **Hipertensión:** Se define como una presión sistólica por encima de 140 mmHg o una presión diastólica por encima de 90 mmHg. La hipertensión se relaciona estrechamente con la edad, de forma que hasta el 75% de los mayores de 75 años pueden ser diagnosticados de hipertensión. Parece que la elevación de la presión sistólica y la incidencia de enfermedad aterosclerótica guardan una relación casi lineal (1). Se considera un factor de riesgo mayor para el desarrollo de aterosclerosis, particularmente en la región coronaria y cerebral (9). Al aumentar la tensión de la pared arterial favorece la disfunción de los sistemas de reparación y formación de aneurismas (10).
- **Diabetes mellitus:** Los diabéticos tienen un riesgo de aterosclerosis coronaria que llega a ser de 3 a 5 veces mayor que en población no diabética (1) debido a la dislipemia asociada a la diabetes (triglicéridos elevados, niveles bajos de colesterol HDL y elevados de colesterol LDL)(11). Los

niveles elevados de insulina favorecen el desarrollo de enfermedades arteriales. Los macrófagos expresan moléculas de señalización de la insulina excepto IRS1 y transportador de glucosa tipo 4. La insulina activa a los macrófagos a través de las vías IR/IRS2/PI3K/Akt. La insulina favorece la formación de células espumosas al incrementar la expresión de CD36 y disminuir la expresión de ABCA-1, lo cual favorece el acúmulo de colesterol en los macrófagos (12). En los diabéticos tipo 2 el mecanismo patológico es el mismo incluyendo la elevación de citoquinas proinflamatorias como MCP-1 e IL-6 (13). La diabetes suele asociarse a otros factores de riesgo como la hipertensión y la dislipemia. De estos factores que se asocian parece que la diabetes mellitus es la que más contribuye al aumento del riesgo cardiovascular.

- **Dislipemia:** Las alteraciones en los lípidos (colesterol total, LDL y triglicéridos) y lipoproteínas (lipoproteína(a)) se asocian a un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular y tienen un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis (14).

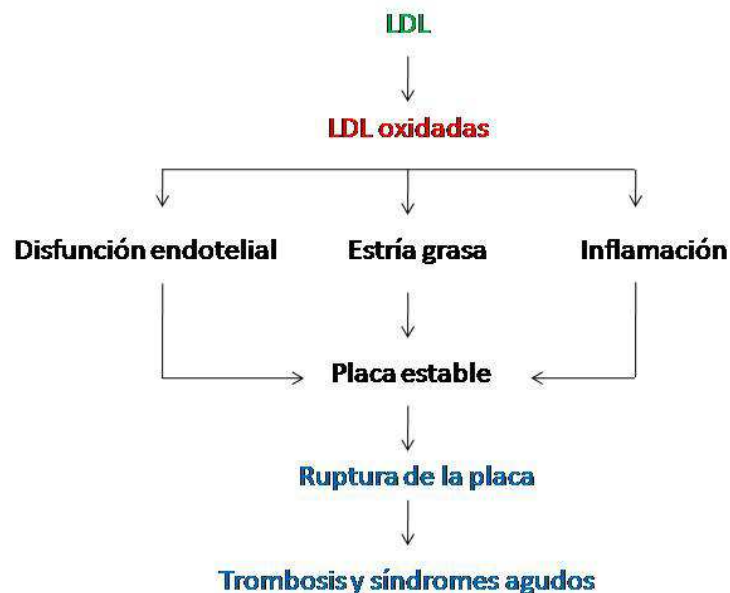


Figura 1. Representación esquemática de los efectos de LDL y LDL oxidadas en la patogénesis de la aterosclerosis. Existen otros factores que aumentan las LDL como niveles bajos de HDL, tabaco, hipertensión, diabetes mellitus y deficiencia estrogénica.

La asociación entre colesterol LDL y la aterosclerosis es clara (14,15) (15) e incluso está demostrada en la hipercolesterolemia familiar, donde el riesgo cardiovascular está aumentado sobre todo en sujetos homocigotos. En la población general se ha observado una disminución de las manifestaciones de aterosclerosis al disminuir los niveles de colesterol mediante terapia con estatinas, que son inhibidoras de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa y actúan disminuyendo los niveles de colesterol LDL. Las LDL se acumulan en los macrófagos enriquecidos en ésteres de colesterol formando las células espumosas para proteger al endotelio del daño que pueden producir las LDL oxidadas. Estas LDL deben estar previamente oxidadas para que los receptores (CD36 o también llamado *scavenger receptor B*) de los macrófagos puedan captarlas (16,17). Sin embargo, este acúmulo de colesterol en células espumosas hace que éstas sufran una disfunción mitocondrial que les lleve a la apoptosis y necrosis liberando proteasas, citoquinas inflamatorias y moléculas protrombóticas (18).

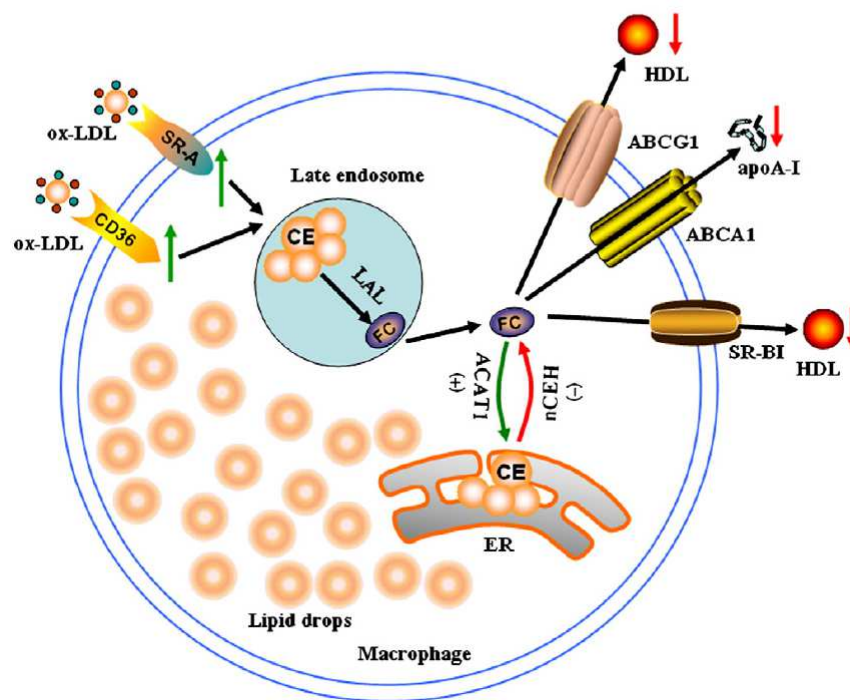


Figura 2. Representación esquemática de la formación de células espumosas (17).

Por otro lado, el colesterol HDL y la aterosclerosis guardan una relación inversa, que puede ser evidente de forma natural mediante la enfermedad de Tangier. Estos pacientes se caracterizan por la ausencia de colesterol HDL en sangre y en ellos se constata una enfermedad arterial coronaria prematura (1). El HDL tiene propiedades antiaterogénicas como el transporte reverso del colesterol, el mantenimiento de la función endotelial y la protección frente a la trombosis. En el estudio de Framingham se definió el HDL como un factor de riesgo negativo para la enfermedad cardiovascular, sin embargo, un aumento de HDL no parece reducir el número de eventos cardiovasculares (19).

La hipertrigliceridemia parece estar implicada en la aterosclerosis cuando los niveles en suero se encuentran por encima de 200 mg/dl pero no se ha podido confirmar debido a su asociación con niveles bajos de HDL (20).

- **Tabaco:** El hábito de fumar se considera un factor de riesgo mayor (9) y tiene impacto en diferentes fases de la aterosclerosis desde la disfunción endotelial hasta la aparición de eventos clínicos, ya que tiene un efecto protrombótico (10,21). El tabaco daña la vasodilatación dependiente de endotelio probablemente por un mecanismo de disminución de la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO)(22). Se asocia con un incremento de marcadores inflamatorios como la PCR, IL-6 y TNF- α (23). Otro efecto del tabaco es el incremento de la activación y adhesión plaquetaria debido al descenso de del NO y a la disminución de la sensibilidad de las plaquetas al mismo (24). Por otro lado, el tabaco aumenta la oxidación de las LDL (25) y disminuye la actividad plasmática de la paraoxonasa, que es una enzima que protege de la oxidación a las LDL (26). El tabaco se relaciona con una mayor incidencia de infarto de miocardio, incluso puede aumentar la enfermedad aterosclerótica en un 50%. El abandono del tabaco podría ser efectivo en cuanto a la disminución del riesgo de eventos cardiovasculares, ya que el riesgo de infarto de miocardio en ex-fumadores se aproxima al de no fumadores en un periodo de tan solo 2 años (1,27).

- **Sedentarismo:** Se asocia significativamente con la enfermedad cardiovascular independientemente de otros factores de riesgo. El ejercicio aeróbico reduce el riesgo cardiovascular. Los individuos que gastan de 2000 a 3000 kcal/semana en actividades de ocio tienen 2-3 veces menos eventos coronarios que los que gastan menos de 500 kcal/semana. El ejercicio regular hace que el cuerpo tenga menos grasa, mayores niveles de colesterol HDL, menores niveles de LDL y triglicéridos, mayor sensibilidad a la insulina, menores niveles de glucosa y menor presión arterial (27).

- **Dieta rica en grasas:** Estudios epidemiológicos y de migración de poblaciones indican que hay una fuerte asociación con el estilo de vida, siendo la dieta el factor más significativo. Las dietas ricas en grasas y colesterol son las que más predisponen al desarrollo de la aterosclerosis en experimentos animales (27).

- **Niveles bajos de antioxidantes:** Debido a la naturaleza inflamatoria de la aterosclerosis parece que las sustancias antiinflamatorias pueden tener un papel beneficioso para proteger la salud. Los carotenoides de la dieta tienen propiedades para eliminar radicales libres de forma que aumentan la resistencia a la oxidación de las LDL. Algunos carotenoides (α -caroteno, β -caroteno, luteína, zeaxantina, licopeno, astaxantina) pueden tener un efecto protector frente a la aterosclerosis temprana (28). Sin embargo, no está claro el papel de los suplementos de carotenoides respecto al riesgo cardiovascular ya que la literatura al respecto es contradictoria (29). Los suplementos de vitamina C y E se asocian con una disminución del riesgo cardiovascular (30)(31), sin embargo en ensayos randomizados no se ha constatado este beneficio (32)(33).

Otros factores de riesgo:

- **Lipoproteína (a):** Es una combinación de LDL con apolipoproteína a y mantiene un papel desconocido en la patogénesis de la aterosclerosis. Se localiza en placas ateroscleróticas y se une a macrófagos contribuyendo a la

formación de células espumosas (34). Además de su carácter aterogénico también se le atribuye una capacidad protrombótica (10).

- **Disfunción endotelial:** El endotelio constituye una barrera entre la sangre y tejidos subyacentes potencialmente trombogénicos, que modula el tono, crecimiento, homeostasis e inflamación del sistema circulatorio. La disfunción endotelial forma parte de uno de los estadios más precoces de la aterosclerosis y es causada principalmente por la disminución de óxido nítrico derivado del endotelio (35). La disfunción endotelial se asocia con otros factores de riesgo como hipercolesterolemia, diabetes, hipertensión y tabaco. Las LDL (low density lipoprotein) oxidadas inducen disfunción endotelial (36), por lo que se podría mejorar la función endotelial corrigiendo la hiperlipidemia bien con una dieta apropiada (37) o bien con terapia con estatinas (inhibidores de la HMG-coenzima A-reductasa) ya que incrementaría la biodisponibilidad del óxido nítrico (38).
- **Inflamación:** Existe evidencia clara de componentes inflamatorios en la histología de las lesiones ateroscleróticas (39). Las LDL oxidadas modifican los macrófagos y éstos liberan sustancias inflamatorias como citoquinas y factores de crecimiento (40). En este proceso se ha constatado la implicación de diversas moléculas como la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1), moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1), factores estimulantes de colonias de macrófagos y granulocitos, CD40 ligando, interleucinas (IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, IL18) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) (41)(42)(43).
- **Proteína C reactiva (PCR) sérica:** Es una proteína de fase aguda producida fundamentalmente por los hepatocitos a través del estímulo de ciertas citoquinas como la IL-6 y el TNF- α (44). Participa en la progresión de la aterosclerosis y sus consecuencias clínicas aunque no se ha establecido una relación causal. Se ha encontrado PCR en lesiones ateroscleróticas, se une a las LDL, lo cual permite que sean fagocitadas por los macrófagos sin necesidad de ser modificadas (45). Los valores elevados de PCR se asocian con elevación de marcadores de inflamación (IL-6, IL-8, amiloide sérico A)

y de coagulación (factor von Willebrand, protrombina F1+2, dímero D, inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1). Además, la PCR induce la expresión de moléculas de adhesión y la producción de IL-6 y MCP-1 en el endotelio humano, lo cual atrae a macrófagos y linfocitos aumentando la respuesta inflamatoria en la placa aterosclerótica (46,47).

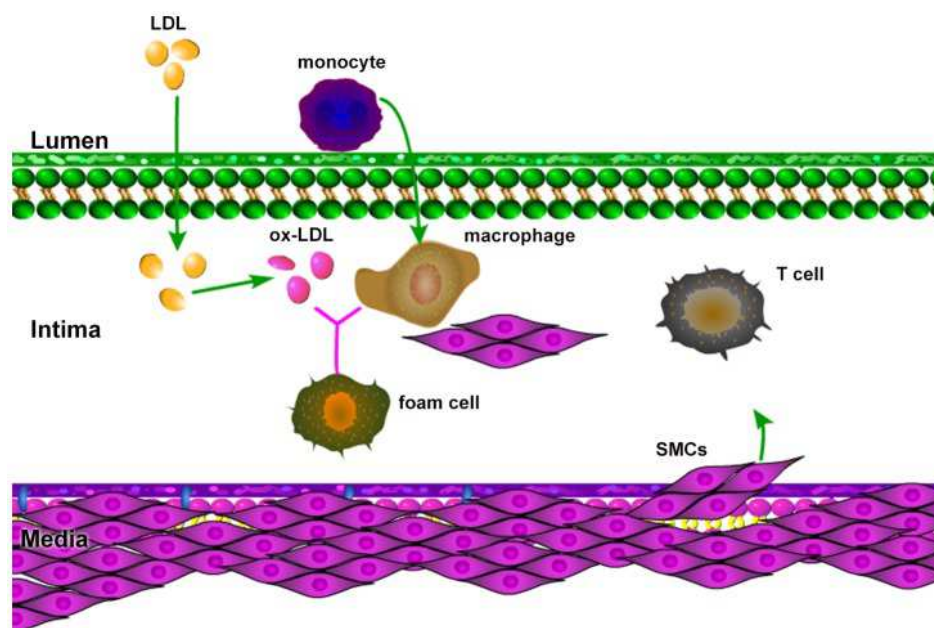
- **Fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína (Lp-PLA2):** Es una enzima secretada por macrófagos, que está asociada a lipoproteínas y que mantiene la inflamación en la placa. Es un marcador inflamatorio emergente. Los valores elevados de esta enzima se relacionan con un incremento del riesgo cardiovascular. La recomendación actual de la determinación de Lp-LPA2 se basa en la identificación de personas que tienen un riesgo incrementado de infarto de miocardio en individuos de riesgo moderado o severo (48–50).

- **Citoquinas:** La liberación de citoquinas proinflamatorias está promovida por la modificación de las LDL, la formación de radicales libres, el estrés hemodinámico, la hipertensión y la infección. Las citoquinas IL-1 y TNF- α tienen efectos aterogénicos, favorecen la expresión de selectinas y moléculas de superficie como ICAM-1, VCAM-1, CD40, CD40 ligando y estimulan la proliferación de células musculares lisas y macrófagos. Las citoquinas proinflamatorias también contribuyen a la producción de especies reactivas de oxígeno, estimulan a las metaloproteinasas de la matriz e inducen la expresión de factor tisular (41). Las citoquinas CCL19 y CCL21 están aumentadas en la aterosclerosis carotídea. CCL21 promueve la acumulación de lípidos en macrófagos y LLC19 induce a la proliferación y expresión de metaloproteinasa-1 de la matriz (MMP-1) en células musculares lisas de los vasos contribuyendo así al potencial aterogénico de las citoquinas (51). Sin embargo, existen también interleucinas antiaterogénicas como la IL-4 o la IL-10 (52).

- **Metaloproteinasa-7 de la matriz (MMP-7):** La MMP-7 puede contribuir a la inestabilidad de la placa en aterosclerosis carotídea, ya que se encuentra elevada en pacientes con síntomas recientes. Se encuentra elevada en suero

y en macrófagos en la inmunohistología de la placa. Parece que el $\text{TNF-}\alpha$, la hipoxia y las LDL oxidadas incrementan la expresión de MMP-7 (53).

- **Activación de leucocitos:** Se aprecia un reclutamiento de leucocitos en las lesiones tempranas de aterosclerosis, por lo que deben tener una implicación en estas lesiones relacionada con la inflamación (54). Parece que también hay un incremento en la cantidad de RNA mensajeros inflamatorios en personas con disfunción cardiovascular que ha sufrido infarto de miocardio (55).



L F

Figura 3. La presencia de LDL oxidadas en la íntima estimula la migración de monocitos desde el lumen hacia la íntima (56).

- **Toll-like receptor 4:** Es un receptor celular implicado en la respuesta inflamatoria frente a patógenos gram negativos y posiblemente frente a otros ligandos. Un polimorfismo de este receptor, concretamente el Asp299Gly, parece estar relacionado con niveles inferiores de marcadores inflamatorios, como son la PCR, moléculas de adhesión e IL-6 y, por tanto, una incidencia menor de aterosclerosis carotídea detectada por ultrasonografía. Además, está relacionado con un incremento de infecciones

bacterianas serias al disminuir la respuesta inflamatoria frente a patógenos gram negativos (57).

- **Factor tisular:** Es el factor iniciador de la coagulación y se encuentra en placas de aterosclerosis avanzada. El factor tisular incrementa la actividad plaquetaria y puede contribuir así al desarrollo de trombosis seguida de rotura de la placa. Una sobreexpresión de este factor favorece el crecimiento de la placa tras una primera rotura al incrementar el trombo mural y la migración de células musculares lisas, lo cual acelera el nuevo crecimiento del endotelio (58).

- **Angiotensina II:** El incremento de la angiotensina II en plasma favorece el desarrollo de la aterosclerosis, sobre todo si se asocia con hiperlipidemia. Es capaz de modular la proliferación de células musculares lisas vasculares y la producción de matriz extracelular (58,59).

- **Endotelina-1:** Es un potente vasoconstrictor y estimula el crecimiento y migración de células musculares lisas, por lo que puede contribuir a la patogénesis de la aterosclerosis incluso cuando la placa es imperceptible. Las LDL pueden estimular la producción de endotelina-1, que se encuentra en espacio intra y extravascular en el tejido aterosclerótico y desde aquí puede ser liberada en situaciones de estrés (60,61).

- **Moléculas de adhesión:** Las moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) y de adhesión celular vascular (VCAM-1) son glicoproteínas del endotelio cuya inducción está regulada por la inflamación y favorecen la adherencia de leucocitos al endotelio. Las ICAM-1 se encuentran en células endoteliales de arterias normales aunque en mayor cantidad cuando existe lesión aterosclerótica, mientras que VCAM-1 sólo se expresa cuando hay inflamación en los microvasos de las lesiones ateroscleróticas (62).

- **Anticuerpos anti-LDL oxidadas:** Estos anticuerpos se localizan en placas y plasma de pacientes con aterosclerosis. Se elevan durante el mes siguiente

a la presentación de un síndrome coronario agudo y se mantienen más elevados en enfermedad coronaria crónica que en pacientes con arterias normales. Las LDL oxidadas al favorecer la disfunción endotelial provocan cambios inflamatorios e inmunológicos a través de la liberación de citoquinas por parte de macrófagos, de producción de anticuerpos y del incremento de la agregación plaquetaria. Esto puede contribuir a la inestabilidad de la placa (63).

- **Daño en DNA mitocondrial:** Parece estar relacionado con la progresión y rotura de la placa de ateroma de forma independiente de las especies reactivas de oxígeno a través de efectos ejercidos sobre las células musculares lisas. En el ensayo VIVA (*Virtual Histology in Vulnerable Atherosclerosis*) se observó asociación entre DNA mitocondrial de leucocitos y vulnerabilidad de la placa. Las lesiones en DNA mitocondrial se asocian únicamente al fibroateroma de cápsula fina, que son los que se relacionan con alto riesgo de eventos cardiovasculares (64–67).

- **Características del flujo:** Las placas de ateroma son más frecuentes en bifurcaciones y ramas de arterias, lo que sugiere que un flujo alterado y en cizalla o turbulento puede contribuir al desarrollo de la aterosclerosis. Un flujo laminar desestructurado da lugar a un flujo turbulento que puede alterar la función celular endotelial, siendo menos probable dañar las interacciones entre leucocitos y pared del vaso y, por tanto, promocionando la unión de monocitos y acumulación y modificación de LDL. Estos cambios tienen lugar por la liberación de NO por parte de las células endoteliales (68). Por otro lado, una tensión hemodinámica de cizallamiento se asocia a un incremento en el grosor de la íntima-media de la arteria carótida (69).

- **Rotura de la placa:** La aterosclerosis generalmente es asintomática hasta que la estenosis por el crecimiento de la placa supera el 70-80% de la luz del vaso, lo cual produce una reducción del flujo. Sin embargo, los síndromes coronarios agudos y los cerebrovasculares pueden ocurrir con roturas de placas de menos del 50% de estenosis. Aunque la rotura de la placa puede

cursar también de forma asintomática, la lesión reiterada suele provocar un remodelado arterial patológico, hacer que progrese el grado estenótico o conducir a la trombosis arterial (70,71).

- **Homocisteinemia:** Niveles elevados de homocisteína se asocian con una aparición más temprana de la enfermedad aterosclerótica. Se piensa que promueve la proliferación e inflamación de la pared arterial e incrementa los niveles de inhibidor del activador de plasminógeno. Un exceso de homocisteína lleva al engrosamiento de los vasos, estenosis de la luz y formación de trombos (72).

- **Apolipoproteína E:** La influencia de los fenotipos de apolipoproteína E en la enfermedad cardiovascular y el infarto isquémico es variable. Esta apolipoproteína es un ligando para los quilomicrones hepáticos, los receptores de VLDL remanentes y receptores LDL, con lo que al unirse a estas moléculas favorece el aclaramiento de las mismas de la circulación. El alelo APOE e4 se ha mencionado en algunos estudios como factor de riesgo de infarto cerebral (73) mientras que en otros estudios no ha sido así (74,75).

- **Infecciones:** Se ha asociado la aterosclerosis con infecciones crónicas como *Chlamydia pneumoniae* (76), *Citomegalovirus* (77) y *Helicobacter pylori* (78). También se han visto implicados algunos enterovirus (virus *Coxsackie B*), virus de la hepatitis A, virus herpes simple tipo 1 y tipo 2 (79).

2.1.2. Aspectos morfológicos de la aterosclerosis.

2.1.2.1. Estructura de la pared arterial normal.

La pared arterial normal consta de tres capas concéntricas bien definidas que rodean la luz vascular. La capa más próxima de la luz es la íntima, seguida de la media y ambas envueltas por la adventicia. Entre las capas se encuentra la

elastina, separando la íntima y la media encontramos la lámina elástica interna y entre la media y la adventicia se encuentra la lámina elástica externa.

En la íntima, la luz arterial está revestida por una línea de células endoteliales. Estas células regulan ciertos procesos entre los que se incluyen la trombosis, el tono vascular y el paso de leucocitos.

La media está constituida principalmente por células musculares lisas dispuestas en capas, cuyo número depende del grosor de la arteria. La matriz extracelular está constituida por fibras elásticas y colágeno, junto con cierta cantidad de proteoglicano que se encarga de mantener las fibras elásticas unidas.

La adventicia consiste en una amplia matriz de elastina, células musculares lisas, fibroblastos y colágeno. Los impulsos nerviosos sobre los vasos sanguíneos suelen atravesar hasta la adventicia. Se considera una capa inactiva respecto a la homeostasis vascular, sin embargo, parece que a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), puede tener un papel importante controlando el remodelado vascular y la bioactividad del óxido nítrico (NO)(1,3).

2.1.2.2. Estadios de la placa aterosclerótica.

La aterosclerosis se manifiesta como lesiones arteriales conocidas como placas. Estas placas se han clasificado en función del desarrollo de la enfermedad. (80,81) La *American Heart Association* (AHA) propuso en 1994 un sistema de estadificación de la placa aterosclerótica en función de su estructura y composición histológica.

Grado (AHA)	Criterios	Comentarios y clasificación
0	Arteria normal, con/sin engrosamiento de la íntima	Tejido normal
1	Células espumosas aisladas, no lípidos extracelulares, variaciones adaptativas de la íntima	Lesión aterosclerótica inicial, a veces visible con tinción para lípidos
2	Numerosas células espumosas, frecuentemente en capas, no acúmulos de lípidos extracelulares, engrosamiento adaptativo de la íntima	Estrías lipídicas, visible con tinción III
3	Numerosas células espumosas con acúmulos de lípidos extracelulares, no núcleos definidos de lípidos extracelulares	Placa grasa, estrías lipídicas elevadas, lesión intermedia o lesión de transición
4	Numerosas células espumosas y núcleos bien definidos de lípidos extracelulares, con superficie de la íntima relativamente normal	Ateroma, placa fibrosa o lesión elevada
5	Numerosas células espumosas, núcleos múltiples bien definidos de lípidos extracelulares, cápsula fibrosa reactiva, vascularización o calcio	Fibroateroma, placa fibrosa o lesión elevada
6	Todas las anomalías de superficie anteriores, hematoma, hemorragia o trombosis	Lesión complicada

Tabla 2. Criterios de clasificación de lesiones de la pared arterial según la *American Heart Association* (AHA).

Nomenclature and main histology	Sequences in progression	Main growth mechanism	Earliest onset	Clinical correlation
Type I (initial) lesion isolated macrophage foam cells	<pre> graph TD I((I)) --> II((II)) II --> III((III)) III --> IV((IV)) IV --> V((V)) V --> VI((VI)) V --> IV VI --> V </pre>	growth mainly by lipid accumulation	from first decade	clinically silent
Type II (fatty streak) lesion mainly intracellular lipid accumulation			from third decade	
Type III (intermediate) lesion Type II changes & small extracellular lipid pools				
Type IV (atheroma) lesion Type II changes & core of extracellular lipid		accelerated smooth muscle and collagen increase	from fourth decade	clinically silent or overt
Type V (fibroatheroma) lesion lipid core & fibrotic layer, or multiple lipid cores & fibrotic layers, or mainly calcific, or mainly fibrotic				
Type VI (complicated) lesion surface defect, hematoma-hemorrhage, thrombus		thrombosis, hematoma		

Figura 4. Esquema de la evolución y progresión de las lesiones ateroscleróticas humanas, indicando la nomenclatura y cambios histológicos (80).

En localizaciones propensas, el primer cambio histológico es el engrosamiento de la íntima, con un incremento de células musculares lisas y matriz extracelular, lo que se denomina **grado 1**. En las lesiones de **grado 2** se acumulan tanto lípidos extracelulares como intracelulares. Los macrófagos acumulan lípidos intracelulares (conocidos como "células espumosas"), sobre todo colesterol-LDL, que junto con un número variable de linfocitos T forman las "estrías grasas". La continua formación de células espumosas y necrosis de macrófagos es lo que da lugar a las lesiones de **grado 3**, que contienen pequeños depósitos extracelulares de lípidos (ésteres de colesterol).

La evolución de las lesiones se caracteriza por áreas de lípidos extracelulares más extensas que forman el núcleo o core de la lesión aterosclerótica. Las lesiones de **grado 4** se caracterizan por la separación relativa de una fina capa de tejido cercano a la luz debido a la interposición del núcleo

lipídico. En las lesiones de **grado 5** esta capa que ha quedado separada se fibrosa. Esta cápsula puede ser relativamente acelular (formada por colágeno denso) o puede tener abundantes células lisas. A medida que se desarrolla la placa, adquiere su propia red microvascular (*vasa vasorum*), que se extiende desde la adventicia, atraviesa la media y llega hasta la íntima engrosada. Estos vasos de pared fina son propensos a la rotura, originando una hemorragia en el interior de la placa. Las lesiones de **grado 6** tienen una estructura caracterizada por áreas de fibrosis calcificadas, formadas por acumulación de tejido conectivo con un incremento de células musculares lisas llenas de lípidos y frecuentemente con lípidos extracelulares, con zonas de ulceración visible. Estos tipos de lesiones se asocian frecuentemente con síntomas o con embolizaciones (1,3,82,83).

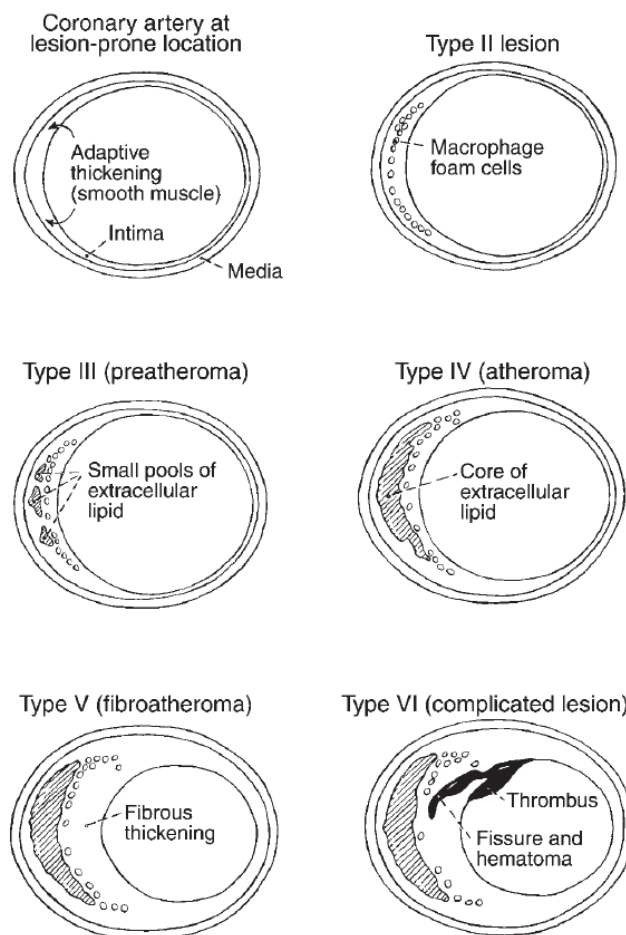


Figura 5. Cortes mostrando las características morfológicas de los distintos tipos de lesiones en arteria (80).

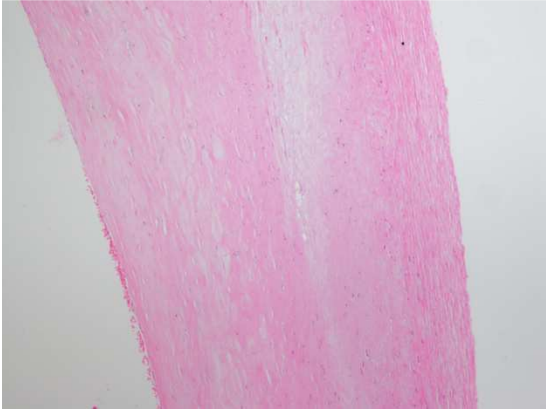


Imagen 1. Placa aterosclerótica fibrosada. H/E. 10X.

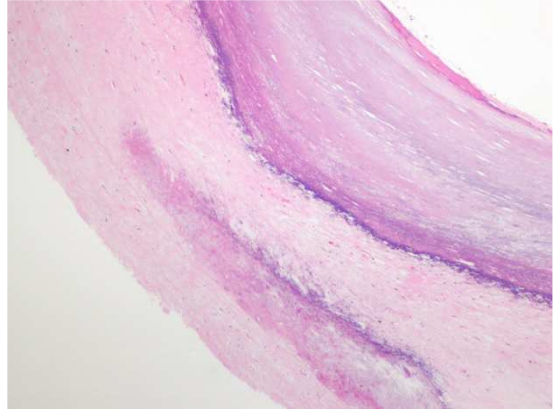


Imagen 2. Placa aterosclerótica calcificada. H/E. 10X.

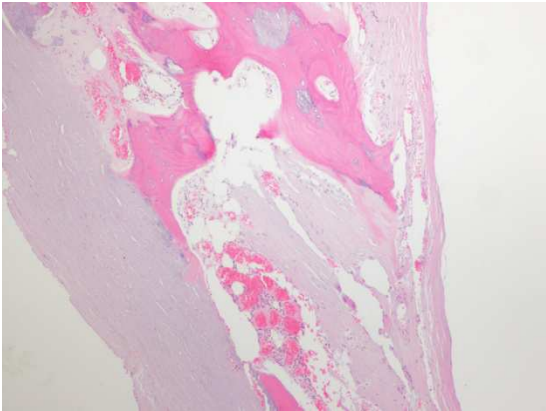


Imagen 3. Placa aterosclerótica osificada. H/E. 10X.

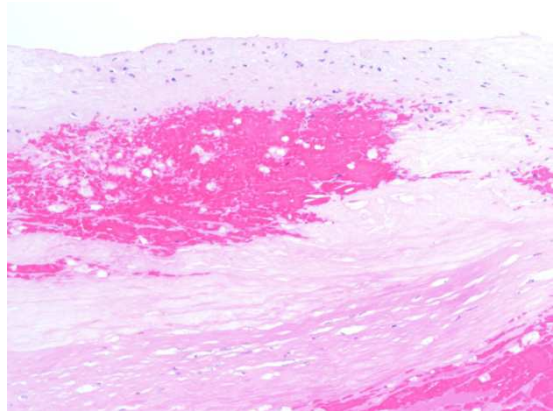


Imagen 4. Placa inestable con hemorragia intraplaca. H/E. 10X.

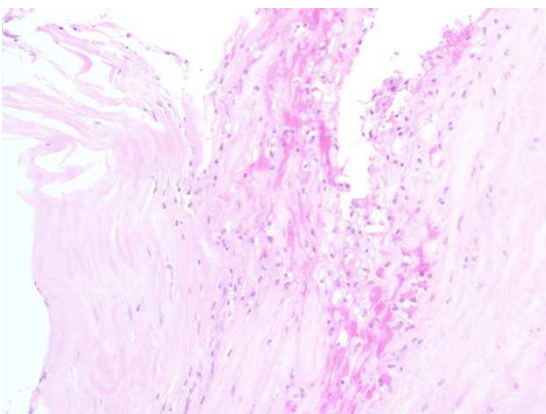


Imagen 5. Placa que ha sufrido rotura, en la que se observan abundantes histiocitos y tejido necrótico con reacción inflamatoria. H/E. 40X.

2.1.2.3. Vulnerabilidad de la placa.

La rotura de las placas está implicada en la aparición de manifestaciones clínicas (84), por ello, se pueden clasificar las placas maduras en estables e inestables. Una placa estable se caracteriza por un núcleo lipídico pobre en ésteres de colesterol, una cápsula fibrosa gruesa rica en células musculares lisas y matriz extracelular y escaso infiltrado inflamatorio, mientras que una placa inestable o vulnerable contiene mayor concentración de lípidos en el núcleo, con una cápsula fibrosa fina y gran componente inflamatorio constituido por macrófagos, linfomonocitos y células T (1,85). Además, la placa vulnerable expresa mayor cantidad de marcadores como la calprotectina, citoquinas inflamatorias, y apoptosis de células de la íntima que conducen al aumento del núcleo necrótico en la placa (86). Esta estructura hace que las placas vulnerables sean más propensas a la rotura en respuesta a fuerzas físicas del flujo sanguíneo (85). La vulnerabilidad de la placa está influenciada por aspectos morfológicos como la geometría de la placa, el grosor de la cápsula fibrosa, la neovascularización, la proliferación de células musculares lisas, la hemorragia intraplaca y la erosión endotelial (87–89). Por otro lado, también influyen los mecanismos bioquímicos, como la inflamación y el estrés oxidativo, y las fuerzas hemodinámicas locales que se ejercen sobre la placa, como la tensión hemodinámica de cizallamiento y la presión local (90). La ulceración de la placa de carótida y la rotura suele afectar al lado proximal de la placa, donde el flujo turbulento es máximo (91).

El estrés oxidativo y particularmente la peroxidación de lipoproteínas de baja densidad que contienen ácido araquidónico y linoleico, participa en el desarrollo de la aterosclerosis y favorece la inestabilidad de la placa (92). La inflamación es otro factor que contribuye a la rotura de la placa, ya que en la zona de erosión de la placa existe un acúmulo de monocitos activados y macrófagos y en menor medida de células T. La inflamación es mayor en las placas sintomáticas que en las asintomáticas.

La ulceración de la placa es un acontecimiento que desencadena síndromes coronarios agudos y esto mismo podría ocurrir con las placas carotídeas. La rotura de la placa es más frecuente en pacientes sintomáticos (93).

La hemorragia intraplaca es otro marcador de riesgo sintomático. La prevalencia de la hemorragia intraplaca es mayor en pacientes con estenosis carotídea cuando los pacientes son estudiados próximos a un evento sintomático, por tanto, la hemorragia está relacionada con la producción de síntomas, bien sea infarto o ataque isquémico transitorio en pacientes con enfermedad aterosclerótica carotídea (94,95). La hemorragia intraplaca también predice la recurrencia de eventos isquémicos ipsilaterales e infarto en pacientes sintomáticos con estenosis carotídea mayor o igual al 50% (96). Sin embargo, la hemorragia intraplaca es un hallazgo común en placas severas asintomáticas que han sido extraídas por endarterectomía carotídea y no se diferencia de aquellas que habían sido sintomáticas (97). La presencia de émbolos en pacientes con placas asintomáticas tiene más riesgo de sufrir síntomas en un futuro.

2.1.3. Manifestaciones clínicas de la aterosclerosis.

La clínica de estenosis carotídea se caracteriza por un soplo en la región carotídea y síntomas de isquemia cerebrovascular, aunque no es infrecuente encontrar pacientes asintomáticos.

El soplo carotídeo en pacientes asintomáticos es un mal predictor de la presencia de estenosis carotídea, así como los soplos oculares y asimetrías en pulsos faciales (98). En pacientes sintomáticos el soplo carotídeo no es suficiente para predecir una estenosis severa, aunque sí es útil para seleccionar los pacientes en los que hay que realizar un cribaje diagnóstico (99).

Las manifestaciones clínicas de la oclusión de la arteria carótida interna son las más diversas de todos los síndromes cerebrovasculares. Esta variabilidad se relaciona fundamentalmente con tres factores: la circulación colateral, la vasorreactividad cerebral con sus factores hemodinámicos y las características

de la oclusión. Los mecanismos de compensación de la oclusión de la arteria carótida interna están influenciados por los factores de riesgo preexistentes en el individuo. La aterosclerosis carotídea se suele situar en la bifurcación carotídea y predominantemente implica la pared posterior del vaso. El vaso va reduciendo su diámetro a medida que crece la placa y progresivamente el componente aterotrombótico se desarrolla en la pared. Por tanto, el mecanismo de isquemia cerebral puede ser un émbolo del material trombótico o una disminución del flujo debido a la estenosis acompañada de una compensación colateral inadecuada (84,100). Por otro lado, tras un evento agudo, la evolución clínica en un paciente con oclusión crónica de la carótida interna es muy variable, desde mantenerse asintomático hasta sufrir ataque isquémico transitorio (AIT) o infartos mayores o menores (100).

Ataque isquémico transitorio (AIT): Puede ser debido a un bajo flujo sanguíneo o a un émbolo. Cuando los AIT se deben a un bajo flujo con inadecuada circulación colateral (hipoperfusión hemodinámica), se trata de eventos breves, repetitivos y estereotipados y suelen anunciar futuros infartos en el territorio de la arteria carótida interna (101,102). Sin embargo, cuando los AIT son de naturaleza embólica suelen ser únicos y más prolongados y los síntomas se relacionan con el territorio vascular correspondiente. En la mayoría de los casos, un evento embólico-isquémico relacionado con la estenosis de la arteria carótida produce síntomas en el territorio de la arteria cerebral media aunque también puede estar implicada la arteria cerebral anterior. El término amaurosis fugax define una ceguera monocular transitoria causada por un pequeño émbolo en la arteria oftálmica.

Oclusión total de la arteria carótida: Cuando la arteria carótida se ocluye completamente puede causar un efecto de disminución del flujo o un evento embólico-isquémico dependiendo del desarrollo de la circulación colateral a través de la órbita y el polígono de Willis. El mayor riesgo de un AIT o un infarto por bajo flujo es el tiempo que dura la oclusión y el riesgo de repetición disminuye tras el primer año. Sin embargo, existe un infarto retardado que ocurre varios meses tras la oclusión de la carótida, presumiblemente debido

a la propagación del trombo o a la embolización de la porción distal del coágulo (103–106).

Una alteración en la función hemodinámica cerebral es un factor importante en la aparición de síntomas e infartos en pacientes con estenosis carotídea. El pronóstico de estos pacientes tras un infarto debido a oclusión carotídea se relaciona con el desarrollo del flujo colateral (106). Los pacientes sintomáticos tienen una reserva de flujo cerebrovascular más alterada (cambios en la velocidad de flujo en arterias cerebrales basales medidos por Doppler CO₂) que en los pacientes asintomáticos (107). Sin embargo, los pacientes con estenosis carotídea severa asintomática y una reactividad cerebrovascular alterada también tienen un riesgo aumentado de sufrir eventos isquémicos ipsilaterales (108).

2.1.4. Evaluación de la estenosis carotídea. Métodos diagnósticos.

Se define estenosis carotídea sintomática o asintomática dependiendo de si existen o no signos o síntomas de isquemia en el territorio carotídeo. La detección de infartos silentes con tomografía computerizada (TC) o con resonancia magnética (RMN) permite clasificar la estenosis como sintomática, aunque no hayan dado síntomas clínicos aparentes. La evidencia de signos o síntomas isquémicos en el territorio de la carótida interna es decisiva para el manejo y tratamiento de estos pacientes.

Actualmente se utilizan tres métodos (NASCET, ECST y CC) para medir la estenosis carotídea con angiografía convencional con contraste, aunque estos métodos se pueden utilizar también con angioRMN y angioTC.

El método NASCET (*North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial*) mide el diámetro residual de la luz en la porción más estenótica del caso y la compara con el diámetro de la luz de la arteria carótida interna distal a la estenosis (109).

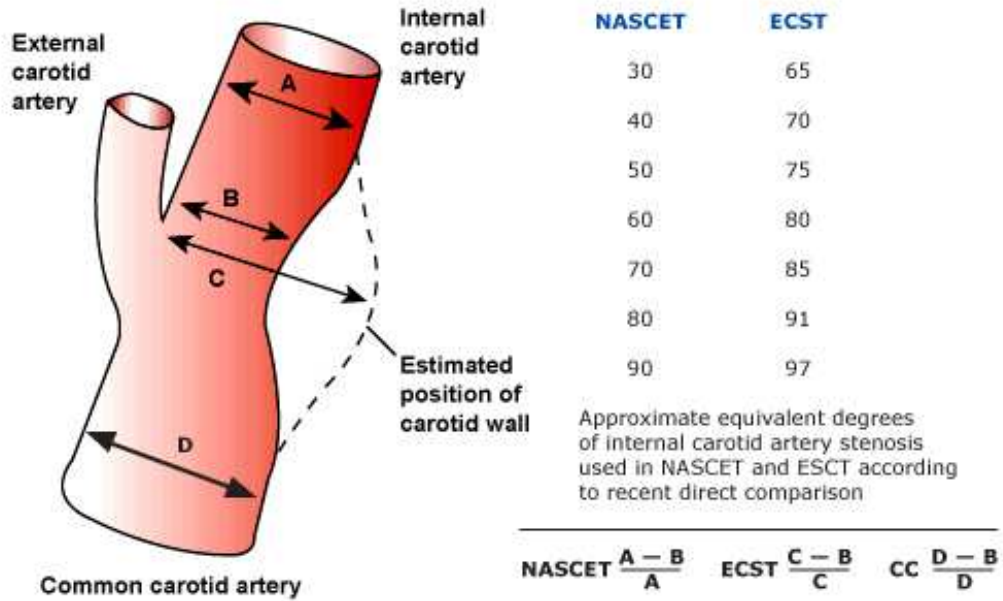


Figura 6. Métodos de medida de estenosis carotídea en NASCET y ECST (110).

El método ECST (*European Carotid Surgery Trial*) mide el diámetro de la luz en la porción más estenótica del vaso y la compara con el diámetro original estimado en esa zona de máxima estenosis (111).

El método CC (*Common Carotid*) mide el diámetro residual de la luz en la porción más estenótica del vaso y lo compara con el diámetro de la luz de la arteria carótida común proximal (112).

La estenosis máxima generalmente se encuentra situada en el bulbo carotídeo, que es una porción más ancha que el segmento distal de la arteria. El mismo grado de estenosis puede ser cuantificado con un mayor porcentaje de estenosis con los métodos ECST y CC que con el método NASCET. Otro inconveniente del método ECST es que asume una estimación de la verdadera medida de la luz, lo cual incrementa el riesgo de variabilidad interobservador. A pesar de estas diferencias se ha estimado una relación lineal entre los métodos para que los valores medidos tengan un valor pronóstico similar (113,114).

Se utilizan cuatro modalidades para visualizar la imagen de la arteria carótida interna: la ultrasonografía dúplex (Eco-Doppler), la angiografía cerebral convencional, la angio-resonancia magnética nuclear (angio-RMN) y la angio-tomografía axial computarizada (angio-TAC).

2.1.4.1. Eco-Doppler carotídeo.

El eco-doppler (ultrasonografía dúplex) utiliza ultrasonidos modo-B para caracterización morfológica de la placa y Doppler para detectar la velocidad del flujo sanguíneo, lo cual puede ser indicativo del grado de estenosis (115). La velocidad durante el pico sistólico es la medida más utilizada para estimar la severidad de la estenosis, aunque la velocidad al final de la diástole, la configuración del espectro y el índice carotídeo (ratio de velocidad en arteria carótida interna y velocidad en arteria carótida común) aportan información adicional (116). Se trata de una técnica no invasiva, segura y relativamente barata para evaluar las arterias carótidas, con una sensibilidad del 81-98% y una especificidad del 82-89% en la detección de estenosis significativa en la arteria carótida interna (115,117).

Atendiendo a las características morfológicas ultrasónicas, se pueden describir distintos tipos de placas, siendo la clasificación definida por Gray-Weale (118) la más frecuentemente utilizada. Las placas con eco-doppler se clasifican en cuatro tipos:

Tipo I: Predominantemente ecolucente.

Tipo II: Principalmente ecolucente pero con áreas ecogénicas.

Tipo III: Principalmente ecogénica pero con áreas ecolucentes.

Tipo IV: Uniformemente ecogénica.

Existe un Tipo V reservado para aquellas placas mal visualizadas o muy calcificadas. Utilizando esta clasificación se ha conseguido establecer que los pacientes sintomáticos tienen una mayor prevalencia de placas tipo I y II, mientras que los asintomáticos la tienen de los tipos III y IV. Sin embargo, puede que la visualización sea mala o que se trate de placas difíciles de clasificar entre tipo II y II, por ello se aconseja describir completamente las características

de la placa y utilizar la clasificación de Gray-Weale sólo de forma complementaria (119).

A parte del carácter eco o anecogénico, el eco-doppler aporta información sobre la superficie de la placa, distinguiendo entre superficie irregular, más asociada con infartos cerebrales de origen embolígeno (placas ulceradas) y superficie regular o lisa, más relacionada con infartos de características hemodinámicas (120).

La placa también puede clasificarse en homogénea o heterogénea. Una placa heterogénea se compone de una mezcla de lesiones hipoecogénicas, isoecogénicas e hiperecogénicas, mientras que una placa homogénea contiene un solo tipo de estas lesiones. Una placa isoecogénica se define como aquella que tiene una ecogenicidad igual que el complejo íntima-media normal, mientras que la placa hiperocogénica es más clara y la hipoecogénica es menos clara que la isoecogénica (121).

2.1.4.2. Doppler Transcraneal

El doppler transcraneal se puede utilizar como complemento para examinar las arterias intracerebrales a través de la órbita y la ventana temporal en la base del cerebro. El Doppler transcraneal evalúa la repercusión de la estenosis de la arteria carótida interna, pudiendo identificar patrones de desarrollo de un flujo colateral en el polígono de Willis, un flujo reverso en las arterias oftálmica y cerebral anterior, ausencia de flujo en el sifón carotídeo u oftálmico o reducción de la pulsatilidad o velocidad del flujo en la arteria cerebral media (122,123).

Otras modalidades de ultrasonografía carotídea consiste en la utilización de eco-contrastes. Se trata de la perfusión endovenosa de microburbujas que pueden ser útiles para evaluar la neovascularización de la placa, como posible marcador de inestabilidad, o servir de ayuda para distinguir la oclusión casi total de la arteria carótida (124–126). Los ultrasonidos 3D representan un avance diagnóstico que aporta una visualización mejorada de la anatomía. Aunque aún

no se utilizan de rutina, permite identificar mejor los cambios de volumen en la placa en cuanto a grosor, longitud y amplitud (127).

2.1.4.3. Angiografía cerebral convencional.

La angiografía cerebral es el *gold standard* para objetivar en imágenes las arterias carótidas. El desarrollo de la angiografía con sustracción digital intraarterial (DIVAS) reduce la dosis del contraste, permite utilizar catéteres de luz más pequeña y acorta la duración del procedimiento. Aunque la resolución espacial es baja, el DIVAS ha reemplazado a la angiografía convencional (128). La angiografía cerebral permite evaluar todo el sistema de la arteria carótida obteniendo información de la localización y característica de la placa y la circulación colateral, así como de la presencia de enfermedad aterosclerótica intracraneal, lo cual ayuda a identificar a los pacientes que más se pueden beneficiar de la endarterectomía carótida (129).

2.1.4.4. Angio-Resonancia Magnética.

La angio-RMN es la técnica más empleada para evaluar las arterias carótidas extracraneales, tanto en dos como en tres dimensiones (TOF: time of flight) y con contraste de gadolinio. Ofrecen una imagen en 3D de la bifurcación carótida con una buena sensibilidad (91-99%) para detectar oclusión o estenosis de alto grado, siendo la especificidad del 88-99%. La utilización de un contraste paramagnético permite obtener imágenes de mayor calidad y menos artefactadas. Sin embargo, tanto la angio-RMN-TOF como la angio-RMN con contraste son menos precisas para detectar estenosis moderadas. En comparación con los ultrasonidos, esta técnica es menos dependiente de operador y ofrece una imagen de la arteria. Como desventaja, cabe destacar que es más cara, no siempre está disponible y conlleva mayor tiempo de realización, además de que no puede realizarse en pacientes realmente críticos, con claustrofobia o con implantes ferromagnéticos o marcapasos (130).

2.1.4.5. Angio-Tomografía Computerizada.

La angio-TAC ofrece una visualización anatómica muy buena de la luz del vaso y de los tejidos adyacentes, así como de las estructuras óseas. Las reconstrucciones en 3D permiten medir el diámetro residual de la luz de la arteria y es útil sobre todo en casos en los que la ultrasonografía dúplex no es fiable, como pueden ser arterias severamente retorcidas, calcificación severa, cuello corto o bifurcaciones altas. La sensibilidad es del 97% y la especificidad del 99% en la detección de estenosis carotídea severa y oclusión(131,132). El angio-TAC requiere inyectar un contraste, generalmente iodado, por lo que estaría relativamente contraindicado en individuos con la función renal deteriorada, sobre todo si son diabéticos o tienen un fallo cardiaco congestivo.

2.1.5. Manejo y tratamiento de la aterosclerosis carotídea.

2.1.5.1. Tratamiento de la aterosclerosis carotídea sintomática.

La enfermedad sintomática se define por la presencia de signos o síntomas neurológicos focales de aparición aguda en el territorio de distribución ipsilateral de la arteria carótida afectada, incluyendo uno o más ataques isquémicos transitorios caracterizados por disfunción neurológica focal o ceguera monocular transitoria (amaurosis fugax), o uno o más infartos isquémicos menores (que no incapaciten al individuo en gran medida). Esta definición es válida para la presencia de síntomas en los seis meses previos, de otra manera no se considera que la enfermedad carotídea sea "sintomática" (133).

El tratamiento de la aterosclerosis carotídea sintomática incluye una opción quirúrgica de revascularización mediante endarterectomía carotídea (CEA) o stent carotídeo (CAS) en estenosis significativas de la arteria carótida o, en su caso, tratamiento médico si la estenosis no es significativa (<50%).

Endarterectomía carotídea: La endarterectomía carotídea (CEA) es un tratamiento seguro y efectivo para reducir el riesgo de infarto isquémico en pacientes con enfermedad sintomática. Se recomienda CEA frente a tratamiento médico o stent en pacientes con síntomas recientes, estenosis del 70-99% y esperanza de vida de al menos cinco años si cumplen las siguientes condiciones: lesión quirúrgicamente accesible, ausencia de clínica cardíaca, pulmonar o de otra naturaleza que suponga un riesgo para la anestesia o la intervención quirúrgica y que no tenga una endarterectomía previa ipsilateral (110,133). La CEA podría ser beneficiosa incluso con estenosis por encima del 50% en pacientes sintomáticos. Sin embargo, no hay que obviar que los beneficios de la CEA no dependen sólo del grado de la estenosis sino de otros factores incluyendo el tiempo de retraso desde la aparición de síntomas hasta que se realiza la intervención (134).

Stent carotídeo: La angioplastia carotídea con stent tiene hoy día un uso limitado debido al riesgo ateroesclerótico durante el procedimiento y a la alta tasa de restenosis (135). Aunque su uso es controvertido, se recomienda su utilización con algún sistema de protección neurológica en cuellos hostiles (radiados o con cirugías previas), bifurcaciones carotídeas altas, comorbilidad importante de los pacientes por patologías asociadas o reestenosis carotídeas. Como ventajas ofrecen su menor agresividad quirúrgica y menor riesgo de lesión de nervios craneales (136,137).

Tratamiento médico: Se considera que el mejor tratamiento médico es la administración de un agente antiplaquetario y la administración de una estatina. A esto hay que asociar un buen control de la tensión arterial y de los factores de riesgo cardiovascular (tabaco, diabetes, obesidad). Por eso, las directrices publicadas por la American Heart Association/American Stroke Association (AHA/ASA) en 2011 recomiendan optimizar la terapia médica (agentes antiplaquetarios, estatinas y modificación de los factores de riesgo) en todos los pacientes con estenosis carotídea y AIT o infarto (138).

2.1.5.2. Tratamiento de la aterosclerosis carotídea asintomática.

En este caso se trata de enfermedad aterosclerótica carotídea que no ha presentado sintomatología. Como en el caso de la enfermedad sintomática, tenemos tres opciones de tratamiento (CEA, stent o tratamiento médico) y aunque no se ha determinado con claridad el manejo ideal de estos pacientes, suele recomendarse según sus características (137).

Endarterectomía carotídea: Los pacientes asintomáticos con una estenosis de carótida interna $\geq 60\%$ pueden beneficiarse de una CEA (139), aunque el beneficio no será de la misma magnitud que en los pacientes sintomáticos (140,141). En el caso de las mujeres asintomáticas parece que una CEA es menos beneficiosa que en hombres asintomáticos. Por lo tanto, es muy importante seleccionar e individualizar los factores de riesgo de cada paciente antes de tomar la decisión de realizar una CEA (142–145).

Stent carotídeo: Aunque es una alternativa a la CEA, en pacientes asintomáticos su indicación es dudosa y muy controvertida. Actualmente no se recomienda salvo en ensayos clínicos o pacientes con comorbilidad elevada que imposibilitan una cirugía convencional (137).

Tratamiento médico: Falta evidencia científica para determinar si los pacientes asintomáticos se beneficiarían más de un tratamiento quirúrgico que sólo con tratamiento médico (146). La terapia médica actual incluye estatinas y agentes antiplaquetarios junto con un tratamiento dirigido a disminuir otros factores de riesgo como son los fármacos antihipertensivos, abandono del tabaco y control de la diabetes. Con un buen control médico de estos factores se reduce la diferencia de riesgo de sufrir un infarto entre la terapia médica y la intervención quirúrgica, por tanto, parece razonable realizar un tratamiento médico en pacientes asintomáticos (147,148). El tratamiento médico es más coste-efectivo que la cirugía en pacientes asintomáticos y se beneficiarían más de él en un 90% de los casos (149). Varios ensayos clínicos están en marcha para intentar dilucidar si el tratamiento médico es la mejor opción terapéutica en estos pacientes.

Las recomendaciones publicadas por la AHA/ASA en 2011 para el manejo de pacientes con enfermedad carotídea asintomática incluyen (150):

- Identificar los factores de riesgo para cambiar el estilo de vida en lo posible a la vez que se mantiene un tratamiento médico.
- Seleccionar bien a los pacientes asintomáticos que se puedan beneficiar de una terapia de revascularización teniendo en cuenta las comorbilidades, la esperanza de vida, los factores de riesgo y el riesgo/beneficio del procedimiento.
- El uso de antiagregación plaquetaria y estatina está recomendado (salvo que exista contraindicación) aunque el paciente sea candidato a CEA.
- La CEA profiláctica realizada con menos de un 3% de morbi-mortalidad puede ser útil en pacientes asintomáticos seleccionados (estenosis mínima del 60% por angiografía o del 70% por eco-Doppler).
- El stent profiláctico podría ser considerado en pacientes asintomáticos seleccionados de ensayos clínicos (estenosis mínima del 60% por angiografía, 70% por eco-Doppler u 80% por angio-TC o angio-RM si la estenosis por ultrasonografía es del 50-69%).
- La utilidad del stent como alternativa a la CEA en pacientes asintomáticos con alto riesgo quirúrgico es incierta.

2.2. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo fue descrito por Sies como un desequilibrio entre factores pro-oxidantes y antioxidantes en favor de los pro-oxidantes, que son potencialmente dañinos. Sin embargo, un aumento de oxidantes o una pérdida de antioxidantes aislada no constituye lo que se conoce como estrés oxidativo. Sin embargo, la formación de sustancias oxidantes acompañada de una pérdida de antioxidantes y/o un acúmulo de formas oxidadas de los antioxidantes, sí constituye lo que se conoce como estrés oxidativo (151).

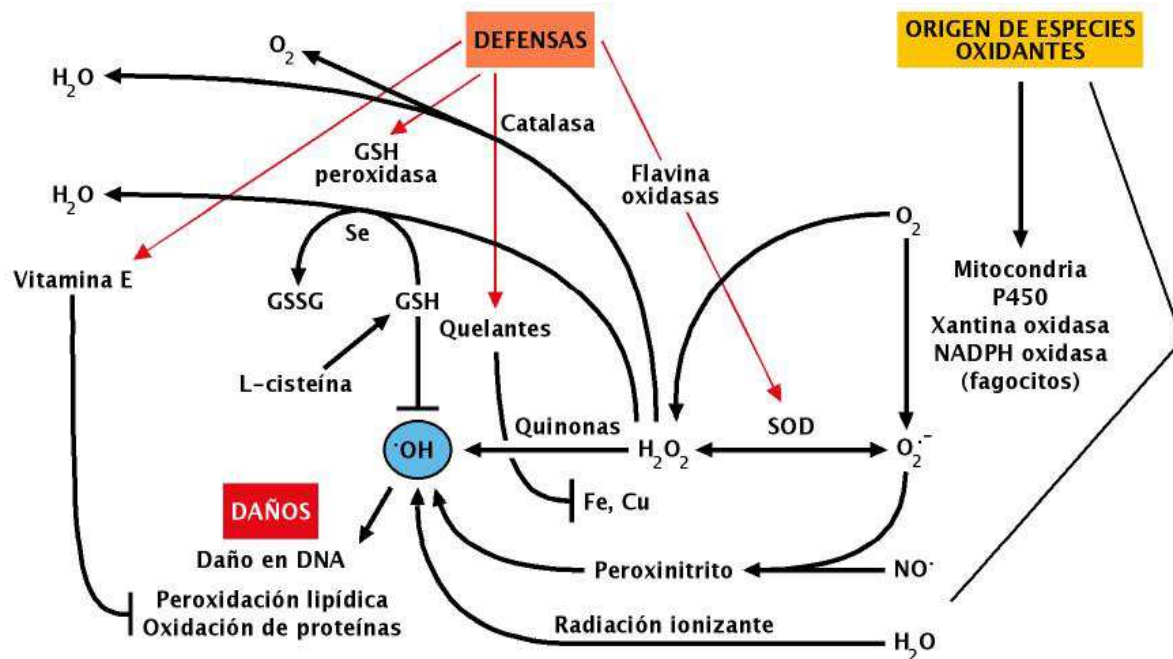


Figura 7. Mecanismo de producción de radicales libres, daños producidos y defensas antioxidantes.

Conceptualmente se puede distinguir entre estrés oxidativo y daño oxidativo. Una amenaza oxidativa acompañada de una pérdida de antioxidantes no causa necesariamente daño oxidativo. Los sistemas biológicos se caracterizan por tener respuestas adaptativas que compensan, a veces incluso con creces, el estrés oxidativo y puede manifestarse como una situación de ambiente redox incrementado (1). En el aspecto químico, se trata de reacciones de oxidación-reducción que llegan a un desequilibrio.

El estrés reductivo está íntimamente ligado al estrés oxidativo. Una sobreproducción de equivalentes reductivos como el NAD(P)H puede incrementar el ciclo de redox, lo cual puede incrementar la generación de radicales anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y secundariamente de oxidantes. Esto también está ligado a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por desequilibrios metabólicos como la hipoxia (1).

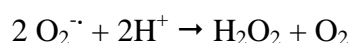
2.2.1. Biomarcadores de estrés oxidativo.

2.2.1.1. Radicales libres.

Un radical libre se define como cualquier especie que contiene uno o más electrones desemparejados. En los sistemas biológicos se generan gran cantidad de radicales libres. Si dos radicales se encuentran, pueden unir sus dos electrones desemparejados dando lugar a un enlace covalente, con lo cual resultaría un producto libre de radicales. Un ejemplo relevante en los vasos es la unión de un anión superóxido con un radical NO dando lugar a la formación de peroxinitrito. Por otro lado, un radical se puede unir a una molécula neutra o a un átomo de hidrógeno de enlaces C-H, O-H o S-H de moléculas neutras, que suelen ser antioxidantes, cofactores enzimáticos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y azúcares (1).

2.2.1.2. Otros oxidantes.

Además de los radicales libres, otras moléculas oxidantes pueden causar modificaciones en las paredes de los vasos. La más importante es el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) derivado de la acción de oxidasas como la glucosa oxidasa sobre el O₂ o de la dismutación del radical superóxido (O₂^{•-})



El peróxido de hidrógeno es un oxidante débil, aunque puede oxidar grupos tiol (-SH) de los sitios activos de algunas enzimas y reaccionar con ciertas proteínas hemo (mioglobina, citocromo C).

Otros oxidantes sin radicales son: ácido peroxinitroso (ONOOH), especies de nitrógeno reactivo, ácido hipocloroso (HOCl), residuos de metionina, ozono (O₃) y singlete de oxígeno (1).

2.2.1.3. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

El término especies reactivas de oxígeno incluye a todas las moléculas altamente reactivas y radicales libres que contienen oxígeno, como los radicales hidroxilo, el radical anión superóxido, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), singlete de oxígeno, radical óxido nítrico, radical hipoclorito, NO, peroxinitrito ($ONOO^-$) y varios lípidos peroxidados. Las especies clasificadas como radicales libres son $\cdot O_2^-$, $\cdot OH$ y $\cdot NO$, ya que tienen electrones desemparejados y fuerte capacidad de oxidación. H_2O_2 , HOCl, $ONOO^-$ son clasificados como sin radicales libres pero con capacidad de oxidación.

Los ROS son producidos por varias enzimas oxidasa, como son la nicotinamida-adenina dinucleótido fosfatasa oxidasa (NADPH), xantina oxidasa, NO endotelial sintasa (eNOS), ciclooxigenasa, glucosa oxidasa y lipooxigenasa. También son producidos por el transporte mitocondrial de electrones (81).

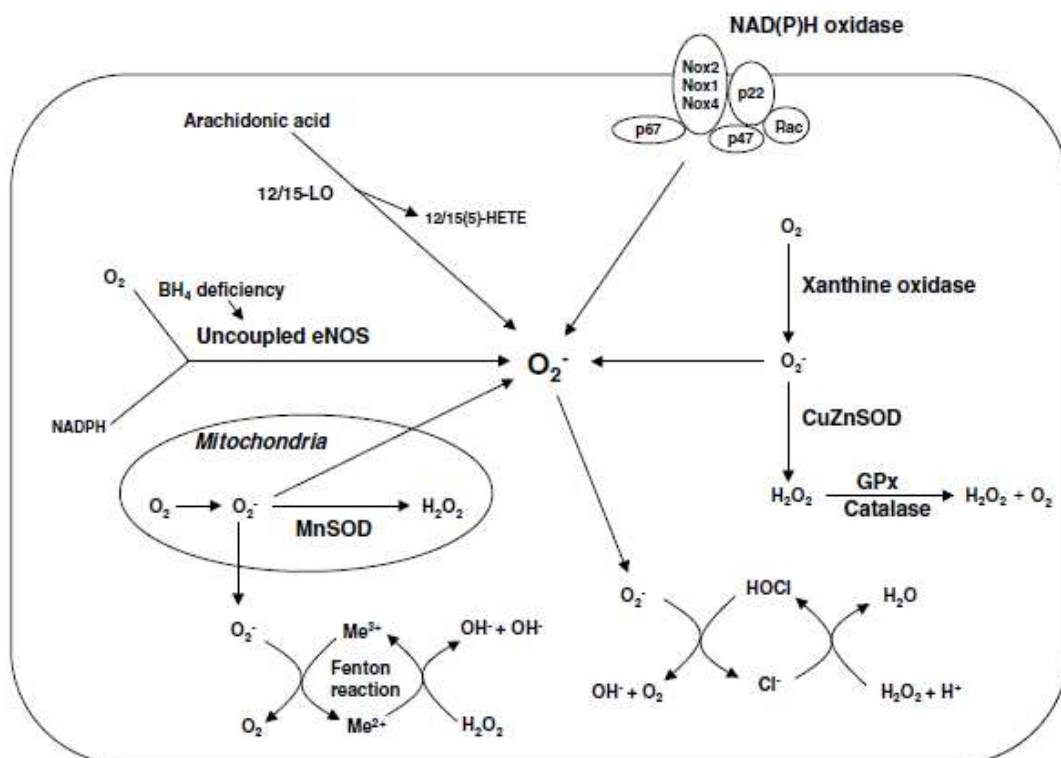


Figura 8. Generación de ROS por NADH/NADPH oxisasa y degradación de ROS en los vasos (81).

Los ROS son capaces de reaccionar con lípidos de membrana, ácidos nucleicos, proteínas y enzimas de manera que provocan daño celular. Los ROS se generan en varias líneas celulares (células de músculo liso vascular (VSMCs), células endoteliales y células mononucleares) a través de diversas vías, fundamentalmente como consecuencia de:

- El metabolismo aeróbico normal, a través del sistema de transporte mitocondrial de electrones.
- El metabolismo oxidativo que tiene lugar en los fagocitos como mecanismo de eliminación de bacterias y virus, por el cual se desnaturalizan los antígenos extraños.
- El metabolismo xenobiótico, como por ejemplo, la detoxificación de sustancias tóxicas.

Por tanto, todo lo que acelera el metabolismo celular contribuye a la generación de ROS, como el ejercicio intenso, la inflamación crónica, infecciones, exposición a alérgenos, drogas o toxinas, humo de tabaco, contaminación, pesticidas e insecticidas (152).

Los efectos más importantes de los ROS se citan a continuación (153):

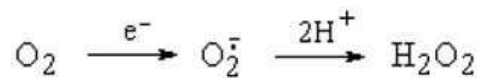
- El $O_2\cdot$ es tóxico para las enzimas mitocondriales tales como la aconitasa, pero tiene una vida media muy corta.
- El $HO_2\cdot$ difunde fácilmente y es altamente reactivo.
- El $HO\cdot$ también difunde fácilmente y es altamente reactivo. Ataca al DNA, macromoléculas, proteínas y lípidos.
- Los radicales hidroxilo también atacan indirectamente reaccionando con ácidos grasos insaturados o formando peróxidos orgánicos que se descomponen hasta aldehídos dando lugar a puentes aldehídos entre proteínas.
- AGEs (“Advanced Glycation End products”), formados por la reacción de azúcares con grupos amino de proteínas. Induce uniones proteína-proteína y mutaciones del DNA, así como el metabolito reactivo s-adenosil-metionina que altera los puentes de hidrógeno de las bases del DNA a través de la metilación de la guanina.

- Inestabilidad del DNA.
- Depurinación y deaminación de las bases del DNA.
- Isomerización y deaminación de aminoácidos.
- Defosforilación de fosfoproteínas.

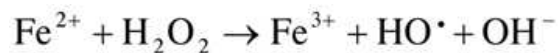
2.2.1.4. Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica puede promover la aterogénesis a través de otras vías como la oxidación de los lípidos de membrana de las plaquetas, células endoteliales de la pared arterial y células de músculo liso. Algunos productos de la oxidación del colesterol son directamente citotóxicos, como el 7-beta-hidroxicolesterol, y promueven la aterogénesis (154).

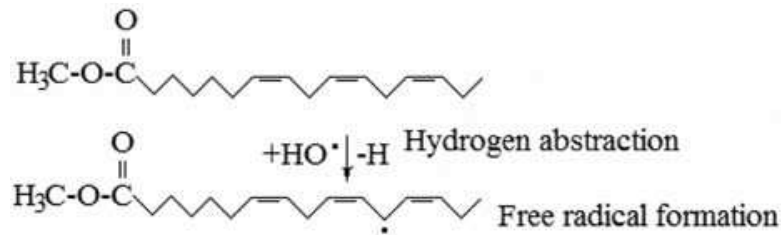
Como hemos comentado anteriormente, los radicales libres se producen durante el metabolismo y son capaces de destruir muchas biomoléculas importantes. Las moléculas de peróxido de hidrógeno son productos intermediarios en el ciclo catalítico de oxidación del citocromo P-450 de acuerdo con la reacción (4):



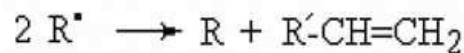
Las moléculas de peróxido de hidrógeno que se forman pueden reaccionar con cationes de hierro bivalentes (Fe^{2+}) o con cationes de cobre bivalentes (Cu^{2+}) de las proteínas, así como con iones metálicos tóxicos de metales de transición (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{2+}) produciendo radicales libres hidroxilo de acuerdo con las reacciones de Fenton o Haber-Weiss (4):



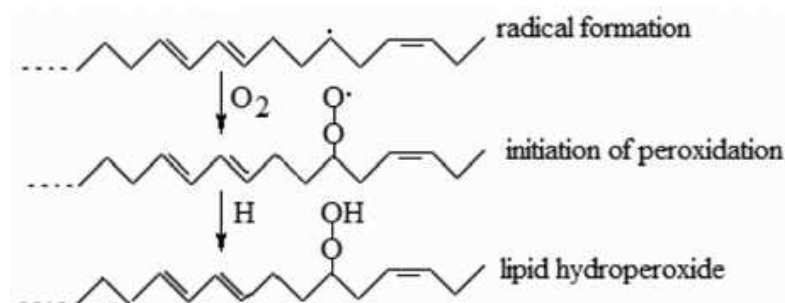
Los radicales libres hidroxilo que se producen pueden reaccionar con lípidos por abstracción de hidrógenos dando lugar a la formación de radicales libres lipídicos:



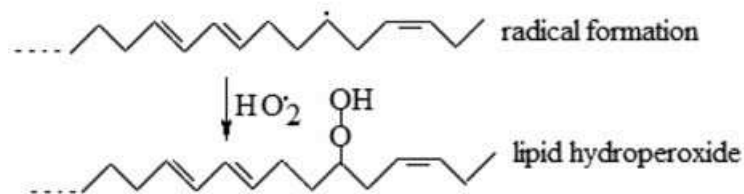
Una vez que se han formado los radicales lipídicos ($R\cdot$), reaccionan unos con otros siguiendo una reacción de dismutación:



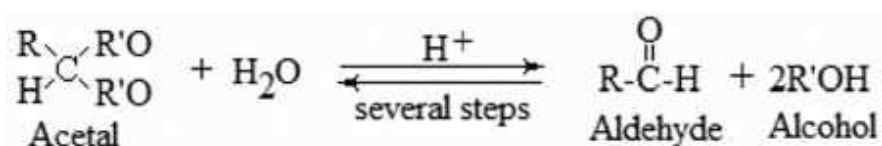
A través de esta reacción la molécula inicial (lípidos) se combina con otras moléculas que tienen un átomo menos de hidrógeno generando un doble enlace terminal. Como en humanos predominan las condiciones aerobias, el oxígeno, que es un doble radical libre ($\cdot O=O\cdot$) reacciona rápidamente con el radical formado anteriormente y genera un radical lipídico hidropéroxilo.



Los radicales peróxido formados ($C-O-O\cdot$) cogen muy rápido los átomos de hidrógeno móviles de los compuestos (donantes) en el ambiente, como lípidos adyacentes, tioles, etc. y pueden finalmente producir grupos hidropéroxilos ($-C-O-OH$), que no son iónicos. Esta reacción también da lugar al daño lipídico, inducido por abstracción de hidrógenos de los radicales hidroxilo. Los grupos hidropéroxilo también se pueden producir por reacción de radicales lipídicos con radicales hidropéroxilo ($HO_2\cdot$) de la siguiente manera:



Parece que los radicales hidroxilo son necesarios para la formación de lípidos peroxidados y aldehídos de acuerdo con la siguiente reacción:



Se acepta que los lípidos peroxidados se descomponen fácilmente, generando aldehídos, libres o no, y cetonas que modifican covalentemente los grupos ε-amino de los residuos de lisina de los restos de proteínas (4).

2.2.1.5. LDL oxidadas

La oxidación de las LDL es un factor clave para el desarrollo de la aterogénesis, en el cual participan especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno. La modificación oxidativa promueve el consumo y la retención de las LDL circulantes en la pared arterial (154,155).

El peroxinitrito, producto de la reacción entre óxido nítrico (NO) y radicales superóxido, y el malondialdehído, producto de la peroxidación lipídica, son potentes oxidantes de LDL que generan LDL modificadas con un potencial aterogénico elevado. Las LDL oxidadas (LDLox) pueden participar en la producción de más ROS y crear así unas condiciones favorables de estrés oxidativo (155).

La activación de las metaloproteinasas (MMPs) de la matriz contribuyen también a la desestabilización de la placa, remodelando la matriz extracelular.

En algunos estudios esta activación dicen que depende de estrés mediado por óxido nítrico, mientras que en otros las LDLox son las principales responsables.

Se han descrito otras formas de estrés oxidativo, como la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas en la aterogénesis, pero su contribución al proceso requiere más estudios, específicamente en enfermedad carotídea sintomática y generación de inestabilidad en la placa (155).

2.2.1.6. Proteínas nitrosiladas

En el marco del proceso del estrés oxidativo se produce un potente oxidante peroxinitrito, producto de radicales aniones superóxido con óxido nítrico. El peroxinitrito causa numerosos efectos citotóxicos como son la nitrosilación de proteínas, la rotura de DNA, la activación de poli(ADP-ribosa) polimerasa produciendo cambios en la expresión génica, cambios en la señalización celular, disfunción mitocondrial y, en casos extremos, inducción de apoptosis y necrosis.

Se ha comprobado que el nivel de proteínas nitrosiladas se correlaciona bien con el estrés oxidativo, la respuesta inflamatoria sistémica (en concreto con los niveles de PCR), el aumento de masa corporal y los niveles de glucemia (156).

2.2.1.7. Mieloperoxidasa

La mieloperoxidasa (MPO) es una glicoproteína catiónica con un peso molecular de 144 kDa que contiene hierro. Forma un complejo tetramérico de uniones covalentes y está compuesta por dos cadenas alfa glucosiladas de 59-64 kDa y dos cadenas beta desglucosiladas de 14 kDa. La MPO es una hemoproteína que se almacena de forma abundante en los gránulos azurófilos de neutrófilos polimorfonucleares y macrófagos. Se sintetiza durante la diferenciación mieloide en la médula ósea y supone más de un 5% del contenido proteico total en los neutrófilos y el 1% en los monocitos. Como respuesta a una invasión microbiana, los gránulos citoplásmicos de neutrófilos liberan la MPO

en el espacio fagosómico y extracelular, catalizando la conversión de peróxido de hidrógeno e iones de cloruro (Cl^-) a ácido hipocloroso, un potente agente oxidante (157–160).

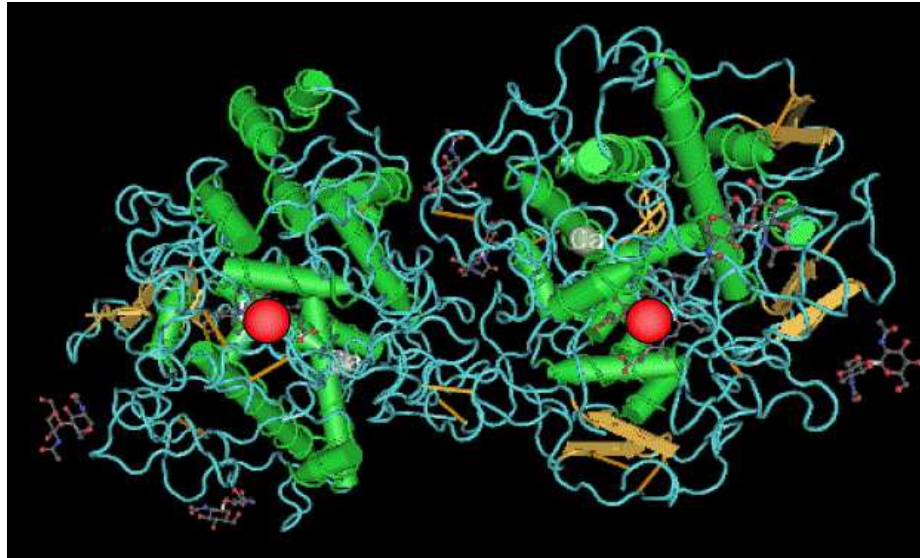


Figura 9. Estructura tridimensional de MPO formando un homodímero. En rojo, los grupos hemo; en verde, las hélices alfa y en amarillo, las hojas beta.

La MPO se caracteriza por su potentes propiedades pro-oxidativas y proinflamatorias. Se ha propuesto como un marcador de riesgo y herramienta diagnóstica en síndromes coronarios agudos y en pacientes que ingresan de urgencias con dolor torácico (161). La mieloperoxidasa se emplea tradicionalmente como marcador de inflamaciones de las vías respiratorias causadas por asma o irritantes medioambientales. Así mismo, se cree que la MPO participa en las distintas fases de la aterogénesis (inicio, propagación y complicaciones agudas) y que puede influir en la propagación de la aterosclerosis. La relación entre los niveles elevados de MPO en suero y las enfermedades cardiovasculares (CAD) representa un importante papel de la MPO como marcador de inflamaciones en las CAD, permitiendo la identificación de pacientes con riesgo de padecer accidentes cardíacos a falta de necrosis miocárdica (159,162,163). Sin embargo, no se ha demostrado el valor de la MPO como marcador de vulnerabilidad de la placa aterosclerótica (164).

La MPO está implicada en la oxidación de lípidos contenidos en el colesterol LDL. La MPO es capaz de promover la oxidación de lipoproteínas in vivo. Los macrófagos utilizan NADPH oxidasa para producir anión superóxido, que puede dismutarse y formar peróxido de hidrógeno. La MPO cataliza reacciones con H_2O_2 para generar más oxidantes como ácido hipocloroso (HOCl) y radical tiosilo. Es la única enzima humana capaz de generar HOCl. Este HOCl generado por la MPO activa la MMP-7, que es capaz de promover la degradación de la matriz extracelular de la cápsula fibrosa y, por tanto, puede contribuir a la rotura de la placa aterosclerótica (164).

La MPO es capaz de consumir NO derivado del endotelio en condiciones fisiológicas durante su acción como catalizador, por lo que reduce la biodisponibilidad del NO y altera su vasodilatación y propiedades antiinflamatorias. Además del consumo de NO, los oxidantes que se generan son capaces de inhibir la actividad de la NO sintetasa y reducir sus cofactores como NADPH (164). Se ha sugerido en varias ocasiones el papel catalizador de MPO para la modificación oxidativa de las lipoproteínas en la pared arterial.

Por otra parte, se ha demostrado que el HDL también es susceptible a las modificaciones oxidativas mediadas por MPO a través de la nitración o halogenación de residuos de tirosina en la ApoAI. Estos dañan la capacidad de la proteína para promover el transporte reverso de colesterol dependiente de ABCA-1, lo cual contribuye a la formación de lesiones ateroscleróticas (164). Los niveles plasmáticos de HDL y ApoAI, la mayor apolipoproteína de las HDL, se correlacionan inversamente con el riesgo de desarrollar enfermedad arterial coronaria. Hay evidencia constatada de que las HDL son un objetivo in vivo para la oxidación catalizada por MPO, que puede representar un mecanismo molecular específico para convertir las lipoproteínas cardioprotectoras en formas disfuncionales, elevando la posibilidad de que la enzima represente un potencial objetivo terapéutico para prevenir la enfermedad vascular en humanos (161). La inhibición de la MPO puede tener efectos anti-ateroscleróticos a través de la inhibición del estrés oxidativo y favorecer el flujo de salida del colesterol, tal y como se ha demostrado en un estudio con el fármaco INV-315 en modelo de

ratón, proponiendo la modulación farmacológica de la MPO en la aterosclerosis (165).

La MPO podría ser utilizada como marcador para evaluar a pacientes con dolor torácico sin elevación del segmento ST y troponina negativa. Parece que tiene un valor predictivo con elevada sensibilidad para eventos adversos, como el infarto de miocardio (166). Por otro lado, parece ser un marcador de mortalidad intrahospitalaria en pacientes con infarto de miocardio con elevación del segmento ST que se presentan con shock cardiogénico y son tratados primariamente con intervención percutánea (167).

2.2.1.8. Proteína C reactiva

Es una proteína cuyo peso molecular está entre 118.000 y 144.000 Da con un contenido sustancial de hidratos de carbono. El gen de la PCR está localizado en el cromosoma 1 humano. Su concentración sérica normal suele ser de 100 ng/mL en el momento del nacimiento, de 170 ng/mL durante la infancia y de 470 ng/mL a 1340 ng/mL en sujetos adultos. A pesar de estas concentraciones la PCR tiene gran importancia como reactante de fase aguda altamente sensible. Generalmente se determina por su capacidad de precipitar la sustancia C o por métodos inmunológicos que incluyen nefelometría, precipitación, RIA y enzimoimmunoanálisis. En nuestro caso lo hemos determinado por inmunoturbidimetría.

La PCR es una proteína con migración gamma en la electroforesis y puede formar una banda distinta de aspecto monoclonal en pacientes que presentan una respuesta inflamatoria intensa. La PCR reconoce específicamente a la fosfocolina, parte hidrofóbica de la fosfatidilcolina en la membrana celular. Esta unión activa la vía clásica del complemento y estimula a los macrófagos. En los casos en que sus niveles se elevan por encima de 10mg/L suele indicar la existencia de un proceso en fase aguda como infarto agudo de miocardio, traumatismo, infección, cirugía, estrés o tumores. En cambio, cuando sus niveles son inferiores a 10mg/L actúa como un indicador de procesos crónicos tales

como el daño endotelial, aterosclerosis, infección periodontal, infección por *C. pneumoniae*, *H. pylori*, Citomegalovirus o inflamación bronquial. Es una proteína scavenger (limpiadora) que ayuda a recoger y transportar los restos celulares y los productos de degradación de los fagocitos (sistema retículo endotelial) para procesarlos y conservar sustancias vitales como, por ejemplo, el hierro (168).

2.2.2. Estrés oxidativo y enfermedad cardiovascular.

Varias líneas de evidencia demuestran que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis y desarrollo de enfermedades cardiovasculares, incluyendo hipertensión, dislipemia, diabetes mellitus, aterosclerosis, infarto de miocardio, angina de pecho y fallo cardíaco (2,81).

Como ya comentamos anteriormente, la susceptibilidad de las células vasculares al estrés oxidativo está en función del equilibrio entre el grado de estrés oxidativo y la capacidad de defensa antioxidante. Los sistemas de defensa, como superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa y catalasa (CAT), eliminan ROS de los vasos, por lo que se inhibe la degradación de NO.

El estrés oxidativo induce proliferación celular, hipertrofia, apoptosis e inflamación a través de la activación de varias cascadas de señalización y factores de transcripción. El exceso de ROS, especialmente de radicales libres, oxida a lípidos y proteínas lo cual induce sobreexpresión de genes redox, sobrecarga de calcio intracelular y fragmentación del DNA, resultando en un daño para células del músculo liso vascular, células endoteliales o células miocárdicas. Por tanto, el ciclo vicioso del estrés oxidativo induce aterosclerosis (81).

2.2.3. La función endotelial.

Las células endoteliales secretan varios agentes vasoactivos, como son los vasodilatadores, como el óxido nítrico (NO), prostaciclina y factor de hiperpolarización derivado del endotelio (EDHF), y los vasoconstrictores, como endotelina-1,

angiotensina II y tromboxano A2. Por tanto, el endotelio vascular podría ser considerado el mayor órgano endocrino del cuerpo humano, ya que su peso total sería equivalente al del hígado. Un endotelio sano mantiene el tono vascular y la estructura al regular el equilibrio entre vasodilatación y vasoconstricción, inhibición y promoción del crecimiento, protrombosis y antitrombosis, proinflamación y antiinflamación y prooxidación y antioxidación.

Hay diferentes mecanismos del daño de la función endotelial. La disminución de la biodisponibilidad del NO (descenso en la producción o incremento de la inactivación del NO) induce disfunción endotelial. La función endotelial está regulada por un equilibrio entre vasodilatadores derivados del endotelio, especialmente NO, y ROS. Por tanto, un desequilibrio de NO y ROS (llamado estrés oxidativo) está involucrado en la disfunción endotelial a través de la inactivación del NO (81).

El NO tiene un papel importante en la regulación del tono vascular, inhibición de la agregación plaquetaria y supresión de la proliferación celular del músculo liso vascular. La vasodilatación dependiente del endotelio dañado se ha encontrado en vasos de antebrazo, coronarios y renales en pacientes con hipertensión, dislipemia, diabetes mellitus y enfermedad de arterias coronarias. La disfunción endotelial es una característica precoz en la patogénesis de aterosclerosis y enfermedad vascular, por lo cual una mejora de la función endotelial previene del desarrollo de aterosclerosis, lo que se traduce en una reducción de eventos cardíacos (81).

Varias intervenciones han demostrado mejorar la función endotelial y prevenir complicaciones cardiovasculares, incluyendo la terapia farmacológica, la administración de agentes antihipertensivos como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y bloqueantes del receptor de angiotensina tipo II, estatinas y derivados de tiazolidinedionas, terapia suplementaria como administración de NO L-arginina, terapia estrogénica sustitutiva, administración de un cofactor de NO tetrahidrobiopterina, tratamiento con vitaminas antioxidantes como vitamina C y modificación en el estilo de vida como ejercicio aeróbico, reducción de peso y restricción de sodio. Estos hallazgos sugieren que la disfunción endotelial en pacientes con enfermedades cardiovasculares es reversible (81).

Algunos investigadores han descrito posibles mecanismos del daño de la función endotelial, incluyendo anomalías en el freno del estrés, aumento de inhibidor eNOS endógeno asimétrico de dimetilarginina, incremento de vasoconstrictores como angiotensina II, endotelina-1 y norepinefrina, y la inactivación de NO por los ROS. Parece que la interacción entre el estrés oxidativo y la función endotelial es cada vez más evidente. El aumento de ROS y la disminución de los antioxidantes pueden contribuir a la disfunción endotelial en enfermedades cardiovasculares.

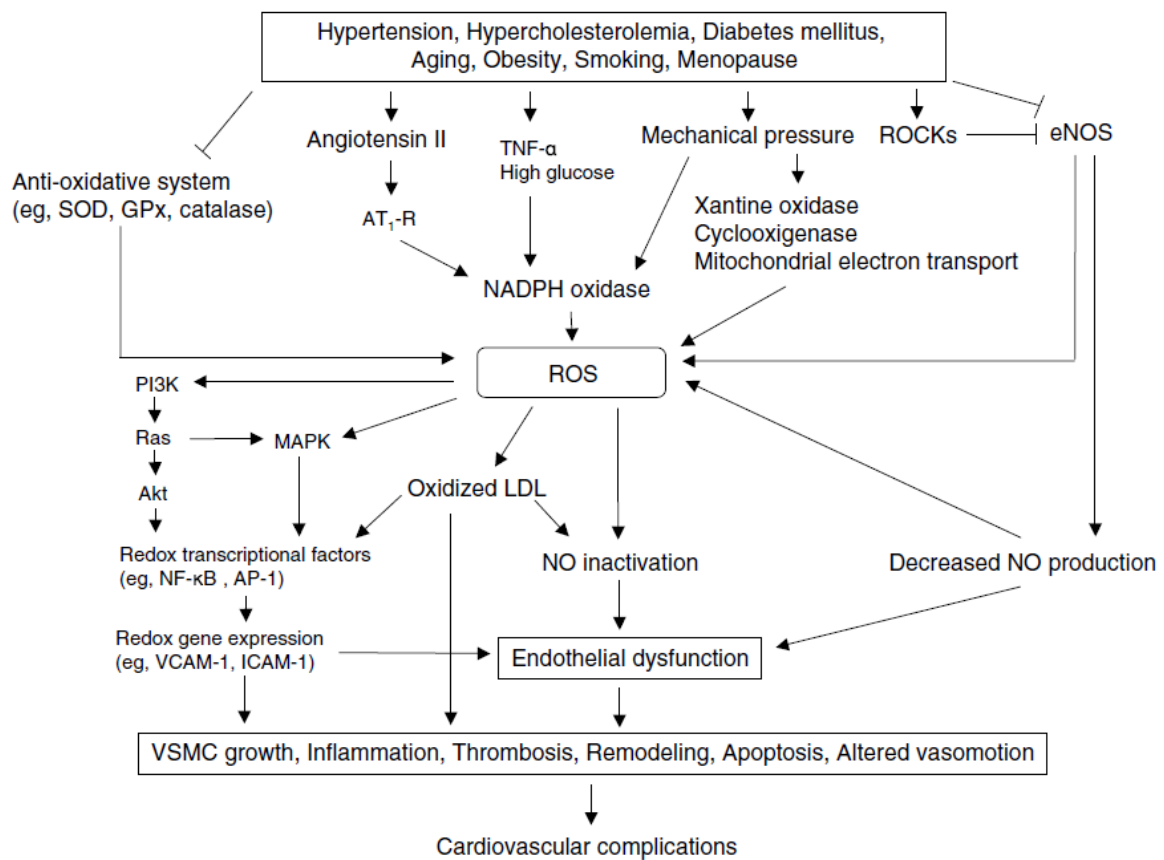


Figura 10. Mecanismos por los que ROS induce disfunción endotelial (81).

La disfunción endotelial se ha asociado al incremento de ROS en modelos animales y en humanos con aterosclerosis. La concentración de SOD, glutathion peroxidasa, catalasa y vitaminas C y E están disminuidas en pacientes con aterosclerosis. La NADH/NADPH oxidasa, que es una gran fuente de producción de ROS en paredes vasculares, está activada en modelos experimentales de aterosclerosis. También se ha mostrado que el ácido ascórbico (vitamina C) restaura la vasodilatación

dependiente del endotelio dañado en pacientes con hipertensión esencial, dislipemia y enfermedades de arterias coronarias. El aumento de la inactivación de NO, más que el descenso en la producción de NO, causa un exceso de producción de ROS, lo que provoca un daño en la vasodilatación dependiente de endotelio (81).

Muchas proteínas y factores de transcripción que juegan un papel clave en la fibrosis y calcificación son sensibles a la reducción-oxidación. En las arterias el incremento de fibrosis en las placas ateroscleróticas es probablemente protector transformando la placa vulnerable en placa estable (2).

2.3. ANTIOXIDANTES.

Los antioxidantes son sustancias capaces de estabilizar o desactivar radicales libres cuando ésta sustancia se encuentra en cantidad mucho menor que la sustancia a la que protege. Son imprescindibles para el mantenimiento de la salud a nivel sistémico y celular (152). En referencia a la aterosclerosis, los antioxidantes vasculares tienen que proteger frente a radicales y otros oxidantes, y actuar tanto en el espacio intracelular como en el extracelular (1).

2.3.1. Antioxidantes enzimáticos.

A nivel celular existen antioxidantes enzimáticos complejos y multifactoriales como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa que tienen la función de convertir los ROS en oxígeno y agua (169).

2.3.1.1. Superóxido dismutasa (SOD).

El *sistema* de defensa antioxidante, como la SOD, GPx y catalasa, elimina los ROS de los vasos y esto hace que se inhiba la degradación del NO. La enzima SOD rápidamente dismuta el $O_2^- \cdot$ a H_2O_2 y oxígeno molecular:



Se han identificado tres tipos enzimáticos de SOD: Cu/Zn-SOD, Mn-SOD y SOD extracelular. La destrucción del sistema antioxidante, incluyendo el descenso de la actividad enzimática antioxidante y la capacidad de eliminar ROS, puede contribuir al estrés oxidativo en pacientes con aterosclerosis (81). En la mayoría de tejidos con incremento del estrés oxidativo hay una elevación de los niveles de SOD con función protectora y compensatoria. En lesiones vasculares ateroscleróticas se ha visto que incrementa o no cambia (2). La regulación positiva de Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, GPx y catalasa, aparte de la SOD extracelular, pueden mejorar la función endotelial a través de la inhibición de la degradación de NO con un descenso de ROS (81).

Varias intervenciones como la administración de vitaminas antioxidantes y agentes antihipertensivos y ejercicio físico, han demostrado mejorar el nivel de proteínas y la actividad enzimática de SOD, como Cu/Zn-SOD y Mn-SOD en el endotelio vascular y en células de músculo liso de la aorta en modelos animales experimentales.

Aproximadamente el 50% de la SOD total de los vasos humanos es extracelular (81). La actividad de la SOD extracelular mejora la función endotelial, probablemente por el incremento de la biodisponibilidad de NO, en pacientes con enfermedad de arteria coronaria (170).

Aunque la SOD convierte rápidamente el O_2^- a H_2O_2 , el H_2O_2 está involucrado como un segundo mensajero intracelular en el remodelado vascular, la inflamación, apoptosis y crecimiento de células musculares lisas de los vasos (81).

2.3.1.2. Catalasa y peroxidasas.

Son dos enzimas que metabolizan el H_2O_2 que resulta de la dismutación del anión superóxido o que se genera a través de enzimas oxidasa, como la xantina oxidasa. La catalasa descompone directamente el H_2O_2 a agua y oxígeno molecular, mientras que las peroxidasas eliminan el H_2O_2 utilizándolo para oxidar a otra sustancia (1).

2.3.1.3. Glutation peroxidasas.

Las glutatión peroxidasas cooperan con las catalasas para eliminar el H_2O_2 . Utilizan el glutatión reducido (GSH) para reducir el H_2O_2 a H_2O y glutatión oxidado (GSSG). En lo respectivo a la pared arterial, pueden catalizar la reducción de un peróxido (L-OOH) a su alcohol correspondiente (L-OH). Esta conversión es lo que representa la defensa antioxidante, ya que frena las sustancias pro-oxidantes derivadas de la degradación de los hidroperóxidos.

Las glutatión peroxidasas utilizan selenio como catalizador de las reacciones. Se distinguen cuatro tipos de peroxidasas (1):

- Glutatión peroxidasa clásica (cGPx): actúa sobre H_2O_2 e hidroperóxidos de ácidos grasos y colesterol, pero no sobre lípidos esterificados como ocurre en las lipoproteínas.
- Hidroperóxido fosfolipídico glutatión peroxidasa (PHGPx): es la única enzima conocida que reduce hidroperóxidos lipídicos complejos en las lipoproteínas.
- Glutatión peroxidasa gastrointestinal: está implicada en la detoxificación de peróxidos que provienen de la dieta.
- Peroxidasa extracelular: actúa sobre H_2O_2 e hidroperóxidos fosfolipídicos.

Las glutatión peroxidasas actúan conjuntamente con la glutatión reductasa, que cataliza la reducción de GSSG a expensas de NADPH, el cual proviene de la vía oxidativa de las pentosas fosfato, iniciada por glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y que mantiene en equilibrio la pareja redox NADPH/NADP⁺. En este sentido, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa puede considerarse como un antioxidante (171).

2.3.1.4. Tíol-disulfuro oxidoreductasas.

En este grupo se incluyen las proteína-disulfuro isomerasas, la tiorredoxina y la glutarredoxina. El sistema tiorredoxina está compuesto por tiorredoxina, NADPH y tiorredoxina reductasa y es un sistema antioxidante para

la defensa contra el estrés oxidativo a través de la actividad disulfuro reductasa regulando el equilibrio proteico ditiol/disulfuro (172), mientras que la glutarredoxina puede ser reducida directamente por la GSH.

2.3.1.5. Peroxirredoxinas.

Son enzimas ubicuas, tiol específicas, que tienen múltiples funciones en la protección frente al estrés, incluido el estrés oxidativo. Son capaces de proteger frente a los ROS generados por la mitocondria cuando existen errores en el plegamiento de las proteínas (173). Presentan una actividad peroxidasa dependiente de tiorredoxina reducida y/o GSH.

2.3.2. Antioxidantes no enzimáticos

Por otro lado, los antioxidantes no enzimáticos tienen también una función de eliminación de radicales libres. En este grupo se incluyen los antioxidantes liposolubles, como el α -tocoferol (vitamina E) y el β -caroteno, y los antioxidantes hidrosolubles, como el ácido ascórbico (vitamina C) y glutathion (169). También se incluyen en este grupo las proteínas unidas a metales, como la ferritina, lactoferrina, albúmina y ceruloplasmina, que secuestran iones capaces de catalizar reacciones oxidativas, así como otros antioxidantes que pertenecen a la categoría de fitonutrientes, igualmente capaces de interferir en el metabolismo oxidativo (152).

2.3.2.1. Proteínas biológicas secuestradoras de hierro y cobre.

Los metales de transición, y especialmente el hierro y el cobre, son esenciales para la síntesis de proteínas que están presentes en los vasos sanguíneos normales. Estos metales tienen la capacidad de transferir un electrón, lo que da lugar a reacciones de autooxidación o de descomposición de peróxidos en radicales, lo cual induce daño oxidativo en las lipoproteínas como las LDL. Algunas proteínas (ferritina, transferrina, haptoglobina, hemopexina y ceruloplasmina) son capaces de unirse al hierro y al cobre formando complejos

de forma que actúan como antioxidantes frenando la capacidad oxidativa de los metales (174,175).

2.3.2.2. Hemo-oxigenasas.

Estas enzimas disminuyen los niveles de hierro, hemo y hemo-proteínas como el citocromo P-450 y protoporfirina oxidasa, a la vez que inducen el aumento de sustancias antioxidantes, como biliverdina y bilirrubina, en los tejidos. Las células inducen un aumento de hemo-oxigenasas en respuesta al estrés oxidativo. Si existe un déficit de estas enzimas aumenta la sensibilidad al H_2O_2 y a la hiperoxia y aumentan los marcadores de daño oxidativo (1,176).

2.3.2.3. Antioxidantes hidrosolubles

En este grupo se incluyen el ácido úrico, la bilirrubina y componentes de la dieta como vitamina C y varios flavonoides y polifenoles.

- **Ácido ascórbico (vitamina C):** Es el más importante de los antioxidantes hidrosolubles. Es un cofactor para varias de las enzimas implicadas en reacciones de hidroxilación. El ácido ascórbico es necesario para la biosíntesis de colágeno por la vía de las prolina y lisina hidroxilasas. El colágeno formado en ausencia de ascorbato está insuficientemente hidroxilado y no forma fibras apropiadas, de forma que los vasos sanguíneos son más frágiles. Protege a los lípidos plasmáticos de la peroxidación, elimina especies reactivas de oxígeno y participa en el reciclaje del α -tocoferol (177). La administración intravenosa de ácido ascórbico reduce los marcadores de estrés oxidativo y mejora la disfunción endotelial (178). La administración crónica de vitamina C también reduce el estrés oxidativo y la actividad de los radicales libres aunque no tiene se han constatado cambios en la función endotelial (179).
- **Acido úrico:** Se produce por oxidación de hipoxantina y xantina, catalizada por xantina oxidasa y deshidrogenasa. Se atribuye una función

antioxidante a los uratos porque son capaces de eliminar singletes de oxígeno, radicales hidroxilo y peroxilo, ciertos oxidantes producidos por enzimas y otros radicales derivados del ONOO⁻. Los uratos también tienen la capacidad de unirse a metales de transición que intervienen en la peroxidación de lípidos en la pared vascular. Las toxinas urémicas participan, por tanto, en la generación de estrés oxidativo y más aún cuando está asociado a enfermedad renal crónica. La modificación de la LDL, observada en pacientes urémicos, supone un desencadenante precoz de la aterogénesis (1,180).

- **Bilirrubina:** Es el producto final de la degradación del grupo hemo. Es un agente reductor y, por tanto, un potencial antioxidante. La bilirrubina en su forma libre o unida a albúmina es capaz de inhibir la peroxidación de las LDL en plasma como agente de segunda línea después del ascorbato (181).

2.3.2.4. Antioxidantes liposolubles

- **α-Tocoferol (vitamina E):** Esta vitamina es liposoluble y es un componente importante de las partículas de LDL. Su liposolubilidad le permite atravesar la pared de los vasos y eliminar radicales libres, así como inhibir la proliferación de células musculares lisas y reducir la agregación plaquetaria. Se le ha atribuido también la capacidad de limitar la modificación oxidativa de las partículas aterogénicas de LDL (182).
- **Licopeno:** También denominado ψ,ψ-caroteno es el carotenoide, junto con el beta-caroteno, más abundante en los tejidos humanos, donde está presente en relativamente altas concentraciones en testículos comparado con otros tejidos como hígado y glándulas adrenales (183). Tiene propiedades antioxidantes y anticancerígenas. Los suplementos de licopeno más luteína parece que disminuyen el grosor de la íntima-media de la arteria carótida en sujetos con aterosclerosis subclínica (184).

- **Coenzima Q10:** Es una molécula similar a las vitaminas (*vitamin-like*). Se trata de una quinona liposoluble que se encuentra en altas concentraciones en las mitocondrias del corazón, hígado y riñón, donde está implicada en la transferencia de protones y electrones durante la fosforilación oxidativa. Tiene propiedades antioxidantes y elimina radicales libres a través de mecanismos de estabilización de membranas (185).
- **Alicina:** Es un compuesto organosulfurado derivado del ajo (*Allium sativum*). Tiene importantes beneficios a nivel cardiovascular como reducción de la presión sanguínea y de la aterosclerosis así como capacidad antitrombótica y antiinflamatoria. Inhibe la respuesta hipertrófica inducida por la angiotensina II, reduce la sobrecarga de presión y suprime la generación de ROS (186).

2.4. APOLIPOPROTEÍNA D

La apolipoproteína D (ApoD) es una glicoproteína extracelular de la familia de las lipocalinas, debido a su estructura de plegamiento tipo β -barril típico de las lipocalinas, implicadas en diversas funciones como la respuesta inmunológica, regulación de la proliferación celular, quimiorrecepción, metabolismo de retinoides, crecimiento de axones y regulación de proteólisis (187).

El peso molecular de la ApoD humana madura es de 19kDa. Se compone de 169 aminoácidos presentando puntos de glicosilación en los residuos 45 y 178, correspondientes a asparragina. Su peso molecular calculado mediante electroforesis en SDS es de 32kDa, de los cuales aproximadamente el 18% corresponden a carbohidratos.

El patrón de glicosilación de la ApoD varía dependiendo del lugar en el que se encuentre, correspondiéndose lo anteriormente citado con la ApoD plasmática, donde los carbohidratos son menos complejos y extensos y la glicosilación es por tanto menor que en la ApoD de otras secreciones y tejidos del organismo (188).

El gen de la ApoD está localizado en el cromosoma 3 de los seres humanos y en el cromosoma 16 de los roedores. Su secuencia de aminoácidos no guarda similitud con la del resto de las apolipoproteínas pero sí un alto grado de similitud con miembros de la familia de las lipocalinas (188,189).

Los estudios poblacionales ponen de manifiesto variaciones en el gen de ApoD en forma de polimorfismos que podrían afectar a la función de ApoD, al metabolismo de las lipoproteínas y a las concentraciones plasmáticas de las mismas. De hecho ciertos alelos del gen ApoD muestran una correlación significativa con la predisposición a padecer ciertas enfermedades neurodegenerativas (190).

Esta lipocalina se expresa de manera predominante en el Sistema Nervioso (SN), tanto en la etapa prenatal (pericitos vasculares) como postnatal (glía y neuronas) así como durante la vida adulta (191,192). También se expresa en otros tejidos, y en el plasma va transportada por las HDL, por lo que pudiera intervenir en la regulación del colesterol y otros lípidos (193).

La cantidad de ApoD se incrementa de forma considerable en los tumores sistémicos originados por glándulas apocrinas, y en algunos tumores cerebrales primarios, en carcinoma hepatocelular y en carcinoma de mama invasivo. Se eleva en cerebro en sujetos con esquizofrenia crónica y en el córtex prefrontal en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Aunque el papel biológico concreto de la ApoD se desconoce, la presencia de ApoD en tumores parece ser un factor pronóstico en la evolución. En relación con el SN, el aumento de la expresión de ApoD observado en numerosas patologías neurodegenerativas podría servir para realizar un diagnóstico precoz de las mismas. Además, el tratamiento con antipsicóticos, especialmente con clozapina, eleva la expresión de ApoD en cerebro de ratón y en cerebro humano (188,194).

Se ha demostrado que la ApoD se eleva en zonas peri-infartadas durante el periodo de recuperación tras un infarto en ratas. Esto sugiere que una elevación de la ApoD favorece el transporte de colesterol y fosfolípidos en el proceso de remodelado en la recuperación del daño cerebral. En fallo cardíaco también se ha visto aumentada, lo cual puede indicar que la ApoD se podría utilizar como biomarcador en el fallo cardíaco

en estadio final (194). En el caso de estrés celular se ha observado una sobre-expresión de ApoD, que además es intracelular, lo que lleva a pensar que tiene un papel fundamental en la proliferación-supervivencia-muerte celular (195,196).

La ApoD se ha detectado en gran variedad de órganos, tejidos y fluidos, lo que refleja su importancia y sugiere que puede desempeñar diferentes funciones dependiendo del órgano en el que se encuentre. ApoD se expresa en tejidos de mamíferos como cerebro, hígado, intestino, músculo cardíaco y esquelético, tejido adiposo y páncreas (194). Se ha detectado en plasma, en el fluido lacrimonal, en el cuerpo ciliado ocular, en el líquido cefalorraquídeo sin que sus concentraciones tengan relación con la plasmática, en la perilinfa con concentraciones comparables a las del plasma, en los fluidos del oído medio, de forma libre en la orina donde es la lipoproteína mayoritaria, y también se ha encontrado en el sudor (188).

En contraste con el resto de las lipoproteínas no es el intestino y el hígado donde encontramos una mayor síntesis de ApoD sino en las glándulas adrenales, en los riñones y en el sistema nervioso central (SNC) (188). Las células que expresan mayor cantidad de mRNA de ApoD son los fibroblastos perivascuales, las células gliales, piales y perivascuales del SNC y en algunas neuronas (191,192).

Debido a su característico plegamiento, forma una cavidad de forma cónica capaz de albergar ligandos hidrofóbicos, como son el colesterol, estrógenos, andrógenos, progesterona, pregnenolona, bilirrubina y ácido araquidónico (194). De todos estos, la ApoD presenta una mayor afinidad por el ácido araquidónico, lo que nos lleva a pensar que a través de la L-CAT la ApoD podría intervenir en la regulación de su metabolismo, retirándolo para prevenir así su transformación en ésteres de colesterol (188). Es también importante mencionar que otra de las moléculas que une es el ácido retinoico, molécula que juega un papel principal en el desarrollo del SN. De hecho ApoD es la lipocalina humana con mayor afinidad por el ácido retinoico (197).

La condición de lipocalina de la ApoD y la variedad de tejidos en los que se expresa hacen pensar en la hipótesis de que esta apolipoproteína sea multiligando y multifunción y que tanto la función como los ligandos varíen dependiendo del órgano en el que se exprese (188).

2.4.1. ApoD y el metabolismo lipídico.

La ApoD se encuentra principalmente (en un 83%) formando parte de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) debido a la capacidad de formar enlaces covalentes con ApoA-II, de las que supone un 1 a 2% (198), aunque también puede encontrarse en pequeña cantidad en las de muy baja densidad (VLDL) y en las de baja densidad (LDL) (188). Como componente de las HDL se observó que se asociaba con la proteína colesterol-éster-transferasa, con la Apo A-I o con Apo A-II (más del 50% de la ApoD presente en las HDL está formando estos complejos con la Apo A-II) (198). También en las HDL está formando parte de los complejos responsables del transporte del colesterol desde los tejidos periféricos al hígado para su metabolismo, especialmente con el enzima lecitín-colesterol-acil-transferasa (L-CAT). Se cree que la ApoD podría estabilizar la actividad enzimática de la L-CAT o actuar como transportador de sustratos o productos de la reacción, como el colesterol o los ésteres de colesterol, ya que se ha observado un aumento en la actividad de esterificación del colesterol por la L-CAT en presencia de ApoD. Todo esto sugiere interacciones entre el metabolismo del colesterol y la ApoD, pero existen evidencias de que no es el colesterol el principal ligando de la ApoD tal y como se creía en un principio. Esto viene avalado por la baja afinidad existente entre ambos y por el hecho de que en el fluido quístico del cáncer de mama la concentración de ApoD aumenta hasta 1000 veces, mientras que la del colesterol solo aumenta el doble. Un incremento en el contenido de ApoD en el HDL puede representar un marcador patológico o una respuesta compensatoria al alterado metabolismo del colesterol en sujetos con enfermedad arterial coronaria establecida (188,194).

La ApoD está también implicada en el metabolismo de los triglicéridos. Existen tres mutaciones en población africana asociadas con una elevación significativa de los niveles plasmáticos de triglicéridos y reducción de niveles de HDL, perfil característico del síndrome metabólico, por lo cual parece que la ApoD sufre una disfunción en la patogénesis de esta patología. Se han constatado niveles bajos de ApoD en pacientes con hiperquilomicronemia, así como niveles bajos de triglicéridos y ApoD en niños con problemas del metabolismo carbohidratado en periodo neonatal. Por tanto, una mala regulación de ApoD puede contribuir a las anomalías metabólicas en pacientes con resistencia a la insulina, obesidad o diabetes tipo 2 (194).

2.4.2. Acciones vasculares de ApoD.

Como ya hemos comentado anteriormente, el 1-2% de la partícula de HDL está formado por ApoD. Así mismo, podemos decir que el 83% del ApoD sanguíneo se encuentra en las HDL. De esta manera, se ha visto que si disminuye ApoD en las HDL antes que en suero aumenta el riesgo de infarto. El hecho de que sean las HDL las responsables de transportar el colesterol desde los tejidos periféricos al hígado y que la mayor parte de ApoD se encuentre en estas lipoproteínas nos hace pensar en sus efectos beneficiosos desde el punto de vista cardiovascular (198).

Se ha detectado la presencia de ApoD en la placa de ateroma, pero no en las coronarias normales (198). Un hecho importante es el hallazgo de gran cantidad de ApoD en células quiescentes (199), pero sin embargo la expresión está muy disminuida en las células que proliferan. Los estudios in vitro demuestran que ApoD inhibe la proliferación celular, obteniéndose un efecto muy parecido al que producen los antagonistas del calcio, lo que demuestra sus efectos beneficiosos en el terreno cardiovascular. Así mismo, en su faceta de inhibidora de la proliferación podría jugar un papel importante en el campo del cáncer (198).

2.4.3. ApoD y estrés oxidativo.

Un incremento del estrés oxidativo está estrechamente asociado con inflamación, resistencia a la insulina, diabetes y aterosclerosis. ApoD tiene un papel importante en el estrés oxidativo. Do Carmo et al. (200) mostraron en cultivos de fibroblastos NIH/3T3 que la expresión de ApoD está inducida en respuesta al estrés celular independientemente de si el estrés estaba causado por estimulación lipopolisacárida, tratamiento con H₂O₂ o irradiación con luz UV. Por otro lado, estos mismos autores mostraron que la ApoD confiere un efecto neuroprotector en cerebro de ratón. Demuestran que la sobreexpresión de ApoD humana en neuronas de ratones, respecto a los controles, eran más resistentes, con una supervivencia tres veces mayor, en respuesta a encefalitis inducida por coronavirus humano (201). Ganfornina et al. demuestran que la sobreexpresión de ApoD protege a las células neuronales del estrés

oxidativo debido a la capacidad de la ApoD de prevenir la peroxidación lipídica en las células (202).

En estudios llevados a cabo en modelos animales (en concreto en la mosca *Drosophila melanogaster* y en el ratón), en los que se ha modificado genéticamente la expresión de ApoD, el déficit de ApoD conlleva defectos del comportamiento y muerte neuronal por apoptosis. Así mismo, hay una menor resistencia del SN ante estímulos que inducen estrés oxidativo. Por otra parte, la sobreexpresión de la lipocalina conduce a una mayor resistencia a factores que inducen un aumento del estrés oxidativo (202–204).

La ApoD es una proteína con múltiples funciones dependiendo de la localización en la que se exprese. El hecho de que sea además multiligando no nos permite reseñar una función específica para esta proteína, por lo que aún son necesarios múltiples estudios para desentrañar el papel funcional de ApoD en los diferentes niveles en los que actúa. Lo que sí podemos afirmar es que tiene un papel importante en las patologías del SNC y si aún no podemos afirmar que actúa como neuroprotector o como neurotóxico, si podemos reseñar que se comporta como una proteína de fase aguda, elevándose ante el daño neuronal.

Por otro lado, parece que el estrés oxidativo induce la expresión de ApoD en el sistema nervioso (202). Esto unido al hecho de que muchas de las patologías citadas anteriormente cursan con un aumento del estrés oxidativo, hace pensar que esta lipocalina juega un papel relevante en el control de dicho estrés cuando aparece en condiciones patológicas.

Las evidencias obtenidas en modelos animales apoyan esta hipótesis. Se trata concretamente de experimentos llevados a cabo en la mosca *Drosophila* y en ratones. En la mosca la proteína Glial Lazarillo (GLaz) es la homóloga de ApoD. En moscas mutantes para GLaz que inactivan su expresión se encuentra una mayor muerte y degeneración neuronal ante un estímulo que induzca estrés oxidativo. Por el contrario, en moscas con exceso de ApoD podemos ver como hay una mayor resistencia al estrés oxidativo (204). En experimentos llevados a cabo en ratones knock-out de ApoD (en los

que el gen está inactivado) se ha comprobado que estos poseen igualmente una menor resistencia al estrés oxidativo así como alteraciones comportamentales (202).

2.4.4. ApoD y aterosclerosis.

Sarjeant et al. (198) sometió finas secciones de arterias coronarias de humano a inmunohistoquímica anti-apoD. Se visualizó un incremento de depósitos de ApoD en las placas ateromatosas. De acuerdo con este descubrimiento, se localizó ApoD en lesiones de ratones knockout para ApoE. Por tanto, se demostraron depósitos de ApoD junto con excesivo colesterol en lesiones ateroscleróticas tanto de humano como de ratón. Esto corrobora la capacidad de ApoD para unir y transportar colesterol, lo cual hace pensar que la ApoD tiene un papel significativo en la patogénesis de la aterosclerosis. Un depósito excesivo de ApoD en lesiones ateroscleróticas puede derivar de una respuesta compensatoria de ApoD para facilitar la retirada de colesterol de células periféricas o resultar como consecuencia de defectos en el transporte de colesterol mediado por ApoD. Por tanto, no queda totalmente aclarado si el papel de la ApoD es contribuir o proteger del desarrollo de la aterosclerosis (194).

2.4.5. ApoD en el sistema nervioso.

Podemos encontrar ApoD tanto en el Sistema Nervioso Central (SNC) como en el nervio periférico (SNP) y forma parte del escaso grupo de apolipoproteínas que se sintetizan en el SN junto a la Apo E, J y C-I (188).

El papel de ApoD como transportadora de moléculas lipídicas sugiere que podría desempeñar una importante función en el transporte de lípidos durante la regeneración neuronal (188).

La ApoD se acumula en el nervio periférico tras la lesión del mismo. Su concentración allí es mucho mayor que el resto de las apolipoproteínas y además se ha demostrado que se sintetiza localmente y que no proviene del torrente sanguíneo, como es el caso de la Apo A-I y la Apo A-IV. En la lesión del nervio ciático de rata su

concentración está aumentada 500 veces en relación a la basal y su mRNA está elevado hasta 40 veces. Su misión podría ser la del transporte de colesterol para la remielinización y la formación de nueva membrana. Además, podría transportar bilirrubina, la cual se encuentra en los nervios dañados, previniendo así la acumulación tóxica de la misma (188).

En los animales adultos la expresión de ApoD se localiza principalmente en las células piales y perivasculares, astrocitos y oligodendrocitos y de forma inconstante en las neuronas (188).

En el Sistema Nervioso ApoD podría participar en los procesos de regeneración y remielinización. También se ha propuesto la función de transportadora de lípidos y otras sustancias a través de la barrera hematoencefálica. También podría desempeñar una función relevante en el mantenimiento de los niveles apropiados de colesterol en compartimentos no expuestos directamente a la sangre. Por último, también se ha propuesto como función de esta lipocalina el transporte local de hormonas esteroideas, las cuales modulan la formación de las conexiones sinápticas (188).

2.5. PARAOXONASA-1

La paraoxonasa-1 (PON1) es una enzima unida a HDL, calcio dependiente, sintetizada en el hígado y secretada al torrente sanguíneo. Esta enzima cataliza la hidrólisis de múltiples compuestos, como organofosfatos, arilésteres y lactonas. Muchas de las funciones anti-aterogénicas del HDL se le atribuyen a la PON1 que va asociada. La PON1 aumenta el flujo de colesterol de los macrófagos a través del transportador ABCA1 para proteger a las LDL de la oxidación al disminuir los niveles de lípidos peroxidados, para disminuir la ingesta de LDLox por parte de los macrófagos (evitando así la formación de células espumosas), para inhibir la biosíntesis de colesterol en los macrófagos y para inhibir la oxidación de las HDL y así preservar su función. Se han observado niveles más bajos de PON1 en pacientes con hipercolesterolemia, diabetes y enfermedad cardiovascular. Se ha observado que ratones con déficit de PON1 son más susceptibles de padecer aterosclerosis. La sobreexpresión de PON1 en ratones

transgénicos inhibe el desarrollo de aterosclerosis. Los niveles de PON1 se regulan a través de la genética, la nutrición y la farmacología (205).

La familia paraoxonasa (PON) consta de 3 genes (PON1, PON2 y PON3), que tienen similares propiedades antioxidantes pero diferentes perfiles de expresión: PON1 y PON3 se expresan en hígado y circulan en asociación estrecha con apolipoproteína A-1 en la lipoproteína de alta densidad (HDL), mientras PON2 se expresa en diferentes tipos de tejidos y células incluyendo las células de la pared arterial. Los polimorfismos de PON se asocian con aterosclerosis, diabetes, cáncer de próstata, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y pérdida auditiva adquirida. Se sugiere que los genes de las paraoxonasas, involucrados en el estrés oxidativo y la inflamación, juegan un papel clave en el comienzo y progresión de las placas de aterosclerosis (206,207).

Las PON1 y PON3 se acumulan específicamente en los macrófagos de la pared arterial a medida que la placa progresa de estría grasa a lesión más avanzada. El acúmulo de PON1 en la placa sugiere que aporta un mecanismo protector frente al incremento de la oxidación y sus niveles se elevan a medida que progresa el estadio de la placa (205).

Es una proteína antioxidante que protege a las LDL de la oxidación y que pierde su actividad en un ambiente oxidativo. De entre los sistemas de oxidación, el sistema ascorbato/ Cu^{2+} es el más potente inactivando la PON1, así como la PON1 unida a HDL (HDL-PON1). La inactivación por Fe^{2+} es limitada, mientras que la inclusión de Cu^{2+} potencia de forma considerable la inactivación de PON1 en presencia de ascorbato. La oxidación catalizada por metales puede ser un factor primario que disminuye la actividad de la HDL-PON1 en un ambiente de estrés oxidativo. La inactivación de PON1 inducida por radicales puede ver disminuida su acción antioxidante frente a la oxidación de las LDL (208).

2.6. OSTEOPONTINA

La osteopontina (OPN), un pequeño ligando que se une a integrina, es una glicoproteína N-ligada perteneciente a la familia SIBLING. Los miembros de la familia

SIBLING (*small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein*, proteínas N-glucosiladas con ligandos de unión de integrina) son glicoproteínas sintetizadas por células óseas con actividad de conexión celular. Estas proteínas son la osteopontina, la sialoproteína, la proteína de la matriz dentaria-1, sialofosfoproteína dentaria y fosfoglicoproteína extracelular de la matriz. Su función es fomentar la conexión celular a través de adhesiones focales estables o transitorias a macromoléculas extracelulares, que están mediadas por receptores de la superficie celular que posteriormente se traducen en señales intracelulares. Estas proteínas fijan los osteoclastos en el hueso y, además de mantener la conexión celular, fijan el Ca^{2+} mediante secuencias de aminoácidos poliácidos (209,210).

Fue identificada por primera vez en 1986 como una proteína de la matriz del hueso en los osteoblastos y se expresa en varias células inmunes y vasculares. Se secreta a los fluidos para llevar a cabo su función multi-dominio. Se encuentra en cerebro, hígado, tracto gastrointestinal, pulmones, hueso, corazón, articulaciones y riñones, así como en fluidos biológicos como la sangre, orina, leche y líquido seminal. En condiciones normales, la OPN se expresa en preosteoblastos, osteoblastos, osteocitos, células musculares lisas y células endoteliales. En condiciones proinflamatorias o de cicatrización de heridas, la expresión de OPN se incrementa cerca de las células inflamatorias. La OPN se produce como una citoquina en células T activadas y macrófagos, lo cual sugiere que tiene un papel importante en la modulación de la inflamación. En estudios clínicos de pacientes con inflamación crónica, enfermedad autoinmune, o cáncer, los niveles séricos de OPN se incrementan y estos pacientes son más propensos a desarrollar calcificación vascular que aquellos con bajos niveles séricos de OPN. Por todo esto, se piensa que la OPN participa en la inflamación, aterosclerosis y calcificación vascular y que tiene importancia en la progresión de la enfermedad vascular (211).

2.6.1. Osteopontina e inflamación.

En muchos tejidos se ha visto que la OPN está implicada en importantes procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo la reparación del tejido, la inflamación y

la fibrosis (212). La OPN se asocia con la migración y proliferación y regula la quimiotaxis de la célula inflamatoria.

La OPN se expresa en macrófagos y células derivadas de los macrófagos, pero no en monocitos circulantes. Favorece el reclutamiento de monocitos/macrófagos y regula la producción de citoquinas en estas células en condiciones de inflamación (211). En modelo de ratas con enfermedad renal progresiva, la reducción de la biodisponibilidad del óxido nítrico por inhibición de la NO sintasa incrementó la infiltración de los macrófagos, la inflamación renal y la fibrosis mediante la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona en la corteza renal. La expresión de OPN se incrementó en la corteza y se correlaciona con el número de macrófagos infiltrados. En este modelo los antagonistas de la aldosterona suprimen la expresión de OPN (213).

Su expresión en vasos sanguíneos y corazón sanos es muy baja, pero aumenta considerablemente en respuesta al daño y predice una función cardiaca pobre. En el riñón normal humano, las células tubulares distales incrementan la expresión de OPN en las glomerulonefritis (214). La OPN incrementa la adhesión y la infiltración y es un intermediario de la inflamación en áreas dañadas.

La expresión de la OPN se correlaciona con la fibrosis asociada a la inflamación. Las células inflamatorias son reclutadas durante la reparación del tejido para defenderse de microbios invasores y esto provoca una respuesta de fibrosis y cicatrización de las heridas. En modelo de piel dañada, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)-BB de los macrófagos, induce la expresión de OPN en fibroblastos provocando la fibrosis. Esto indica que la OPN inhibe la restauración del tejido pero produce fibrosis de la herida (211).

2.6.2. Osteopontina y aterosclerosis.

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico que conduce a la formación de la placa en condiciones de disfunción endotelial y elevados niveles de colesterol en sangre. Estas placas tienen un componente inflamatorio importante con macrófagos infiltrados y otras células del sistema inmune. La OPN se encuentra en lesiones

ateroscleróticas, especialmente asociada con los macrófagos y células espumosas (foam cell), lo cual sugiere que la OPN participa en la progresión de la aterosclerosis, el remodelado vascular y la reestenosis (211,215).

Los pacientes urémicos tienen niveles elevados de OPN, no sólo en plasma correlacionándose con la calcificación coronaria, sino también en células de músculo liso de aorta y macrófagos que rodean a las placas ateromatosas, identificándose células que expresan mRNA de OPN (214). Se encuentra como componente de las placas ateromatosas y está asociado con su calcificación. La expresión de mRNA en las placas parece estar fuertemente asociado con la severidad de la aterosclerosis. Los niveles plasmáticos de OPN se correlacionan con la extensión de la aterosclerosis coronaria y tiene implicación en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular (216).

La OPN tiene múltiples efectos que pueden acelerar la aterosclerosis en pacientes con uremia y se expresa en gran cantidad en macrófagos de las lesiones, en células de músculo liso y en células endoteliales (211,217). La OPN incrementa el reclutamiento, migración y adhesión de los macrófagos y modula la expresión de citoquinas proinflamatorias e interleuquinas, procesos conocidamente implicados en la aterogénesis. En las células de músculo liso, la expresión de OPN se incrementa en respuesta al daño arterial in vivo y a la estimulación con LDL oxidadas in vitro (218). La expresión de OPN se incrementa durante la desdiferenciación de las células de músculo liso, proceso clave en la aterogénesis. Esta desdiferenciación se caracteriza por un cambio de fenotipo de contractilidad a fenotipo sintético. Esto se asocia con cambios específicos en los patrones de expresión de genes y proteínas, como el factor de transcripción miocárdica y otros genes, incluyendo la actina de músculo liso- α (219). Jiménez-Corona et al. (220) emplearon la hipercolesterolemia para analizar la relación entre el proceso de calcificación vascular y la sobreexpresión de la OPN en la neoíntima de las placas ateroscleróticas en modelo de conejo. Esto demuestra in vivo el papel regulador la OPN en el depósito de fosfato cálcico en la íntima en respuesta al estrés oxidativo.

La OPN puede sufrir escisiones por acción de metaloproteinasas de la matriz y por trombina. La trombina rompe la OPN en dos fragmentos, N-terminal y C-terminal, los cuales mantienen actividad biológica. El fragmento N-terminal contiene unos

motivos de adhesión que lo hacen más proinflamatorio que la OPN sin fragmentar, mientras que las propiedades del fragmento C-terminal son menos conocidas. Wolak et al. (221) observaron que el fragmento N-terminal de la OPN se asocia más con la inflamación de la placa en pacientes hipertensos que el fragmento C-terminal y la OPN íntegra.

Se ha visto que el suero de pacientes urémicos incrementa la expresión de OPN en células de músculo liso bovinas, el depósito mineral y la calcificación de forma similar a lo que ocurre en las arterias de pacientes en diálisis. Sin embargo, al neutralizar los anticuerpos directamente contra OPN se inhibe el engrosamiento de la neoíntima de carótida de rata tras la denudación endotelial (222,223). Además, la deficiencia de OPN inhibe la formación de lesiones ateroscleróticas e inflamatorias en ratones deficientes en ApoE (ApoE^{-/-}) (224), mientras que la expresión de OPN en ratones transgénicos alimentados con una dieta rica en colesterol induce y acelera la formación de lesiones tipo estría grasa e inhibe la producción de IL-10 en los macrófagos, lo cual sugiere que la OPN tiene un papel importante en el desarrollo de estrías grasas in vivo (225).

La inhibición del exceso de OPN parece conferir protección tanto en enfermedad cardiovascular como en enfermedad renal en estadio terminal tal y como se muestra en la Figura 11. La OPN es un reciente regulador del desarrollo de vasculopatía asociada a aterosclerosis (214).

La OPN es útil como biomarcador novedoso para enfermedad cardiovascular. En pacientes con enfermedad arterial coronaria, los niveles plasmáticos de OPN incrementan al aumentar el estrés oxidativo, por lo que puede considerarse un marcador de aterosclerosis. En pacientes con fallo cardíaco, la OPN plasmática aumenta drásticamente comparado con controles sanos. Sin embargo, los mecanismos moleculares de expresión de la OPN no están del todo aclarados (211,226–228).

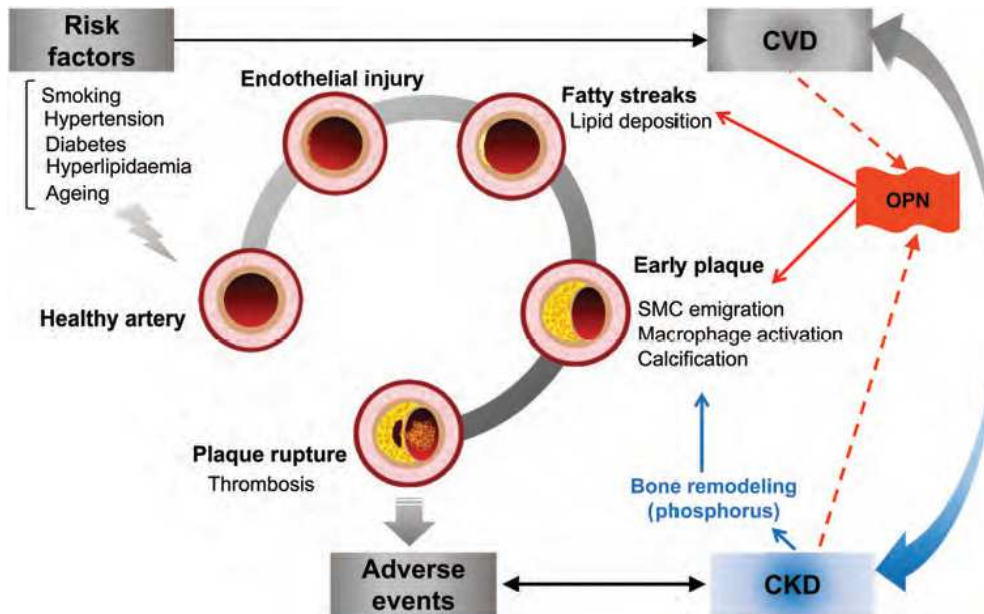


Figura 11. Participación de la osteopontina (OPN) en diferentes fases de la enfermedad cardiovascular (CVD) y progresión de la placa. La enfermedad renal crónica (CKD) puede inducir calcificación al incrementar los niveles de OPN y otros mediadores de la mineralización del hueso. SMC: células musculares lisas.

2.7. APOLIPOPROTEÍNA A1 Y APOLIPOPROTEÍNA B.

Las apolipoproteínas son los componentes de las lipoproteínas. La apolipoproteína B (ApoB) refleja la concentración de las LDL, partículas potencialmente aterogénicas, mientras que la apolipoproteína A1 (ApoA1) refleja la concentración de HDL (229). La ApoB es necesaria para transportar lípidos desde el hígado e intestino hasta los tejidos periféricos. Forma parte de la estructura de quilomicrones, VLDL, IDL (lipoproteínas de densidad intermedia), LDL y LDL pequeñas y densas (230). La insulina tiene un papel regulador de la ApoB, disminuye su secreción promoviendo la degradación de ApoB en el hepatocito y aumenta su aclaramiento de la circulación. Por tanto, en diabéticos tipo 2 en los que existe una resistencia a la insulina, se ve aumentada la secreción de ApoB y disminuye su aclaramiento, aumentando así el riesgo de desarrollar aterosclerosis (231).

En la dislipemia, se acepta que niveles bajos de ApoA1 y altos de ApoB son factores de riesgo de enfermedad arterial coronaria. Las concentraciones de los lípidos

pueden alterarse con la dieta, sin embargo, las concentraciones de las apolipoproteínas no se afectan, por lo cual tampoco es necesario medirlas en ayunas (229).

2.7.1. Apolipoproteínas en suero.

El HDL puede dar medidas falsamente inferiores a la realidad, ya que la composición de colesterol en las HDL puede variar en función de procesos fisiológicos o patológicos. Por tanto, la medida de ApoA1 es mejor predictor de infarto que los niveles de HDL. Las LDL son heterogéneas y están compuestas por partículas densas grandes y pequeñas. Sólo las partículas densas y pequeñas están asociadas con el riesgo de aterosclerosis. Contienen menos colesterol, por eso la medida de LDL no refleja de forma exacta la concentración en plasma. En cambio, la ApoB, que forma parte de las LDL, predice mejor el desarrollo de un infarto futuro. Las partículas aterogénicas VLDL, IDL y LDL contienen una molécula de ApoB cada una, por lo que midiendo la ApoB en plasma, sabremos con exactitud las moléculas aterogénicas que existen. Las apolipoproteínas tienen una buena sensibilidad, especificidad y exactitud en el diagnóstico, por tanto la ApoA1, ApoB y el ratio ApoB/ApoA1 se pueden utilizar como predictores de infarto en vez de fiarse sólo del perfil lipídico tradicional. Como resulta caro medir las ApoB en suero, Hwang et al. han desarrollado una fórmula para estimar su concentración basándose en medidas de colesterol total, HDL y triglicéridos (229,230).

El ratio ApoB/ApoA1 es un indicador del equilibrio entre el transporte de colesterol aterogénico y ateroprotector, que está independientemente asociado con la enfermedad cardiovascular. Este ratio predice de manera más exacta el riesgo vascular que ApoB o ApoA1 por separado y que otros índices de colesterol. Este ratio ha resultado ser mejor indicador de aterosclerosis coronaria oculta que la que es capaz de detectar la tomografía computerizada multidetector (MDCT) y los individuos con un ratio mayor de 0.58 serán buenos candidatos para realizar la MDCT (232).

El grosor de la íntima-media de las arterias carótidas es un marcador precoz de aterosclerosis y un factor de riesgo para el infarto de miocardio y el infarto cerebral. Huang et al. han demostrado que los niveles de ApoB y el ratio ApoB/ApoA1 se

asocian con el aumento del grosor de la íntima-media en población china con tolerancia normal a la glucosa (233).

Como ya es conocido, la concentración de HDL se correlaciona inversamente con la incidencia de enfermedad cardiovascular y se cree que protege frente al desarrollo de la aterosclerosis. La infusión o sobreexpresión genética de ApoA1 retrasa la progresión de las lesiones ateroscleróticas e incluso acelera la regresión de las mismas debido a que tiene efectos beneficiosos sobre el estado inflamatorio de la placa en modelos animales. La infusión de ApoA1 se ha estudiado también en pacientes con síndrome coronario agudo y enfermedad vascular periférica (234).

Se ha demostrado el papel de péptidos que mimetizan la acción de la ApoA1 puede tener un papel protector frente a la aterosclerosis, lo mismo que si se infunden HDL en sangre para aumentar los niveles de éstas. Además parece que la administración de péptidos miméticos de ApoA1 presenta ventajas frente a la infusión de HDL, ya que pueden administrarse por vía oral y su producción es más sencilla. Se asume que las proteínas miméticas tienen la misma función y propiedades que la ApoA1 y que esto se debe a su estructura secundaria, que es imitada por las proteínas miméticas aunque la secuencia primaria de la proteína es diferente. Los péptidos en tandem son más costosos pero tienen unas propiedades miméticas de ApoA1 superiores en relación con la activación de LCAT, el flujo de salida de colesterol y la asociación con las HDL. Existen diversas moléculas que intentan mimetizar la acción de ApoA1 pero no todas son igual de eficaces ni protegen de la aterosclerosis en la misma medida (235).

Basándose en que en la aterosclerosis existe una pérdida de tolerancia contra antígenos propios en la placa, que desencadena una respuesta autoinmune proinflamatoria, induciendo tolerancia frente a estos antígenos mediante inmunoterapia se conseguiría un efecto protector y se podría suprimir el efecto proaterogénico de las células T efectoras. En esta línea, Mundkur et al. (86) han visto que la administración de ApoB unido al péptido HSP60 induce tolerancia frente a ambos péptidos y se atenúa la inflamación en ratones. Si esta administración se hace por vía oral en combinación con modificaciones dietéticas, han comprobado que provoca la detención de la progresión de la placa y la estabiliza. La estabilización de la placa se relaciona con una reducción de la apoptosis.

Las HDL y la ApoA1 pueden sufrir modificaciones post-traslacionales que les conducen a la disfunción. La ApoA1 es una de las dianas de la oxidación mediada por la mieloperoxidasa que in vitro le conduce a la pérdida de su capacidad para retirar el colesterol (mediante el flujo reverso) de los macrófagos. Además, se han observado niveles elevados de ApoA1 modificados por mieloperoxidasa en pacientes con enfermedad arterial coronaria y en placas ateroscleróticas humanas. La infusión de ApoA1 en ratones hace que se asocie con HDL plasmáticas e incrementa sus niveles, de forma que favorece el flujo reverso del colesterol y tiene efectos beneficiosos en cuanto a composición de la placa y el estado inflamatorio de los macrófagos de la placa en un periodo de tratamiento a corto plazo. Debido a estos efectos, se podría utilizar ApoA1 por su potencial terapéutico para estabilizar placas vulnerables. Por otro lado, al disminuir los niveles de mieloperoxidasa también se evitaría la disfunción de la ApoA1 (234).

2.7.2. Apolipoproteínas en la placa aterosclerótica.

Por otra parte, las propiedades funcionales de la ApoA1 y HDL en la circulación no reflejan fielmente lo que ocurre en la pared arterial, ya que la distribución de partículas de HDL es diferente y la función de la ApoA1 también lo es. Las lipoproteínas aisladas en la pared arterial, particularmente las LDL, sufren alteraciones como la proteólisis, modificaciones oxidativas y lipólisis en mayor o menor medida. La ApoA1 recogida de lesiones arteriales ateroscleróticas es un objetivo para la modificación oxidativa generada por la mieloperoxidasa y los oxidantes derivados de NO. Esta modificación de ApoA1 y HDL puede ser comparable con la pérdida de actividad del flujo reverso del colesterol ejercido por la lipoproteína. Un aumento de ApoA1 modificada por oxidación se asocia con una disfunción del cassette A1 del transportador de membrana dependiente de ATP (ABCA-1), del cual depende la función de la lipoproteína implicada en el flujo reverso del colesterol, la actividad de la LCAT y la actividad proinflamatoria (236).

Entre las diferencias que existen entre los niveles de apolipoproteína en suero y en placa podemos destacar que la mayoría de la ApoA1 aislada de las lesiones puede

llegar a ser unas cien veces mayor, está reticulada en una proporción de 2/3 y que no toda la ApoA1 se encuentra asociada a HDL. En tejido normal aórtico se encontró que de forma similar la ApoA1 estaba pobremente acompañada de lípidos y que estaba reticulada en gran medida. Sin embargo, en el plasma, la ApoA1 se encuentra predominantemente asociada a HDL y está poco reticulada en la fracción de HDL comparada con la fracción pobre en lipoproteínas. La ApoA1 aislada en las lesiones ateroscleróticas resulta ser disfuncional, ya que tiene menor actividad aceptora de colesterol y por tanto menor capacidad de sacar el colesterol mediante el transporte reverso. Además, presenta una actividad LCAT menor al unir la ApoA1 de la placa al HDL que si se une ApoA1 del plasma al HDL (236).

2.7.3. ApoA1 e inflamación.

A parte de su papel en el flujo reverso del colesterol, la ApoA1 tiene efectos antiinflamatorios e interfiere con la peroxidación lipídica y los receptores inmunológicos innatos. Las propiedades antiinflamatorias se deben a la capacidad de inhibir la migración transendotelial de las células inmunes por reducción de la expresión de integrinas, para inhibir la activación de monocitos y la producción de citoquinas inducidas por el contacto con células T y para interferir con los receptores inmunológicos. Durante la inflamación crónica las HDL pueden perder algunas de sus funciones protectoras frente a la aterosclerosis y convertirse en disfuncionales o incluso adquirir propiedades proinflamatorias. Las modificaciones postraslacionales de la ApoA1 transforman a esta molécula antiinflamatoria en proinflamatoria. Estos cambios estructurales consisten en cloración, nitración y carbamilación de aminoácidos por acción de la mieloperoxidasa, oxidación de carbonilos reactivos y glicación. Estas modificaciones, en consonancia con lo comentado en el apartado anterior, se traducen en una inhibición de la LCAT y del flujo de salida del colesterol a través del transportador ABCA-1 (237,238).

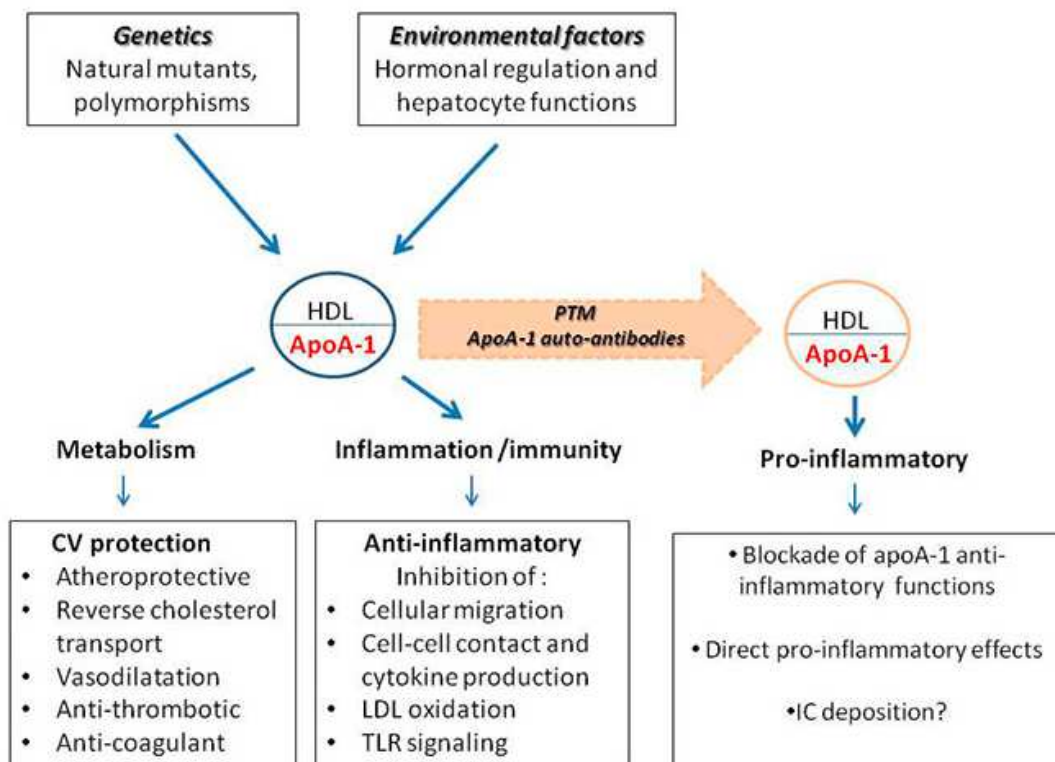


Figura 12. Se muestra el papel antiinflamatorio y proinflamatorio de la ApoA1/HDL. CV: cardiovascular. IC: inmunocomplejos. HDL: high density lipoprotein. PTM: modificaciones postraslacionales. TLR: receptor Toll-like (237).

Las propiedades de ApoA1 como molécula inflamatoria son: la inhibición de la migración transendotelial de las células inmunocompetentes, la inhibición de la activación de monocitos mediada por el contacto con células T, inhibición de la peroxidación lipídica, modulación de la respuesta inmune innata y de los receptores Toll-like y modulación de la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, en la inflamación tanto aguda como crónica, las HDL se vuelven proinflamatorias, fenómeno explicado inicialmente por el reemplazo de ApoA1 por proteína amiloide sérica A, ceruloplasmina y haptoglobina. Estas partículas de HDL son más fácilmente retenidas en la pared arterial y así se facilita la interacción con proteoglicanos vasculares y están más expuestas a modificaciones oxidativas. Como se ha explicado anteriormente, las ApoA1 modificadas postraslacionalmente se convierten igualmente en moléculas proinflamatorias (237).

2.8. FOSFOLIPASA A2

La fosfolipasa A2 unida a lipoproteína (Lp-PLA2) se reconoce por su acción en la hidrólisis del factor activador de plaquetas (PAF). El PAF es un fosfolípido activo relacionado con reacciones fisiológicas y patológicas. La PLA2 citosólica actúa primeramente en la membrana fosfolipídica produciendo lisofosfolípidos, después estos lisofosfolípidos son modificadas por la PAF acetiltransferasa dando lugar al PAF (239).

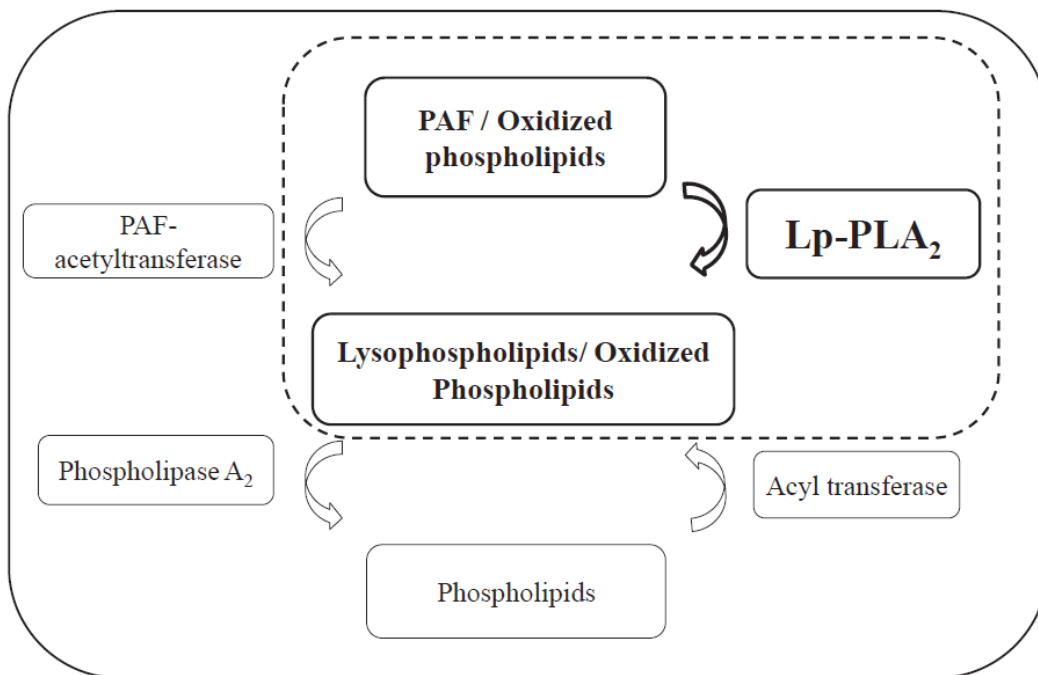


Figura 13. Papel de la PLA2 en la síntesis de lisofosfolípidos.

La Lp-PLA2 fue descubierta en 1980 y se clasificó como una enzima independiente del Ca^{2+} , producida por una variedad de células inflamatorias y no inflamatorias. Se considera miembro de la familia de las fosfolipasas (PLA2), aunque tiene diferentes propiedades comparada con otras PLA2. La Lp-PLA2 es específica de la rotura de PAF y residuos ácido graso oxidados, mientras que la PLA2 es específica para fosfolípidos que tienen dos grupos acilo de cadena larga (239,240).

La Lp-PLA2 se presenta en dos formas diferentes, la Lp-PLA2 secretada al sistema circulatorio y la Lp-PLA2 presente en la placa aterosclerótica. Tras ser

producida por los macrófagos en la placa, la Lp-PLA2 pasa a la circulación convirtiéndose en Lp-PLA2 secretada (240). Esta forma plasmática, circula en asociación con LDL en un 70-85% y en menor proporción, 15-30%, unida a HDL, lo cual hace que su actividad esté en relación con las concentraciones de colesterol. Se ha extraído de plasma y eritrocitos humanos, cerebro, hígado y plasma seminal bovino, plasma y líquido peritoneal de cerdo, plasma y plaquetas de ratón (239,240). Aunque tanto la forma secretada como la asociada a lipoproteína catalizan la hidrólisis de lipoproteínas generando mediadores lipídicos, la forma secretada tiene un papel mayor en la modificación de las LDL (241), se une a la porción ApoB de las LDL e hidroliza las LDL dando lugar a lisofosfatidilcolina y ácido araquidónico (240).

2.8.1. Fosfolipasa A2 como agente antioxidante.

El estrés oxidativo, como hemos indicado, está íntimamente asociado con la inflamación y la formación de lípidos bioactivos. Estos lípidos, como PAF y fosfolípidos oxidados, han sido identificados en la placa aterosclerótica. Cuando se daña la membrana celular por el estrés oxidativo, de los fosfolípidos derivan residuos más cortos peroxidados que pueden mimetizar la acción del PAF. La Lp-PLA2 se encarga de eliminar estos fragmentos de fosfolípidos oxidados actuando así como un agente antioxidante. Matsuzawa et al. (242) sugieren que la sobreexpresión de Lp-PLA2 protege a las células de las especies reactivas de oxígeno (ROS), que inducen apoptosis a través de la hidrólisis de fosfolípidos oxidados. Además, la formación de fosfolípidos oxidados en las LDL parece estimular la actividad de la Lp-PLA2.

Por otra parte, Lourida et al. (243) demostraron que la actividad de la Lp-PLA2 es importante para reducir la inmunogenicidad de las LDLox, un fenómeno que puede atribuirse al descenso de fosfolípidos oxidados en pacientes con enfermedad arterial coronaria y en sanos. Se ha llegado a proponer la Lp-PLA2 recombinante como una potencial herramienta dirigida a la terapia antiaterogénica.

2.8.2. Lp-PLA2 e inflamación.

Múltiples células inflamatorias involucradas en la aterosclerosis secretan Lp-PLA2, como son los monocitos, macrófagos, neutrófilos, mastocitos que derivan de la médula ósea activada y plaquetas activadas. Cuando la Lp-PLA2 hidroliza los lípidos bioactivos reduciendo su actividad biológica, la mayoría de metabolitos generados son lisofosfolípidos, mayoritariamente lisofosfatidilcolina. Estos lípidos están implicados en el proceso aterosclerótico y muestran un papel deletéreo de la Lp-PLA2, contribuyendo a la respuesta inflamatoria frente a las lipoproteínas oxidadas (239,244). La lisofosfatidilcolina induce la expresión de moléculas de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) en la pared vascular, CD8 y CD11 en la superficie de neutrófilos e intensifica la proliferación de células musculares lisas vasculares dependiente de la vía proteín-quinasa activada por mitógenos (245). Los lisofosfolípidos que provienen de la apoptosis favorecen la atracción de monocitos y primariamente macrófagos. Al comprobar que si se inhibe la Lp-PLA2, disminuyen los lisofosfolípidos, éstos últimos se propusieron como biomarcadores de la intensidad de la producción de ROS en el lugar de la inflamación. Los pacientes con aterosclerosis coronaria incipiente presentan niveles más elevados de lisofosfatidilcolina comparado con sujetos control. En placas ateroscleróticas carotídeas de pacientes sintomáticos, los niveles de Lp-PLA2, lisofosfolípidos, macrófagos y colágeno eran mayores que en pacientes asintomáticos (239,246). Sin embargo, otros autores afirman que la actividad de Lp-PLA2 no está asociada a la aterosclerosis ni a los eventos clínicos aunque sugieren que la PLA2 secretada sí se puede asociar a eventos cardiovasculares (241).

2.8.3. Lp-PLA2 y aterosclerosis.

En cuanto al papel de la Lp-PLA2 en la aterosclerosis, ha existido cierta controversia, ya que se han defendido tanto los efectos antiaterogénicos como los proaterogénicos. Primeramente, se reconocía la Lp-PLA2 como enzima antiaterogénica por su capacidad de hidrolizar el PAF y colesterol LDL, ambos perjudiciales para la pared vascular. En esta línea, se ha demostrado en modelos animales que un incremento de Lp-PLA2 en suero puede mitigar la inflamación vascular. Además, la reducción de Lp-PLA2 debido a mutaciones sin sentido conducen a un incremento del riesgo

cardiovascular. Por otro lado, más recientemente, se ha visto en muchos estudios que ganan los argumentos a favor del papel proaterogénico de la Lp-PLA2. El incremento de actividad o de masa de Lp-PLA2 se asocia a severidad en la aterosclerosis y a aumento del riesgo cardiovascular independiente (240,244,245).

Ambas clases de fosfolipasas, la secretada y la unida a lipoproteína, se encuentran incrementadas en placas de aterosclerosis avanzadas y se han asociado con signos de inflamación y vulnerabilidad. Lind et al. sugieren que la actividad de la PLA2 secretada, pero no la Lp-PLA2, se asocia al grado de aterosclerosis ya que es la que se asocia de manera más significativa con la respuesta inflamatoria (241).

Sin embargo, otros autores mantienen que la Lp-PLA2 es la forma implicada en la aterosclerosis. La fosfatidilcolina presente en las LDLox potencia la expresión del inhibidor del activador de plasminógeno-1. La lisofosfatidilcolina contribuye a la calcificación de células vasculares en la placa aterosclerótica a través de la regulación de genes y proteínas osteogénicas (239).

Tanto la lisofosfatidilcolina como los ácidos grasos no esterificados oxidados favorecen el estrés oxidativo, la disfunción endotelial, afectan a la proliferación y supervivencia de las células musculares lisas vasculares, promueven la acumulación tisular de macrófagos, aumentan la respuesta inflamatoria a través de citoquinas, aumentan la expresión de metaloproteinasas, expanden el núcleo lipídico necrótico y adelgazan la cápsula fibrosa (240).

Aunque la Lp-PLA2 se acumula en la pared vascular con la retención de partículas de LDL, los macrófagos son la mayor fuente activa de Lp-PLA2 en la pared vascular. La Lp-PLA2 puede ser un mediador de modificaciones secundarias de LDL y estrés oxidativo, por lo que en está implicada en la respuesta oxidativa a la inflamación (246). Por tanto, la Lp-PLA2 está implicada en el proceso aterosclerótico.

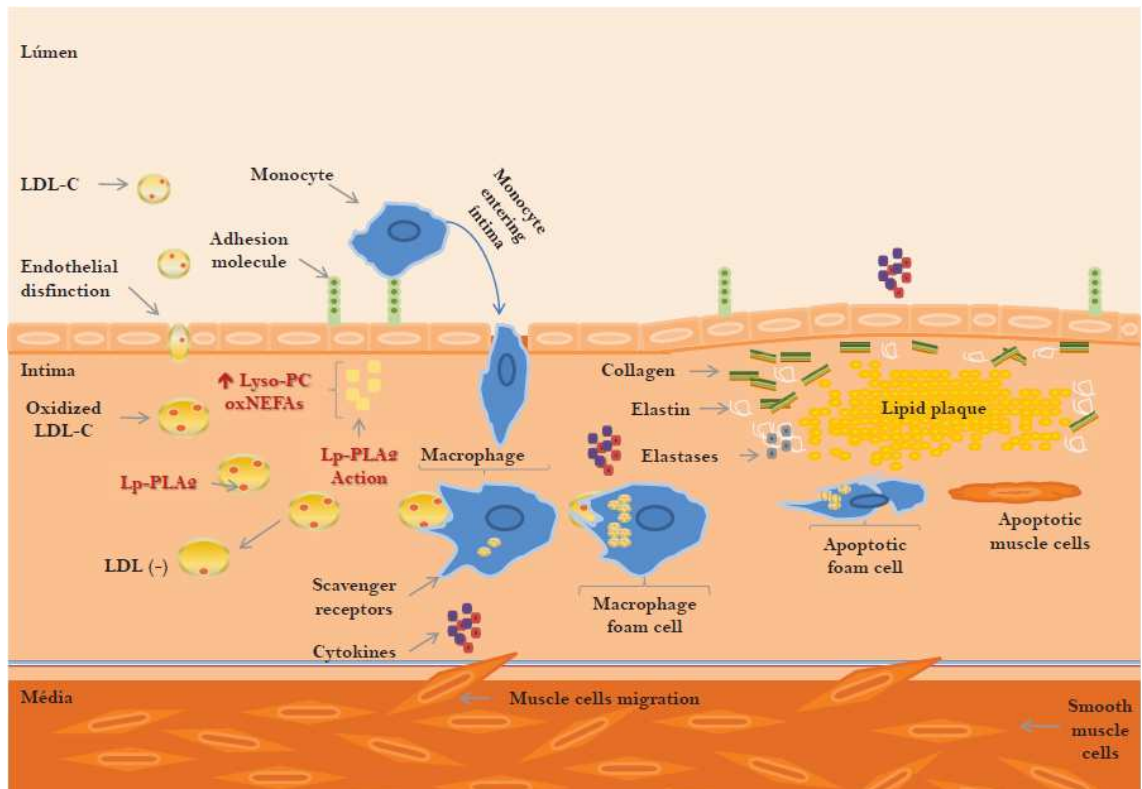


Figura 14. Acciones de la Lp-PLA2 en el proceso aterosclerótico (239).

En un paciente susceptible a aterosclerosis por presentar factores de riesgo como dislipemia, obesidad, hipertensión, resistencia a la insulina y estrés oxidativo, es más probable que aparezca disfunción endotelial, lo que hace que aumente la expresión de moléculas de adhesión y queden espacios más grandes entre las células endoteliales (ver figura 14). En esta situación, las LDL, macrófagos y linfocitos T migran a través de la íntima arterial. Como ya explicamos en otro apartado anterior las LDL son más susceptibles a la oxidación y la reducción de antioxidantes favorece la producción de radicales libres y, consecuentemente, la modificación de las LDL. En este contexto, la Lp-PLA2 se activará gracias a los fosfolípidos oxidados presentes en las LDLox. La enzima minimiza las modificaciones de las LDLox hidrolizando sus fosfolípidos oxidados, lo cual se interpreta como una acción antioxidante (239).

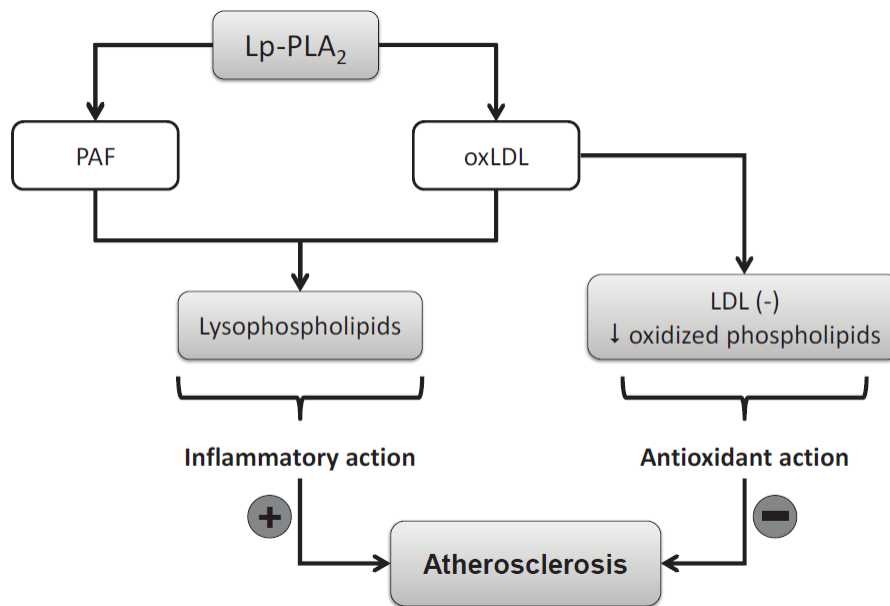


Figura 15. Acción de la Lp-PLA2 en la aterosclerosis (239).

Sin embargo, durante este proceso se producen grandes cantidades de lisofosfolípidos y ácidos grasos esterificados no oxidados que promueven la expresión de moléculas de adhesión y atraen macrófagos a la íntima. También estimulan la producción de citoquinas que incrementan el perfil inflamatorio de la placa. Las células musculares también son atraídas y producen colágeno, elastina y elastasas que estabilizan la placa lipídica (239,246). En este proceso, la presencia de LDLox y lisofosfolípidos y ácidos grasos esterificados no oxidados producidos por la Lp-PLA2, estimulan el crecimiento de la placa y son factores que pueden ser decisivos para que la placa se rompa y desencadene un evento cardiovascular (50,239). Cavigiolio et al. (247) han identificado una actividad proteolítica diferente de la PLA2, que es específica para ApoA1 y puede contribuir al catabolismo de la ApoA1 en la inflamación y en la aterosclerosis.

Recientes estudios patoanatómicos han confirmado que la expresión de la Lp-PLA2 está aumentada en la placa a medida que ésta progresa y que estas placas resultan más vulnerables y, por tanto, más sintomáticas y con más complicaciones. Además, la expresión de Lp-PLA2 y lisofosfatidilcolina (indicador de la actividad enzimática de Lp-PLA2) en la placa es mayor en pacientes con futuros eventos cardiacos y es un predictor de riesgo cardiovascular a largo plazo independientemente del número de predictores bien establecidos como el tabaco o el infarto previo (244,246).

2.8.4. Lp-PLA2 como marcador de riesgo cardiovascular.

Respecto a la utilización de la Lp-PLA2 como marcador de riesgo cardiovascular, se publicó una guía consenso con recomendaciones para incorporar este test en 2008 (48). Está avalado por la American Heart Association/Centers for Disease Control (AHA/CDC) y está en coherencia con la guía ATP III (Adult Treatment Panel III). Recomienda el uso de Lp-PLA2 como marcador de inflamación junto con los tradicionales factores de riesgo en pacientes con riesgo de 10 años moderado y alto. Parece ser un biomarcador altamente específico para la inflamación vascular. Se ha definido un punto de corte apropiado para Lp-PLA2 superior a 200 ng/mL (240). En pacientes con Lp-PLA2 en niveles altos se recomienda disminuir los niveles de colesterol LDL unos 30 mg/dL independientemente de los niveles de base que tuviera el sujeto. Por tanto, se puede recomendar Lp-PLA2 como test diagnóstico de inflamación vascular para identificar mejor a los pacientes que están en alto o muy alto riesgo y que más se pueden beneficiar de una intensificación de la terapia hipolipemiente (48).

Nambi et al. (248) indican que en estudios clínicos la combinación de Lp-PLA2 con PCR de alta sensibilidad clasifica el riesgo cardiovascular mucho mejor que la PCR de alta sensibilidad sola. En esta línea, como posible terapia para disminuir el riesgo cardiovascular, se ha probado el darapladib, un inhibidor oral específico de Lp-PLA2, en investigación básica y estudios preclínicos con resultados prometedores (244,249). Al disminuir la actividad o la masa de Lp-PLA2 gracias al darapladib o a las estatinas, el volumen del núcleo necrótico y el número de macrófagos y células espumosas disminuye profundamente comparado con el grupo control (240).

Un metaanálisis muestra que la actividad de la Lp-PLA2 está positivamente correlacionada con colesterol no-HDL, colesterol LDL, ApoB y loge triglicéridos, mientras que se correlaciona inversamente con colesterol HDL y ApoA1. Esto indica que el efecto aterogénico de la Lp-PLA2 está asociada con los lípidos convencionales aterogénicos (250).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

El estrés oxidativo, ya conocido como factor favorecedor del desarrollo de aterosclerosis, se puede medir a través de diferentes productos de reacciones de oxidación-reducción. En este trabajo, se ha cuantificado de forma directa a través de las LDL oxidadas y mieloperoxidasa, y de forma indirecta, mediante niveles de moléculas implicadas en los procesos oxidativos que ocurren en la célula, como son β -carotenos, vitaminas A, E y C, licopeno y paraoxonasa-1. Además, se han estudiado moléculas implicadas en los procesos inflamatorios, promotores de la formación de la placa aterosclerótica, como son la PCR, osteopontina, fosfolipasa A2, lipoproteína(a) y ApoD.

En esta línea, se estudia igualmente el metabolismo lipídico, ya que representa un pilar fundamental en el desarrollo de la aterosclerosis. Las partículas aterogénicas VLDL, IDL y LDL contienen una molécula de ApoB cada una, por lo que midiendo la ApoB en plasma, sabremos con exactitud las moléculas aterogénicas que existen. El ratio ApoB/ApoA1 es un indicador del equilibrio entre el transporte de colesterol aterogénico y ateroprotector, que está independientemente asociado con la enfermedad cardiovascular.

La ApoD es una proteína con múltiples funciones dependiendo de la localización en la que se exprese. El hecho de que sea además multiligando no nos permite reseñar una función específica para esta proteína, por lo que aún son necesarios múltiples estudios para desentrañar el papel funcional de ApoD en los diferentes niveles en los que actúa. Lo que sí podemos afirmar es que tiene un papel importante en las patologías del SNC y si aún no podemos afirmar que actúa como neuroprotector o como neurotóxico, si podemos reseñar que se comporta como una proteína de fase aguda, elevándose ante el daño neuronal.

El estrés oxidativo induce la expresión de ApoD en el sistema nervioso. Esto, unido al hecho de que muchas de las patologías citadas anteriormente cursan con un aumento del estrés oxidativo, hace pensar que esta lipocalina juega un papel relevante en el control de dicho estrés cuando aparece en condiciones patológicas.

La ApoD tiene capacidad para unir y transportar colesterol, lo cual hace pensar que la ApoD tiene un papel significativo en la patogénesis de la aterosclerosis. Un depósito excesivo de ApoD en lesiones ateroscleróticas puede derivar de una respuesta

compensatoria de ApoD para facilitar la retirada de colesterol de células periféricas o resultar como consecuencia de defectos en el transporte de colesterol mediado por ApoD.

Para plantear la hipótesis general de esta tesis partimos de la idea básica, ya demostrada por otros autores, que un aumento de la producción de radicales libres de oxígeno (ROS), ya bien sea por factores genéticos intrínsecos o por factores extrínsecos, provoca daños en los tejidos que determinan la producción de la placa aterosclerótica. Si bien esta es una idea generalmente aceptada y comentada anteriormente, no conocemos si existen diferencias sustanciales en los niveles de estrés oxidativo entre pacientes con aterosclerosis carotídea que presentan síntomas y aquellos que permanecen asintomáticos.

Por esta misma razón, hemos diseñado una tesis en la que la hipótesis general de la misma postula que existen diferencias en cuanto a los niveles de estrés oxidativo en los pacientes sintomáticos y en aquellos que permanecen asintomáticos, pero que ambos padecen aterosclerosis carotídea. Esta idea que trataremos de demostrar permitiría utilizar marcadores diagnósticos o pronósticos tempranos para identificar a los sujetos asintomáticos y ser candidatos a un tratamiento precoz.

4. OBJETIVOS

A continuación se detallan los objetivos que nos proponemos conseguir en este trabajo.

- I) Describir las características demográficas y los factores de riesgo de los sujetos de este estudio.
- II) Estudiar parámetros bioquímicos, en suero o plasma de pacientes sintomáticos, asintomáticos y controles, que pueden estar implicados en el proceso aterosclerótico.
- III) Valorar la osteopontina como marcador en la aparición de la enfermedad aterosclerótica y su repercusión clínica neurológica (pacientes neurológicamente sintomáticos o asintomáticos).
- IV) Estudiar parámetros implicados en el estrés oxidativo en suero o plasma de pacientes sintomáticos, asintomáticos y controles.
- V) Determinar los niveles de antioxidantes en plasma de pacientes sintomáticos, asintomáticos y controles.
- VI) Determinar niveles de estrés oxidativo en tejido carotídeo aterosclerótico.
- VII) Estudiar los niveles de ApoD en tejido carotídeo de pacientes intervenidos de endarterectomía.
- VIII) Medir la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo en tejido carotídeo.
- IX) Medir la expresión del gen de ApoD y PON1 en tejido carotídeo.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Diseño del estudio

Se diseñó un estudio de casos y controles de pacientes consecutivos intervenidos de endarterectomía carotídea en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid durante el periodo de enero a junio de 2012. Los sujetos controles procedieron de Salud Laboral. A todos se les realizó una historia clínica en la que se recogieron las principales características demográficas y una extracción sanguínea para estudio analítico. Por razones éticas tan sólo se dispuso de muestra de tejido (placa de ateroma) en los pacientes intervenidos quirúrgicamente. Todos los pacientes dieron su consentimiento escrito para la realización de este estudio que fue aprobado por la Comisión de Ética e Investigación del Hospital Clínico. Este estudio contó con la financiación económica del Proyecto de la Gerencia Regional de Salud de la Junta de Castilla y León GRS 367/A/09.

5.2. Sujetos incluidos en el estudio

Se incluyeron en el estudio a todos los pacientes mayores de 18 años que iban a ser intervenidos de endarterectomía carotídea en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid por parte del Servicio de Angiología y Cirugía Vascular, a excepción de los excluidos. Los criterios de exclusión del estudio fueron: pacientes oncológicos, gestantes, pacientes en tratamiento con corticoides y/o inmunosupresores y pacientes trasplantados.

5.2.1. Pacientes intervenidos de endarterectomía carotídea

Consistió en un total de 44 pacientes consecutivos, 39 hombres y 5 mujeres, intervenidos quirúrgicamente de endarterectomía carotídea por el Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

A los pacientes que accedieron a participar en el estudio se les realizó una Historia Clínica, cuyas características se detallan en el Anexo 1. Se les tomó una muestra sanguínea (10 ml en tubo de gel sin anticoagulante para las determinaciones en suero y 20 ml en tubo con EDTA para las determinaciones en plasma) en la hora previa

a la cirugía con objeto de que no interfiriese el estrés quirúrgico en las determinaciones. La muestra se trasladó al laboratorio en condiciones de frío a 4°C, donde se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos y fue alicuotada para su posterior análisis.

El tejido extraído durante la cirugía (placa de ateroma) era remitido en fresco al Servicio de Anatomía Patológica. La muestra era procesada por un patólogo, quién realizaba un examen macroscópico de la pieza, separaba una parte para incluirla en parafina, otra parte era congelada en nitrógeno líquido y otra se incluía en *RNA later*. La pieza incluida en parafina se utilizó para realizar cortes que fueron teñidos con hematoxilina-eosina y cortes que fueron procesados mediante inmunohistoquímica marcando ApoD. La muestra congelada en nitrógeno líquido se homogeneizó posteriormente y se utilizó para la medida de lípidos peroxidados. La parte incluida en *RNA later* fue utilizada para la extracción de RNA y posterior estudio de expresión de genes.

5.2.2. Sujetos control

Consistió de un grupo de 25 individuos voluntarios, 14 hombres y 11 mujeres, procedentes de Salud Laboral. Se les realizaron las mismas extracciones y estudios analíticos que al grupo quirúrgico con la excepción de la muestra de tejido para la realización de determinaciones histopatológicas.

5.2.3. Agrupación de pacientes

La muestra de pacientes (casos) se categorizaron en dos grupos: Sintomáticos (aquellos que habían sufrido algún episodio de amaurosis fugax, accidente isquémico transitorio o accidente cerebrovascular establecido) y Asintomáticos (sin antecedentes neurológicos) pero que presentaron una estenosis carotídea superior al 70% con una prueba de imagen.

En cuanto al análisis de los resultados, se han considerado tres formas de agrupar los sujetos que se describen a continuación:

- Controles, Asintomáticos y Sintomáticos (Clasificación A)
- Controles y Enfermos (Clasificación B)
- Asintomáticos y Sintomáticos (Clasificación C)

5.3. Materiales y variables a estudio

5.3.1. Historia clínica

La Historia clínica que se realizó a todos los pacientes y controles (en éstos últimos solo se recogieron datos demográficos y enfermedades concomitantes) incluidos en el estudio fue contrastada con los informes médicos que ellos aportaban, lo que acentúa la mayor validez de los datos.

Las variables recogidas en nuestra base de datos fueron las siguientes (se muestra el modelo de recogida de datos en el Anexo I):

- Edad (años) y sexo
- Factores de riesgo y antecedentes patológicos: exposición al tabaco, enfermedades del sistema nervioso, enfermedad psiquiátrica, enfermedad coronaria, aterosclerosis, diabetes mellitus (DM), enfermedad renal, enfermedades reumatológicas, hipertensión arterial, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma
- Tratamiento con: estrógenos, ácido acetilsalicílico u otros antiagregantes plaquetarios (clopidogrel, triflusal), otros antiinflamatorios no esteroideos (AINE), estatinas, anticoagulantes (Sintrom® y/o heparina de bajo peso molecular)
- Sintomatología neurológica
- Pruebas de imagen (eco-doppler, angiografía convencional, angio-TAC o angio-RMN)
- Tipo de infarto isquémico (hemisférico o lacunar)
- Tiempo de evolución desde el ictus hasta la intervención quirúrgica (días)
- Grado de estenosis carotídea medido por ecografía doppler.

5.3.2. Determinaciones analíticas

5.3.2.1. Medida de parámetros en suero

Las muestras de sangre obtenidas en tubo de gel sin anticoagulante se centrifugaron, se alicuotaron y se congelaron a -80°C para su posterior análisis.

Las mediciones en suero se realizaron en el autoanalizador Cobas C711 Hitachi de Roche Diagnostics^R mediante los reactivos proporcionados por Roche Diagnostics^R, a excepción del colesterol LDL (mg/dL) que se obtuvo de forma calculada mediante el la fórmula de Friedwald. El resto de los parámetros analizados fueron glucosa (método enzimático colorimétrico de la hexoquinasa, mg/dL), urea (método de ureasa-GLDH, mg/dL), creatinina (método cinético de Jaffé, mg/dL), triglicéridos (método enzimático colorimétrico GPO-PAP con 4-aminofenazol, mg/dL), colesterol total (método enzimático colorimétrico CHOD-PAP, mg/dL), colesterol HDL (método enzimático colorimétrico homogéneo con 4-aminoantipirina, mg/dL), proteínas totales (método colorimétrico de Biuret, g/dL), y proteína C reactiva (PCR) (método inmunoturbidimérico, mg/L).

5.3.2.2. Medida de parámetros en plasma

Las muestras de sangre obtenidas en tubo con EDTA se centrifugaron, se alicuotaron con BHT (500mM en etanol 96%) en proporción 1:1000 y se congelaron a -80°C para su posterior análisis.

En plasma se realizó la determinación de los siguientes parámetros:

- Mieloperoxidasa (MPO) (ng/mL). Estas determinaciones se realizaron en el autoanalizador Architect de Abbott^R con los reactivos suministrados por Abbott^R mediante método de inmunoensayo automatizado.
- LDL oxidadas (U/L) mediante el kit de ELISA competitivo de Mercodia^R.

- Beta carotenos (ug/L), retinol (vitamina A) (ug/mL), alfa tocoferol (vitamina E) (ug/mL) y licopeno (ug/L) mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en laboratorio externo (Balagué Center).
- ApoA1 y ApoB mediante nefelometría (mg/dL).
- Lipoproteína(a) mediante nefelometría (mg/dL).
- Osteopontina mediante enzimoimmunoensayo (ng/mL) en laboratorio externo (Reference).
- Vitamina C mediante HPLC (umol/L) en laboratorio externo (Balagué Center).
- Paraoxonasa 1 (PON1) mediante un kit ELISA (ug/mL).
- Fosfolipasa A2 (sPLA2) mediante un kit ELISA (umol/min/mL).

5.3.2.3. Medida de parámetros en tejido

Debido a cuestiones éticas, sólo se recogió muestra de tejido en enfermos, cuya placa aterosclerótica se extrajo mediante endarterectomía carotídea como parte del tratamiento habitual para esta enfermedad. Se describe a continuación el procedimiento de recogida y homogeneización del tejido.

Las variables medidas en tejido son: peroxidación lipídica (TBARS), ApoD y expresión de genes de estrés oxidativo, ApoD y PON1.

5.3.2.3.1. Recogida y homogeneización del tejido

Procedimiento de recogida

Las muestras de tejido fresco procedente de la endarterectomía carotídea (placa de ateroma) se introdujeron en un recipiente estéril rodeado de hielo que era trasladado rápidamente al Servicio de Anatomía Patológica. Allí, un patólogo procedía a separar dos partes: una para estudio histopatológico y otra para estudio bioquímico, que era introducida en un contenedor con nitrógeno líquido.

Homogeneización de los tejidos

Para homogeneizar el tejido se siguieron los siguientes pasos:

- 1) Añadir a la muestra previamente congelada TRIS-HCl al 10% (peso-volumen). TRIS-HCl (TRIS-clorhídrico) es una solución tampón ajustada a pH 7.4 y que se añade a la muestra una vez descongelada y atemperada a temperatura ambiente.
- 2) Añadir BHT a 5mM.
- 3) Homogeneizar con el homogeneizador OMNI[®] con 3 pulsos de 10 segundos cada uno.
- 4) Incubar a 37°C durante una hora en agitación.
- 5) Centrifugar a 4°C, 10000g durante 15 minutos.
- 6) Guardar el sobrenadante a -80°C.
- 7) Guardar el pellet (fracción lipídica soluble) a -80°C. Se va a utilizar para la medida de lípidos peroxidados.

5.3.2.3.2. Medida de Lípidos peroxidados (TBARS)

Procedimiento

El grado de oxidación lipídica se realizó de la siguiente manera:

- 1) Resuspender el pellet en PBS al 0.5% en proporción 1:1 (mg de tejido original: μ L añadido). PBS es un tampón fosfato salino, isotónico y no tóxico para las células. Añadir BHT a 5mM y mezclarlo mediante vórtex. BHT es una solución de butil hidroxitolueno que se prepara a concentración 500mM en acetonitrilo y tiene propiedades antioxidantes.
- 2) Homoginizar la muestra mediante sonicación. De esta muestra se extraen 12 μ L (paso 4) para la medida de lípidos peroxidados y el resto se congela a -80°C para medir proteínas totales.
- 3) Se realiza una curva patrón con ácido malonil-dialdehído (MDA) a diferentes concentraciones: 0, 1.5 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, y 80 μ M. El MDA se diluye con TRIS-HCl a pH 8 para obtener esta curva patrón.

- 4) En tubo se mezclan 12 μ L de extracto de tejido (o de MDA para la curva patrón), 390 μ L de buffer glicina-HCl (0.2M a pH 3.6) y 250 μ L de TBA (ácido tiobarbitúrico) al 0.5%.
- 5) Incubar a 90°C durante 15 minutos.
- 6) Poner en hielo.
- 7) Centrifugar a 10000g durante 5 minutos.
- 8) Cargar la microplaca a razón de 3 pocillos por muestra y 200 μ L por pocillo.
- 9) Realizar la lectura de la placa a 532 nm de absorbancia.

La medida obtenida se relacionó con la medida de proteínas totales de cada muestra.

5.3.2.3.3. Medida de ApoD

Se determinó mediante técnicas de inmunohistoquímica en el Servicio de Anatomía Patológica.

Se trata de medidas semicuantitativas subjetivas en cortes histológicos de carótida extraída mediante endarterectomía. Se asignaron valores de 1 a 4 en función de la señal obtenida en cada preparación mediante validación microscópica.

5.3.2.3.4. Medidas de expresión de genes

El tejido conservado en RNA Later (Qiagen®) se lavó con PBS y se homogeneizó con el homogeneizador OMNI®. Tras la homogeneización del tejido conservado se extrajo RNA mediante el kit comercial RNeasy Plus Kits de SABiosciences®, que incluía columnas específicas para la eliminación de mínimas trazas de DNA genómico. Posteriormente, se realizaron análisis de expresión de genes relacionados con estrés oxidativo mediante arrays (ABI 7500 Fast y ABI 7900HT de SABiosciences®).

Los PCR Arrays son herramientas para analizar la expresión de un panel concreto de genes utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa a tiempo real, que amplifica y simultáneamente cuantifica la cantidad de RNA mensajero.

Para posteriormente analizar los arrays se realizaron pooles de muestras. Se hicieron cuatro pooles atendiendo a las siguientes características: sintomáticos, asintomáticos, valores más bajos de ApoD en tejido (1 y 2) y valores más altos de ApoD en tejido (3 y 4).

En la misma muestra se analizó la expresión de ApoD y PON1 mediante PCR cuantitativa a tiempo real. En este caso no se realizaron pooles.

5.4. Distribución de pacientes en base a las variables estudiadas

Se han realizado tres formas diferentes de analizar las variables en base a las siguientes agrupaciones del total de individuos incluidos en el estudio (n= 69):

- Controles (n=25), Asintomáticos (n=20) y Sintomáticos (n=24).
- Controles (n=25) y Enfermos (sintomáticos y asintomáticos) (n=44).
- Asintomáticos (n=20) y Sintomáticos (n=24).

5.5. Análisis estadístico

Todos los datos recogidos de la población estudiada se introdujeron en una base de datos Microsoft Excel[®]. Posteriormente fueron analizados en la Unidad de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valladolid mediante el paquete estadístico SPSS[®] versión 18.0.

En el análisis descriptivo se presentaron los datos en tablas de frecuencia. Las variables categóricas se describen como frecuencias y las cuantitativas como media y desviación estándar en el caso de utilizar pruebas paramétricas y mediana y rango intercuartil en el caso de utilizar pruebas no paramétricas. Tras realizar un estudio de

distribución (normalidad) de las variables continuas y en función del resultado, se utilizaron pruebas paramétricas o no paramétricas. Se estableció que la relación es estadísticamente significativa si p es inferior a 0,05.

Las pruebas o test utilizados para analizar los resultados se detallan al pie de cada tabla de resultados en el siguiente apartado.

6. RESULTADOS

6.1. Estudio descriptivo de características demográficas

En este apartado se describen las características de todos los individuos incluidos en el estudio en lo que se refiere a edad y sexo, factores de riesgo, antecedentes patológicos, tratamientos farmacológicos, sintomatología neurológica, tiempo de evolución desde el ictus hasta la intervención quirúrgica, pruebas de imagen y grado de estenosis carotídea.

Se han organizado los resultados en tres tablas, de acuerdo a las tres formas de analizar los datos que se ha realizado, como ya se ha comentado anteriormente (*apartado 5.4 Distribución de pacientes en base a las variables estudiadas*).

6.1.1. Controles, Asintomáticos y Sintomáticos

	CONTROL (n=25)	ASINTOMÁTICOS (n=20)	SINTOMÁTICOS (n=24)	p valor
EDAD ¹ (años)	59,32 (9,49)	74,47 (8,13)	75,46 (5,28)	<0,001
SEXO ² (Varones)	56% (14)	95% (19)	83,3% (20)	0,006
FUMADOR ³	44% (11)	100% (8)	55% (6)	0,005
ENF. SISTEMA NERVIOSO ³	0% (0)	10,5% (2)	4,3% (1)	0,175
ENF. PSIQUIÁTRICA ³	4% (1)	10% (2)	0% (0)	0,194
ENF. CORONARIA/CARDIOPATÍA ISQUÉMICA ²	0% (0)	50% (10)	33,3% (8)	<0,001
ATEROSCLEROSIS ²	4% (1)	75% (15)	54,2% (13)	<0,001
DIABETES MELLITUS ²	4% (1)	30% (6)	50% (12)	0,001
ENF. RENAL ³	8% (2)	20% (4)	8,3% (2)	0,409
ENF. REUMATOLÓGICA ³	4% (1)	33,3% (3)	25% (2)	0,061
HTA ²	0% (0)	90% (18)	95,8% (23)	<0,001
EPOC ³	0% (0)	10,5% (2)	16,7% (4)	0,046
AAS/ANTIAGREGANTES ²	4% (1)	85% (17)	96% (23)	<0,001
AINE ³	4% (1)	15% (3)	13% (3)	0,374
ESTATINAS ²	16% (4)	85% (17)	100% (23)	<0,001
ANTICOAGULANTES ³	0% (0)	25% (5)	20,8% (5)	0,007

Tabla 3.- Características demográficas: edad, sexo, factores de riesgo y antecedentes patológicos, tratamientos y grado de estenosis. Se muestran porcentajes con el número de pacientes (entre paréntesis), excepto en la edad, donde se muestran medias con su desviación estándar (entre paréntesis).

p valor: Significación estadística mediante prueba de Kruskal-Wallis¹, prueba de Chi-cuadrado de Pearson², razón de verosimilitudes³ o estadístico exacto de Fisher⁴. Relación estadísticamente significativa si p es inferior a 0,05.

Entre los grupos Control, Asintomáticos y Sintomáticos se observan diferencias estadísticamente significativas en el caso de la edad, sexo, fumador, enfermedad

coronaria o cardiopatía isquémica, aterosclerosis, diabetes mellitus, hipertensión arterial, EPOC, fármacos antiagregantes, estatinas y fármacos anticoagulantes.

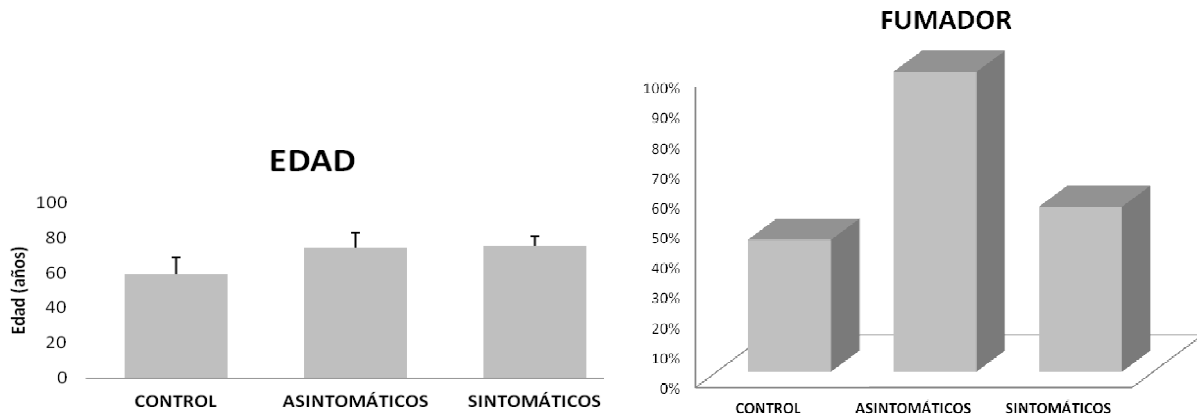


Figura 16. Se representan los datos referentes a la edad (años) y a la característica de ser fumador o no (porcentaje) en los grupos Control, Asintomáticos y Sintomáticos.

En lo referente a la presencia de clínica neurológica sólo se puede describir en el grupo de Sintomáticos y la distribución sería la siguiente: del total de 24 individuos con sintomatología neurológica, 11 sufrieron un accidente isquémico transitorio (AIT), lo que supone un 45,8%, 11 sufrieron un accidente cerebrovascular agudo (ACV), lo que supone un 45,8% y 4 sufrieron amaurosis fugax, lo cual supone un 16,7%. Como se puede apreciar, dos de los individuos tuvieron más de un tipo de sintomatología.

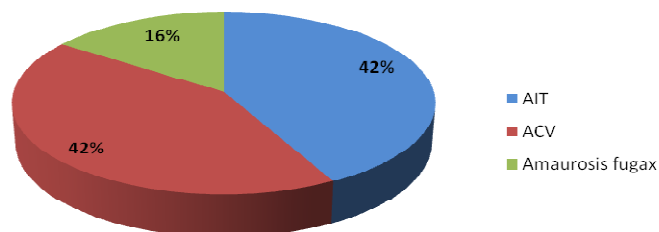


Figura 17. Se representan los datos referentes al tipo de clínica neurológica (porcentaje) en el grupo de Sintomáticos.

En el grupo de Sintomáticos, el intervalo de tiempo entre la presencia de clínica y la intervención quirúrgica fue de 3 a 90 días, con una mediana de 16 días y un rango intercuartil de 13-30 días.

6.1.2. Controles y Enfermos

	CONTROL (n=25)	ENFERMOS (n=44)	p valor
EDAD ¹ (años)	59,32 (9,49)	75,02 (6,62)	<0,001
SEXO ² (Varones)	56% (14)	88,6% (39)	0,002
FUMADOR ²	44% (11)	73,7% (14)	0,049
ENF. SISTEMA NERVIOSO ³	0% (0)	7,1% (3)	0,288
ENF. PSIQUIÁTRICA ³	4% (1)	4,5% (2)	1
ENF. CORONARIA/CARDIOPATÍA ISQUÉMICA ²	0% (0)	40,9% (18)	<0,001
ATEROSCLEROSIS ²	4% (1)	63,6% (28)	<0,001
DIABETES MELLITUS ²	4% (1)	40,9% (18)	0,001
ENF. RENAL ³	8% (2)	13,6% (6)	0,701
ENF. REUMATOLÓGICA ³	4% (1)	29,4% (5)	0,032
HTA ²	0% (0)	93,2% (41)	<0,001
EPOC ³	0% (0)	14% (6)	0,078
AAS/ANTIAGREGANTES ²	4% (1)	90,9% (40)	<0,001
AINE ³	4% (1)	14% (6)	0,248
ESTATINAS ²	16% (4)	93% (40)	<0,001
ANTICOAGULANTES ³	0% (0)	22,7% (10)	0,011

Tabla 4.- Características demográficas: edad, sexo, factores de riesgo y antecedentes patológicos, tratamientos y grado de estenosis. Se muestran porcentajes con el número de pacientes (entre paréntesis), excepto en la edad, donde se muestran medias con su desviación estándar (entre paréntesis).

p valor: Significación estadística mediante prueba T para igualdad de medias¹, prueba de Chi-cuadrado de Pearson² o estadístico exacto de Fisher³. Relación estadísticamente significativa si p es inferior a 0,05.

Entre los grupos Control y Enfermos se observan diferencias estadísticamente significativas en el caso de la edad, sexo, fumador, enfermedad coronaria o cardiopatía isquémica, aterosclerosis, diabetes mellitus, enfermedad reumatológica, hipertensión arterial, fármacos antiagregantes, estatinas y fármacos anticoagulantes.

En lo referente a la presencia de clínica neurológica sólo se puede describir en el grupo de Enfermos y la distribución sería la siguiente: del total de 44 individuos con aterosclerosis carotídea, en 24 de ellos aparecieron síntomas neurológicos, lo que supone un 54,4%.

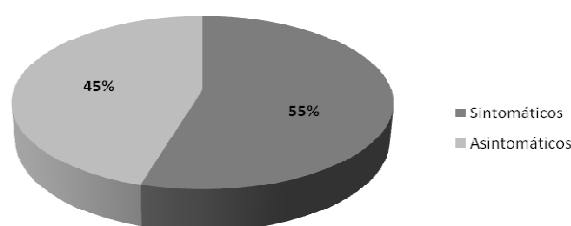


Figura 18. Se representan los porcentajes de pacientes asintomáticos y sintomáticos en el grupo de Enfermos.

De estos 24 individuos, 11 sufrieron un accidente isquémico transitorio (AIT), lo que supone un 25% del total de enfermos, 11 sufrieron un accidente cerebrovascular agudo (ACV), lo que supone un 25% y 4 sufrieron amaurosis fugax, lo cual supone un 9%. Como se puede apreciar, dos de los individuos tuvieron más de un tipo de sintomatología.

6.1.3. Asintomáticos y Sintomáticos

	ASINTOMÁTICOS (n=20)	SINTOMÁTICOS (n=24)	p valor
EDAD ¹ (años)	74,47 (8,13)	75,46 (5,28)	<0,001
SEXO ² (Varones)	95% (19)	83,3% (20)	0,006
FUMADOR ³	100% (8)	54,5% (6)	0,045
ENF. SISTEMA NERVIOSO ³	10,5% (2)	4,3% (1)	0,581
ENF. PSIQUIÁTRICA ³	10% (2)	0% (0)	0,201
ENF. CORONARIA/CARDIOPAT ÍA ISQUÉMICA ²	50% (10)	33,3% (8)	0,263
ATEROSCLEROSIS ²	75% (15)	54,2% (13)	0,153
DIABETES MELLITUS ²	30% (6)	50% (12)	0,179
ENF. RENAL ³	20% (4)	8,3% (2)	0,387
ENF. REUMATOLÓGICA ³	33,3% (3)	25% (2)	1
HTA ²	90% (18)	95,8% (23)	0,583
EPOC ³	10,5% (2)	16,7% (4)	0,678
AAS/ANTIAGREGANTES ²	85% (17)	96% (23)	0,015
AINE ³	15% (3)	13% (3)	1
ESTATINAS ²	85% (17)	100% (23)	0,092
ANTICOAGULANTES ³	25% (5)	20,8% (5)	1
ESTENOSIS >70% ⁴	94,7% (18)	100% (24)	0,442

Tabla 5.- Características demográficas: edad, sexo, factores de riesgo y antecedentes patológicos, tratamientos y grado de estenosis. Se muestran porcentajes con el número de pacientes (entre paréntesis), excepto en la edad, donde se muestran medias con su desviación estándar (entre paréntesis).

p valor: Significación estadística mediante prueba de Kruskal-Wallis¹, prueba de Chi-cuadrado de Pearson², razón de verosimilitudes³ o estadístico exacto de Fisher⁴. Relación estadísticamente significativa si p es inferior a 0,05.

Entre los grupos Asintomáticos y Sintomáticos se observan diferencias estadísticamente significativas en el caso de la edad, sexo, fumador y fármacos antiagregantes.

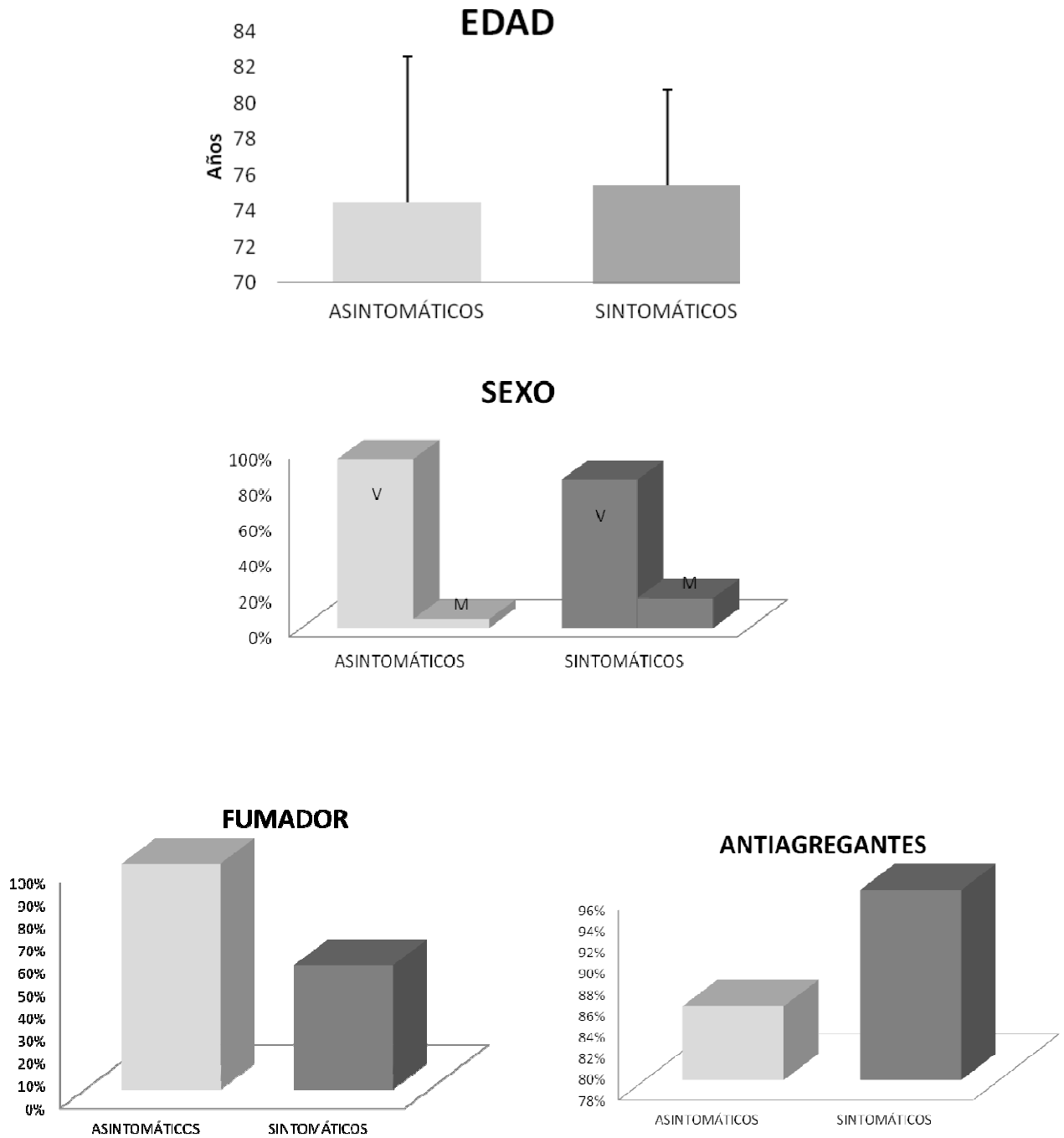


Figura 19. Se representan los datos referentes a la edad (años), sexo, a la característica de ser fumador o no y al consumo de antiagregantes en los grupos Asintomáticos y Sintomáticos (porcentajes).

En este apartado se ha considerado incluir el dato de grado de estenosis, siendo éste mayor del 70% en el 100% de los pacientes sintomáticos, mientras que en asintomáticos representa el 94,7%.

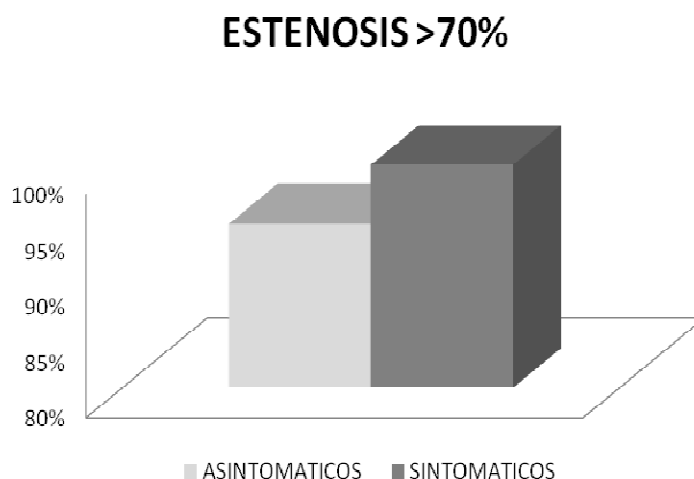


Figura 20. Se representan los porcentajes de pacientes que presentan estenosis carotídea superior al 70% en los grupos Asintomáticos y Sintomáticos.

6.2. Estudio de variables analíticas medidas en suero o plasma

Para analizar los parámetros medidos en suero o plasma, se han realizado cuatro apartados, los cuales incluyen:

- Variables bioquímicas I:
Triglicéridos, colesterol total, LDL, HDL, proteínas totales, urea, creatinina y glucosa.
- Variables bioquímicas II:
ApoA1, ApoB, osteopontina, lipoproteína (a) y fosfolipasa A2.
- Variables de oxidación e inflamación:
PCR, mieloperoxidasa y LDL oxidadas.
- Variables de antioxidación:
 β -caroteno, vitamina A, vitamina E, vitamina C, licopeno y paraoxonasa-1.

6.2.1. Controles, Asintomáticos y Sintomáticos

	CONTROL (n=25)	ASINTOMÁTICOS (n=20)	SINTOMÁTICOS (n=24)	p valor
Triglicéridos (mg/dL)	93,0 (34,0)	126,7 (68,0)	88,1 (46,7)	0,249
Colesterol total ¹ (mg/dL)	207,7 (26,9)	155,6 (29,0)	129,7 (40,0)	<0,001
LDL ¹ (mg/dL)	130,2 (28,8)	92,2 (23,3)	74,3 (30,8)	<0,001
HDL (mg/dL)	49,0 (15,0)	36,3 (10,8)	30,5 (10,3)	<0,001
Proteínas totales (g/dL)	7,0 (0,0)	5,9 (1,0)	5,8 (0,8)	<0,001
Urea (mg/dL)	32,0 (12,0)	48,3 (53,2)	51,9 (40,9)	<0,001
Creatinina (mg/dL)	1,0 (0,0)	1,1 (0,7)	0,9 (0,6)	0,144
Glucosa (mg/dL)	101,0 (9,0)	116,7 (31,0)	127,3 (35)	<0,001
ApoA1 (mg/dL)	131,0 (34,0)	106,0 (25,5)	95,0 (21,5)	<0,001
ApoB ¹ (mg/dL)	92,5 (19,1)	80,3 (15,0)	69,3 (18,9)	<0,001
Osteopontina (ng/mL)	60,0 (25,0)	74,3 (60,8)	90,3 (45,4)	0,003
Lipoproteína (a) (mg/dL)	-	44,7 (81,3)	62,2 (76,7)	0,557
Fosfolipasa A2 (umol/min/mL)	-	5,2 (1,3)	5,5 (3,9)	0,090
PCR (mg/L)	1,0 (1,0)	1,3 (5,0)	2,0 (3,5)	0,034
Mieloperoxidasa (ng/mL)	10,0 (4,0)	21,8 (19,2)	23,8 (20,7)	<0,001
LDL oxidadas (U/L)	83,1 (21,3)	71,2 (18,0)	65,9 (20,4)	0,015
β-Carotenos ¹ (ug/L)	380,9 (202,4)	218,0 (126,9)	261,8 (183,2)	0,009
Vitamina A ¹ (ug/mL)	0,5 (0,1)	0,5 (0,2)	0,5 (0,2)	0,819
Vitamina E ¹ (ug/mL)	13,3 (3,1)	10,4 (2,1)	11,2 (3,9)	0,009
Vitamina C (umol/L)	32,2 (11,8)	25,4 (9,8)	21,7 (13,3)	0,018
Licopeno (ug/L)	115,0 (87,0)	91,0 (86,0)	92,5 (82,0)	0,438
Paraoxonasa 1 (ug/mL)	140,2 (119,1)	157,6 (124,5)	145,2 (106,7)	0,907

Tabla 6.- Variables bioquímicas básicas distribuidas en grupos Control, Asintomáticos y Sintomáticos. Se muestran medias con desviación estándar (entre paréntesis) en el caso de distribuciones normales¹ y medianas con rango intercuartil (entre paréntesis) en el caso de distribuciones no normales.

p valor: Significación estadística mediante ANOVA en distribuciones normales y prueba de Kruskal-Wallis en distribuciones no normales. Relación estadísticamente significativa si p es inferior a 0,05.

Entre los grupos Control, Asintomáticos y Sintomáticos se encuentran diferencias estadísticamente significativas en el caso de las siguientes variables: colesterol total, LDL, HDL, proteínas totales, urea, glucosa, ApoA1, ApoB, osteopontina, PCR, mieloperoxidasa, LDL oxidadas, β-carotenos, vitamina E y vitamina C.

VARIABLES BIOQUÍMICAS

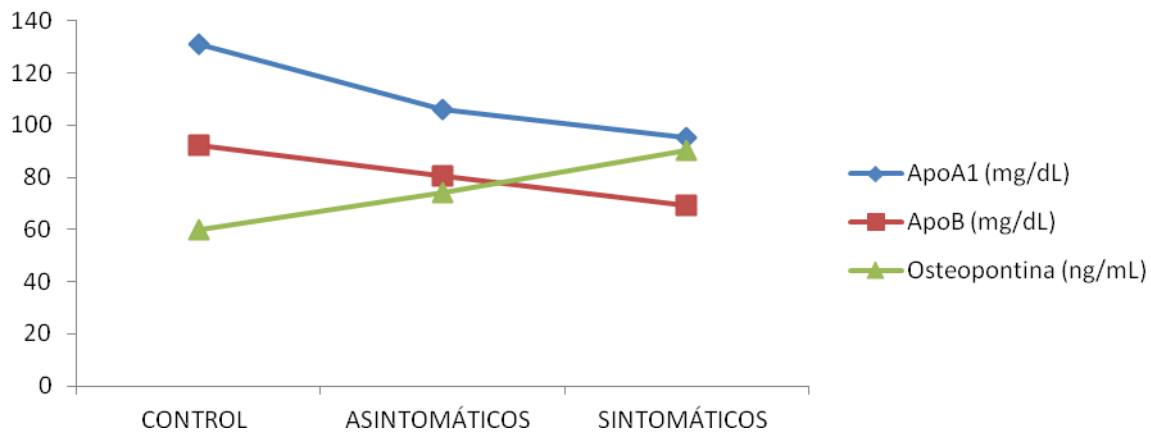


Figura 21. Se representan los valores de ApoA1, ApoB y Osteopontina en los grupos Control, Asintomáticos y Sintomáticos.

VARIABLES DE OXIDACIÓN E INFLAMACIÓN

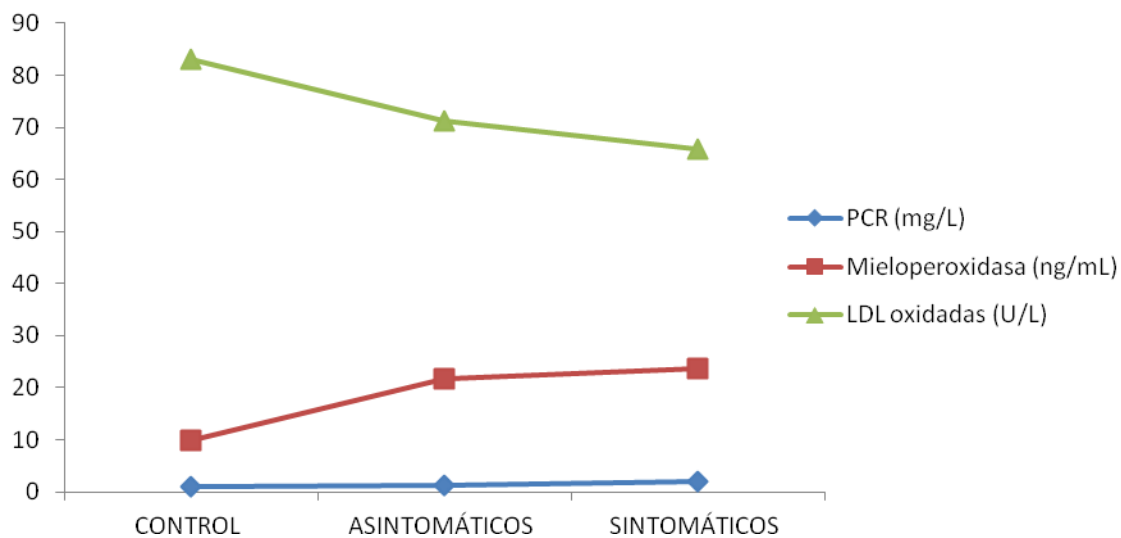


Figura 22. Se representan los valores de PCR, Mieloperoxidasa y LDL oxidadas en los grupos Control, Asintomáticos y Sintomáticos.

6.2.2. Controles y Enfermos

	CONTROL (n=25)	ENFERMOS (n=44)	p valor
Triglicéridos (mg/dL)	93,0 (34,0)	105,0 (69,8)	0,799
Colesterol total ¹ (mg/dL)	207,7 (26,9)	141,2 (37,5)	<0,001
LDL ¹ (mg/dL)	130,2 (28,8)	82,2 (28,9)	<0,001
HDL (mg/dL)	49,0 (15,0)	34,0 (12,3)	<0,001
Proteínas totales (g/dL)	7,0 (0,0)	5,8 (0,7)	<0,001
Urea (mg/dL)	32,0 (12,0)	51,3 (45,0)	<0,001
Creatinina (mg/dL)	1,0 (0,0)	1,0 (0,6)	0,056
Glucosa (mg/dL)	101,0 (9,0)	119 (29,7)	<0,001
ApoA1 (mg/dL)	131,0 (34,0)	98,0 (30,5)	<0,001
ApoB ¹ (mg/dL)	92,5 (19,1)	74,5 (28,0)	<0,001
Osteopontina (ng/mL)	60,0 (25,0)	83,7 (57,7)	0,001
Lipoproteína (a) (mg/dL)	-	46,2 (79,9)	-
Fosfolipasa A2 (umol/min/mL)	-	5,3 (1,3)	-
PCR (mg/L)	1,0 (1,0)	2,0 (4,0)	0,011
Mieloperoxidasa (ng/mL)	10,0 (4,0)	22,5 (20,7)	<0,001
LDL oxidadas (U/L)	83,1 (21,3)	69,3 (20,4)	0,004
β-Carotenos ¹ (ug/L)	380,9 (202,4)	242,0 (159,0)	0,003
Vitamina A ¹ (ug/mL)	0,5 (0,1)	0,5 (0,2)	0,550
Vitamina E ¹ (ug/mL)	13,3 (3,1)	11,0 (3,0)	0,003
Vitamina C (umol/L)	32,2 (11,8)	22,1 (10,1)	0,007
Licopeno (ug/L)	115,0 (87,0)	91,0 (84,0)	0,200
Paraoxonasa 1 (ug/mL)	140,2 (119,1)	148,3 (114,6)	0,854

Tabla 7.- Variables bioquímicas básicas distribuidas en grupos Control y Enfermos. Se muestran medias con desviación estándar (entre paréntesis) en el caso de distribuciones normales¹ y medianas con rango intercuartil (entre paréntesis) en el caso de distribuciones no normales.

p valor: Significación estadística mediante prueba T para igualdad de medias en distribuciones normales y prueba de Mann-Whitney en distribuciones no normales. Relación estadísticamente significativa si p es inferior a 0,05.

Entre los grupos Control y Enfermos se encuentran diferencias estadísticamente significativas en el caso de las siguientes variables: colesterol total, LDL, HDL, proteínas totales, urea, glucosa, ApoA1, ApoB, osteopontina, PCR, mieloperoxidasa, LDL oxidadas, β-carotenos, vitamina E y vitamina C.

VARIABLES BIOQUÍMICAS I

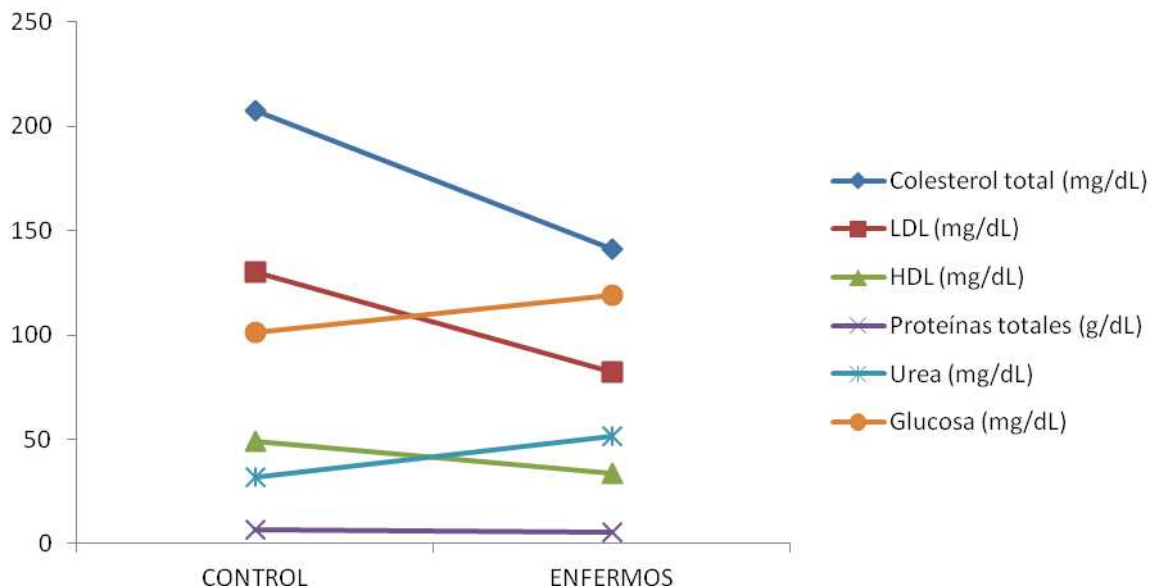


Figura 23. Se representan los valores de Coolesterol total, LDL, HDL, Proteínas totales, Urea y Glucosa en los grupos Control y Enfermos.

VARIABLES BIOQUÍMICAS II

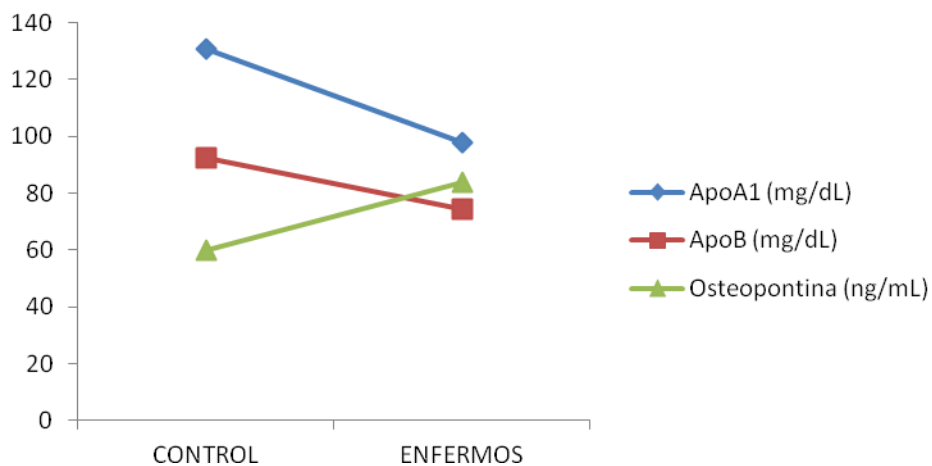


Figura 24. Se representan los valores de ApoA1, ApoB y Osteopontina en los grupos Control y Enfermos.

VARIABLES DE OXIDACIÓN E INFLAMACIÓN

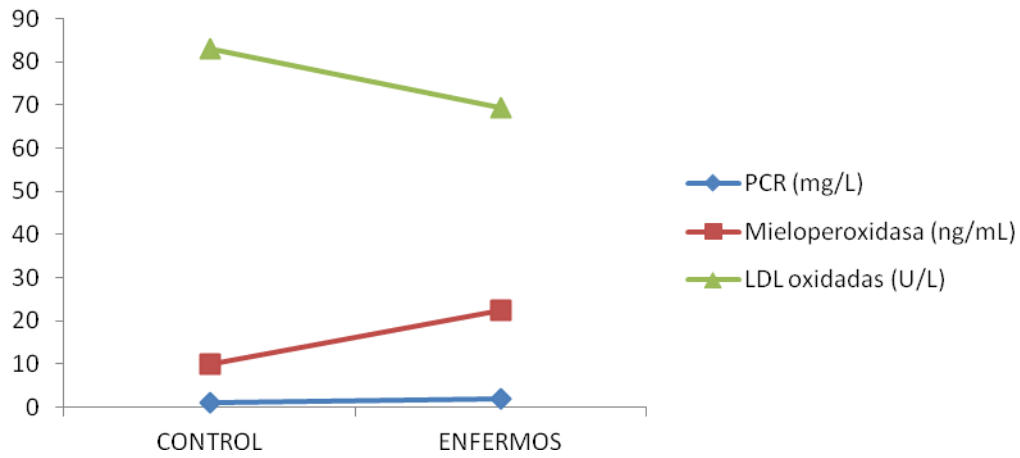


Figura 25. Se representan los valores de PCR, Mieloperoxidasa y LDL oxidadas en los grupos Control y Enfermos.

VARIABLES DE ANTIOXIDACIÓN

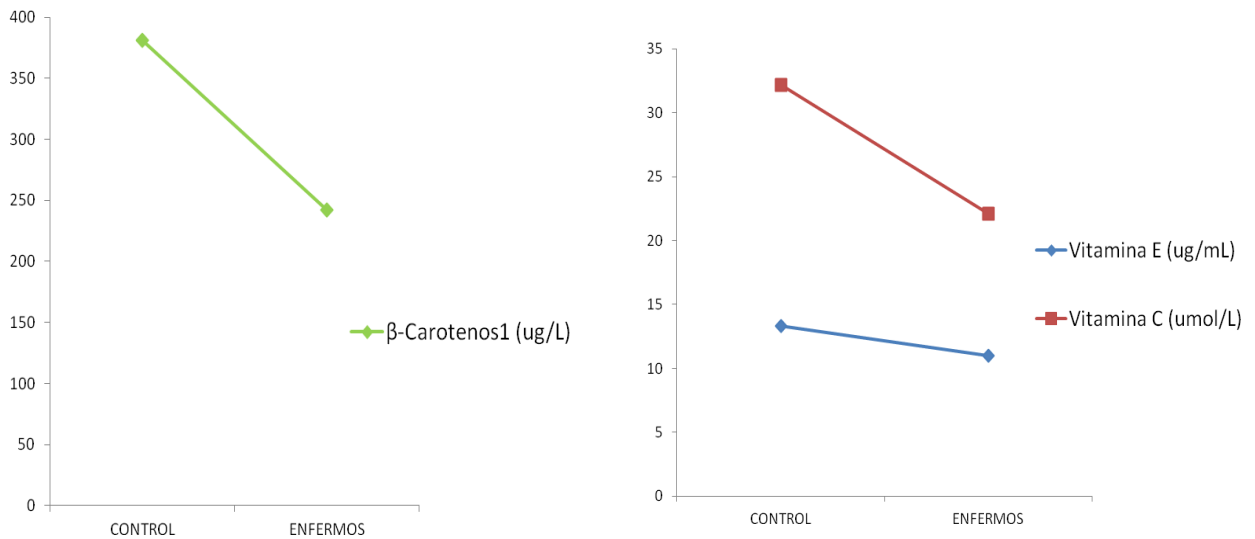


Figura 26. Se representan los valores β-carotenos, Vitamina E y Vitamina C en los grupos Control y Enfermos.

6.2.3. Asintomáticos y Sintomáticos

	ASINTOMÁTICOS (n=20)	SINTOMÁTICOS (n=24)	p valor
Triglicéridos (mg/dL)	126,7 (68,0)	88,1 (46,7)	0,089
Colesterol total ¹ (mg/dL)	155,6 (29,0)	129,7 (40,0)	0,012
LDL ¹ (mg/dL)	92,2 (23,3)	74,3 (30,8)	0,043
HDL (mg/dL)	36,3 (10,8)	30,5 (10,3)	0,082
Proteínas totales (g/dL)	5,9 (1,0)	5,8 (0,8)	0,126
Urea (mg/dL)	48,3 (53,2)	51,9 (40,9)	0,951
Creatinina (mg/dL)	1,1 (0,7)	0,9 (0,6)	0,540
Glucosa (mg/dL)	116,7 (31,0)	127,3 (35)	0,096
ApoA1 (mg/dL)	106,0 (25,5)	95,0 (21,5)	0,045
ApoB ¹ (mg/dL)	80,3 (15,0)	69,3 (18,9)	0,044
Osteopontina (ng/mL)	74,3 (60,8)	90,3 (45,4)	0,308
Lipoproteína (a) (mg/dL)	44,7 (81,3)	62,2 (76,7)	0,557
Fosfolipasa A2 (umol/min/mL)	5,2 (1,3)	5,5 (3,9)	0,090
PCR (mg/L)	1,3 (5,0)	2,0 (3,5)	0,554
Mieloperoxidasa (ng/mL)	21,8 (19,2)	23,8 (20,7)	0,635
LDL oxidadas (U/L)	71,2 (18,0)	65,9 (20,4)	0,514
β-Carotenos ¹ (ug/L)	218,0 (126,9)	261,8 (183,2)	0,433
Vitamina A ¹ (ug/mL)	0,5 (0,2)	0,5 (0,2)	0,756
Vitamina E ¹ (ug/mL)	10,4 (2,1)	11,2 (3,9)	0,418
Vitamina C (umol/L)	25,4 (9,8)	21,7 (13,3)	0,302
Licopeno (ug/L)	91,0 (86,0)	92,5 (82,0)	0,917
Paraoxonasa 1 (ug/mL)	157,6 (124,5)	145,2 (106,7)	0,679

Tabla 8.- Variables bioquímicas básicas distribuidas en grupos Asintomáticos y Sintomáticos. Se muestran medias con desviación estándar (entre paréntesis) en el caso de distribuciones normales¹ y medianas con rango intercuartil (entre paréntesis) en el caso de distribuciones no normales.

p valor: Significación estadística mediante ANOVA en distribuciones normales y prueba de Mann-Whitney en distribuciones no normales. Relación estadísticamente significativa si p es inferior a 0,05.

Entre los grupos Asintomáticos y Sintomáticos se encuentran diferencias estadísticamente significativas en el caso de las siguientes variables: colesterol total, LDL, glucosa, ApoA1 y ApoB.

VARIABLES BIOQUÍMICAS I

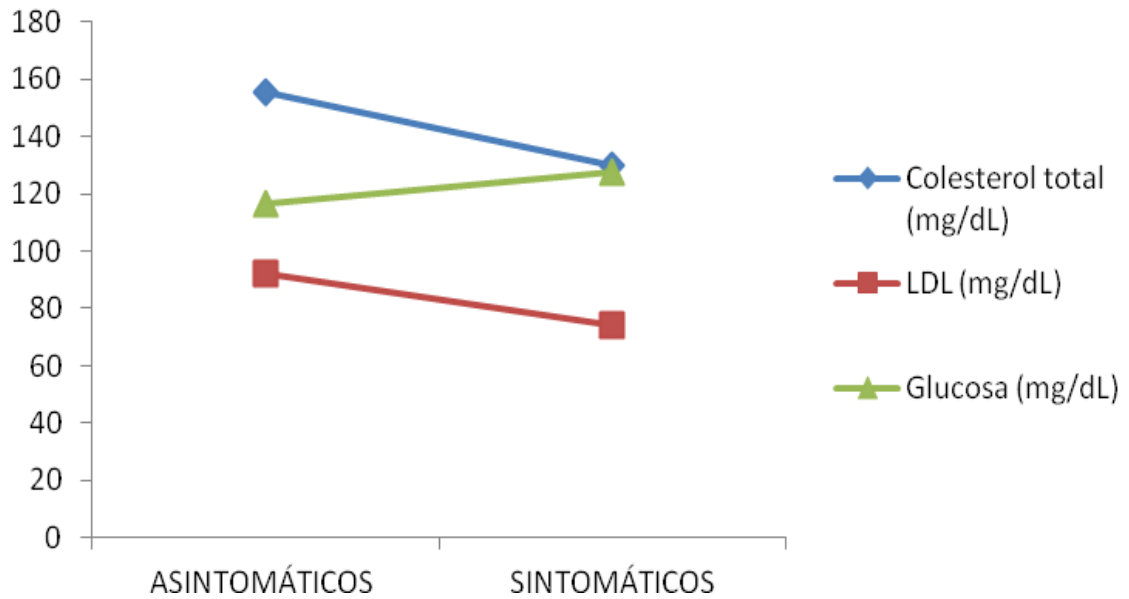


Figura 27. Se representan los valores Colesterol total, LDL y Glucosa en los grupos Asintomáticos y Sintomáticos.

VARIABLES BIOQUÍMICAS II

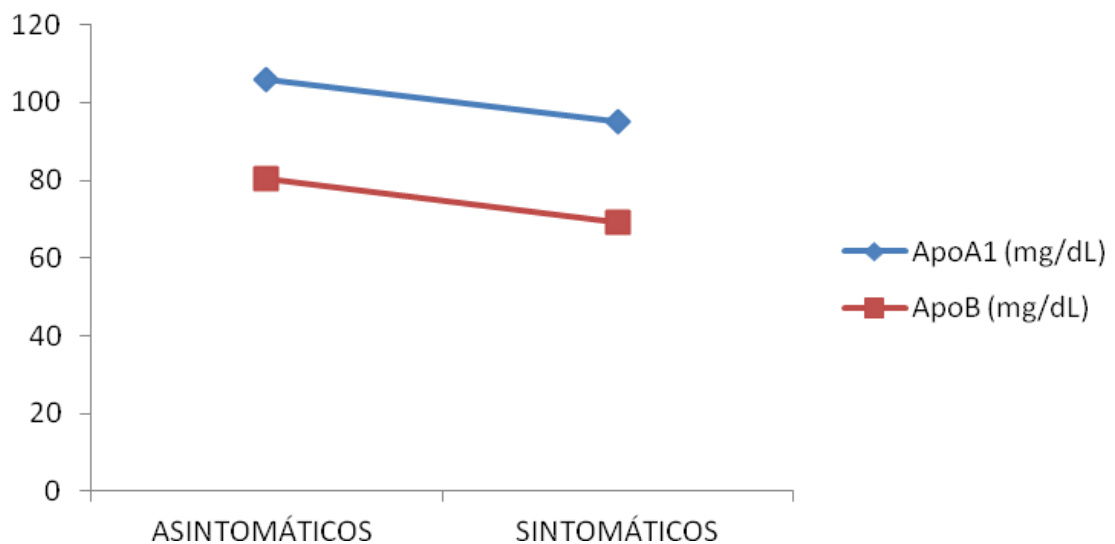


Figura 28. Se representan los valores de ApoA1 y ApoB en los grupos Asintomáticos y Sintomáticos.

6.3. Estudio de variables en tejido

6.3.1. TBARS

La comparación de TBARS entre los grupos Asintomáticos y Sintomáticos resultó estadísticamente significativa.

ASINTOMÁTICOS (n=20)	SINTOMÁTICOS (n=24)	p valor
9,21 (6,09)	12,73 (7,38)	0,009

Tabla 9.- Valores de TBARS (nmol/mg) distribuidos en grupos Asintomáticos y Sintomáticos. Se muestran medianas con rango intercuartil (entre paréntesis).

p valor: Significación estadística mediante prueba de Mann-Whitney (distribución no normal). Relación estadísticamente significativa si p es inferior a 0,05.

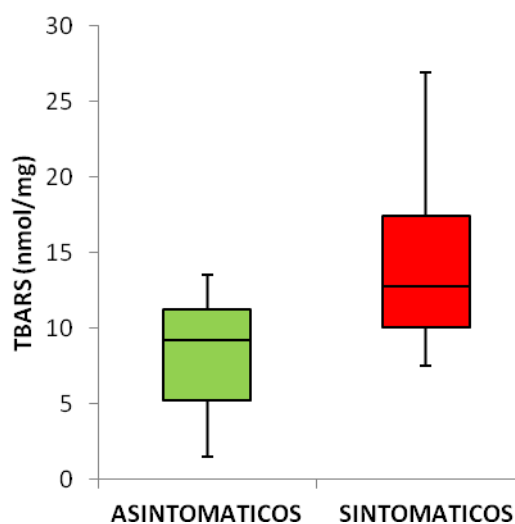


Figura 29. Se representan los valores de TBARS en los grupos Asintomáticos y Sintomáticos.

6.3.2. ApoD

La comparación de ApoD entre los grupos Asintomáticos y Sintomáticos no resultó estadísticamente significativa.

ASINTOMÁTICOS (n=20)	SINTOMÁTICOS (n=24)	p valor
2 (3)	4 (2)	0,082

Tabla 10.- Valores de ApoD distribuidos en grupos Asintomáticos y Sintomáticos. Se muestran medianas con rango intercuartil (entre paréntesis).

p valor: Significación estadística mediante prueba de Mann-Whitney (distribución no normal). Relación estadísticamente significativa si p es inferior a 0,05.

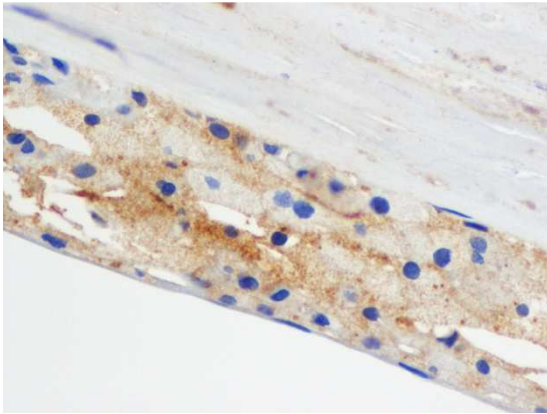


Imagen 6. Estría lipídica. Cuantificación de ApoD grado 1. Tinción inmunohistoquímica para ApoD. 40X.

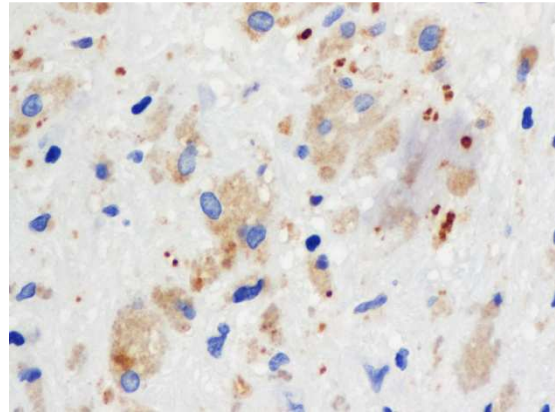


Imagen 7. Placa aterosclerótica con cuantificación de ApoD grado 2. Tinción inmunohistoquímica para ApoD. 40X.

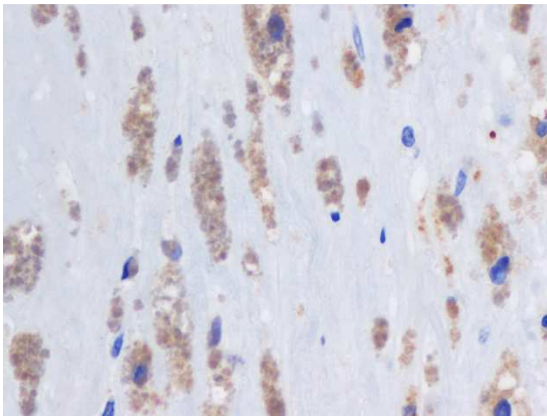


Imagen 8. Placa aterosclerótica con cuantificación de ApoD grado 3. Tinción inmunohistoquímica para ApoD. 40X.

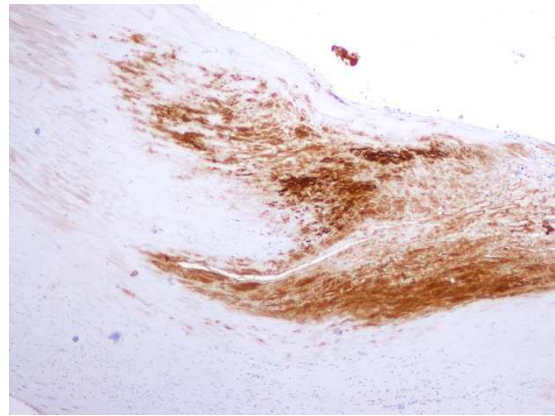


Imagen 9. Placa aterosclerótica con cuantificación de ApoD grado 4. Tinción inmunohistoquímica para ApoD. 10X.

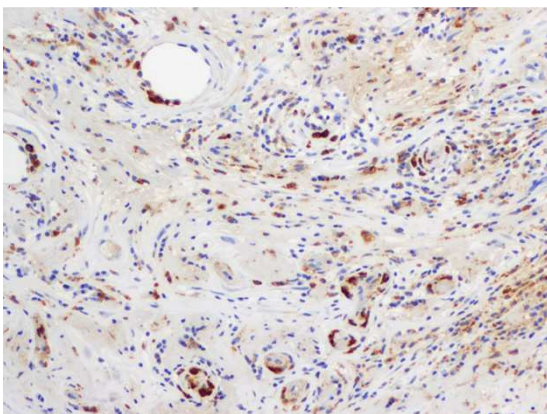


Imagen 10. Placa aterosclerótica con cuantificación de ApoD grado 4. Tinción inmunohistoquímica para ApoD. 40X.

6.3.3. Medida de expresión de genes

En los apartados siguientes se muestran los resultados obtenidos de los estudios correspondientes a la medida de expresión de genes en tejido carotídeo. Se ha considerado analizar la expresión de un grupo de genes relacionados con el estrés oxidativo, ApoD y PON1. En este último caso, los resultados fueron desestimados debido a la escasa presencia de mRNA, debido probablemente a la alta calcificación del material analizado.

6.3.3.1. Genes relacionados con el estrés oxidativo

- Comparación entre los grupos Asintomáticos y Sintomáticos

En el estudio de expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo se ha analizado la expresión de RNA mensajero de todos los genes que se muestran a continuación en la tabla. DC_t indica el número de ciclos de amplificación que son necesarios para detectar el RNA, por lo tanto, cuanto menor sea el valor DC_t , mayor cantidad de RNA está presente en la muestra.

Para comparar la expresión en dos grupos diferentes, sintomáticos y asintomáticos, se calculan los valores de expresión (razón de cambio o RQ). DDC_t es la diferencia entre DC_t de los dos grupos que queremos comparar.

$$RQ = 2^{(-DDC_t)}$$

Hemos considerado que son significativos para un valor de incremento o decremento de expresión del 150%, por tanto, valores de RQ por debajo de 0,75 o por encima de 1,50. No obstante, consideramos de mayor importancia los valores mayores de 200% (RQ por debajo de 0,50 o por encima de 2,00).

De esta manera, podemos describir que en pacientes sintomáticos, con referencia a los pacientes asintomáticos, se incrementa la expresión de los genes sombreados en rojo y se expresan menos los genes sombreados en verde. Los

genes que no están sombreados consideramos que no tienen una expresión significativamente diferente entre los dos grupos de pacientes.

Gen	DCt SINTOMÁTICOS	DCt ASINTOMÁTICOS	RQ
APOE	4,21	2,83	0,38
SOD3	5,98	4,93	0,48
CSDE1	5,38	4,55	0,56
SOD1	2,81	2,01	0,57
DUSP1	4,13	3,35	0,58
PDLIM1	4,62	3,93	0,62
SCARA3	8,71	8,05	0,63
PRDX2	6,93	6,28	0,63
PRNP	9,14	8,52	0,65
GPX3	5,64	5,03	0,65
TXNRD1	5,52	4,94	0,66
MGST3	3,20	2,65	0,67
MPV17	5,75	5,24	0,70
CYBA	4,62	4,18	0,73
GPX4	3,69	3,26	0,74
CAT	5,97	5,54	0,74
RNF7	5,57	5,15	0,75
ATOX1	4,05	3,66	0,76
CCS	8,07	7,71	0,78
PRDX6	5,05	4,72	0,79
SEPP1	3,76	3,54	0,86
STK25	7,69	7,50	0,87
GPX1	1,58	1,40	0,88
PXDN	4,97	4,80	0,88
PRDX5	4,48	4,31	0,88
OXSRI	6,90	6,76	0,90
MSRA	7,01	6,91	0,93
GTF2I	5,07	5,00	0,95
GLRX2	5,59	5,53	0,95
PRDX4	5,46	5,42	0,97
SELS	6,55	6,52	0,97
PRDX1	5,96	5,94	0,98
PRDX3	4,42	4,42	1,00
GSTZ1	7,94	7,95	1,00
DHCR24	8,24	8,26	1,01
FOXMI	7,80	7,83	1,02
OXR1	5,91	5,99	1,06
GPR156	8,83	8,97	1,10
CCL5	6,41	6,65	1,18
NCF2	5,91	6,17	1,20

NOX5	7,97	8,28	1,23
TTN	7,67	8,01	1,26
MPO	8,21	8,58	1,29
TXNRD2	5,58	5,97	1,31
PNKP	7,78	8,18	1,31
DUOX1	6,97	7,38	1,33
NCF1	6,54	6,97	1,33
GSS	6,90	7,34	1,34
AOX1	7,32	7,75	1,35
GPX5	7,68	8,14	1,37
PREX1	8,79	9,27	1,39
SOD2	2,85	3,35	1,41
BNIP3	5,83	6,37	1,45
PXDNL	8,01	8,57	1,47
ALB	7,04	7,62	1,49
SIRT2	8,02	8,64	1,53
SFTPD	10,38	11,03	1,56
PIP3-E	7,81	8,48	1,58
CYGB	8,28	9,01	1,66
NME5	7,08	7,82	1,66
PTGS1	6,86	7,61	1,67
MTL5	7,41	8,16	1,67
SRXN1	8,55	9,34	1,72
PRG3	8,12	8,93	1,74
GPX2	8,17	8,98	1,75
DGKK	7,86	8,76	1,87
ALOX12	7,80	8,72	1,89
GPX7	6,33	7,26	1,91
NUDT1	7,87	8,88	2,01
MBL2	7,24	8,28	2,05
ANGPTL7	7,64	8,71	2,09
MT3	8,72	9,83	2,14
PTGS2	5,59	6,72	2,18
EPX	7,72	8,86	2,21
EPHX2	7,58	8,79	2,30
GSR	9,52	10,81	2,44
NOS2A	5,67	6,97	2,46
DUOX2	9,74	11,08	2,52
LPO	7,16	8,52	2,56
TPO	7,87	9,32	2,72
SGK2	8,84	10,65	3,49
GPX6	8,02	9,96	3,85
KRT1	7,79	9,94	4,43
TXNDC2	8,50	14,26	54,17

Tabla 11.- Comparación de la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo entre los grupos Sintomáticos y Asintomáticos.

Genes con menor nivel de expresión en sintomáticos que en asintomáticos

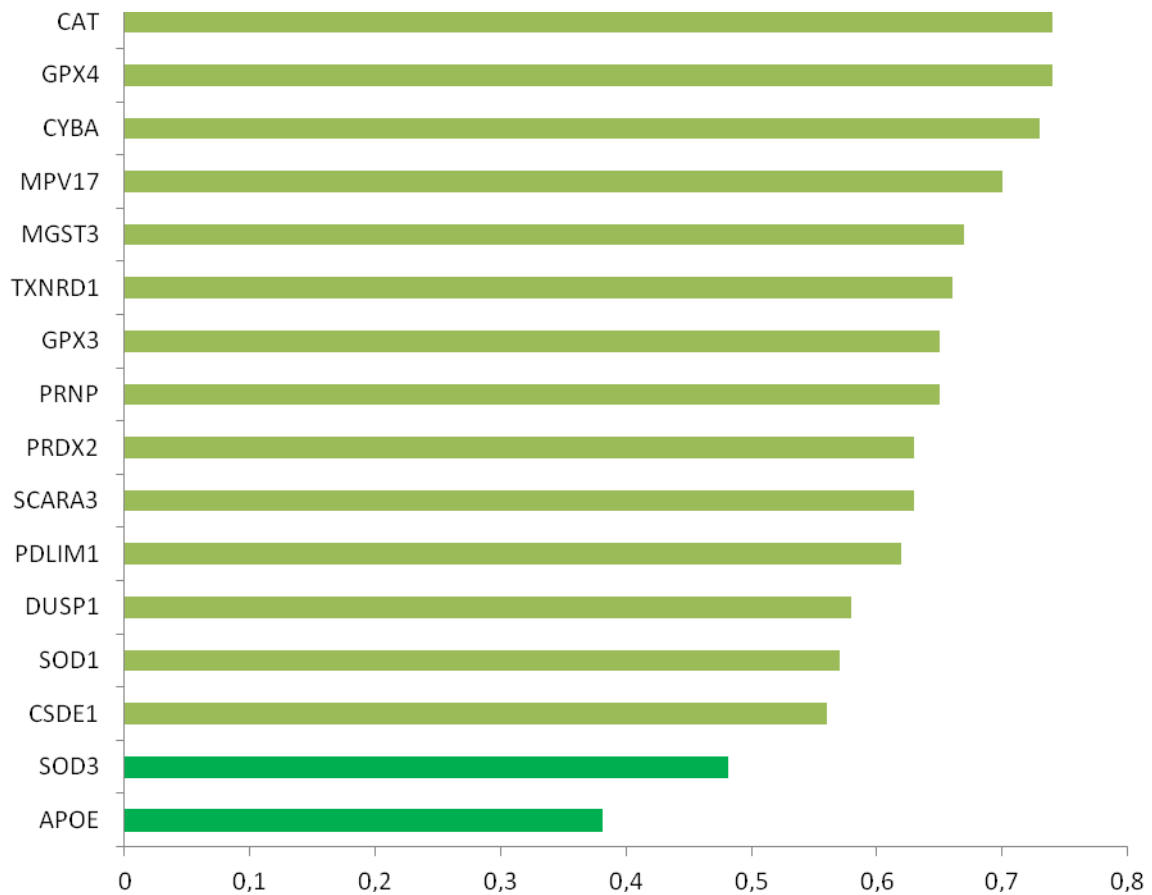


Figura 30. Se representan los valores RQ de expresión de los genes cuya expresión es menor en Sintomáticos que en Asintomáticos.

Genes con mayor nivel de expresión en sintomáticos que en asintomáticos

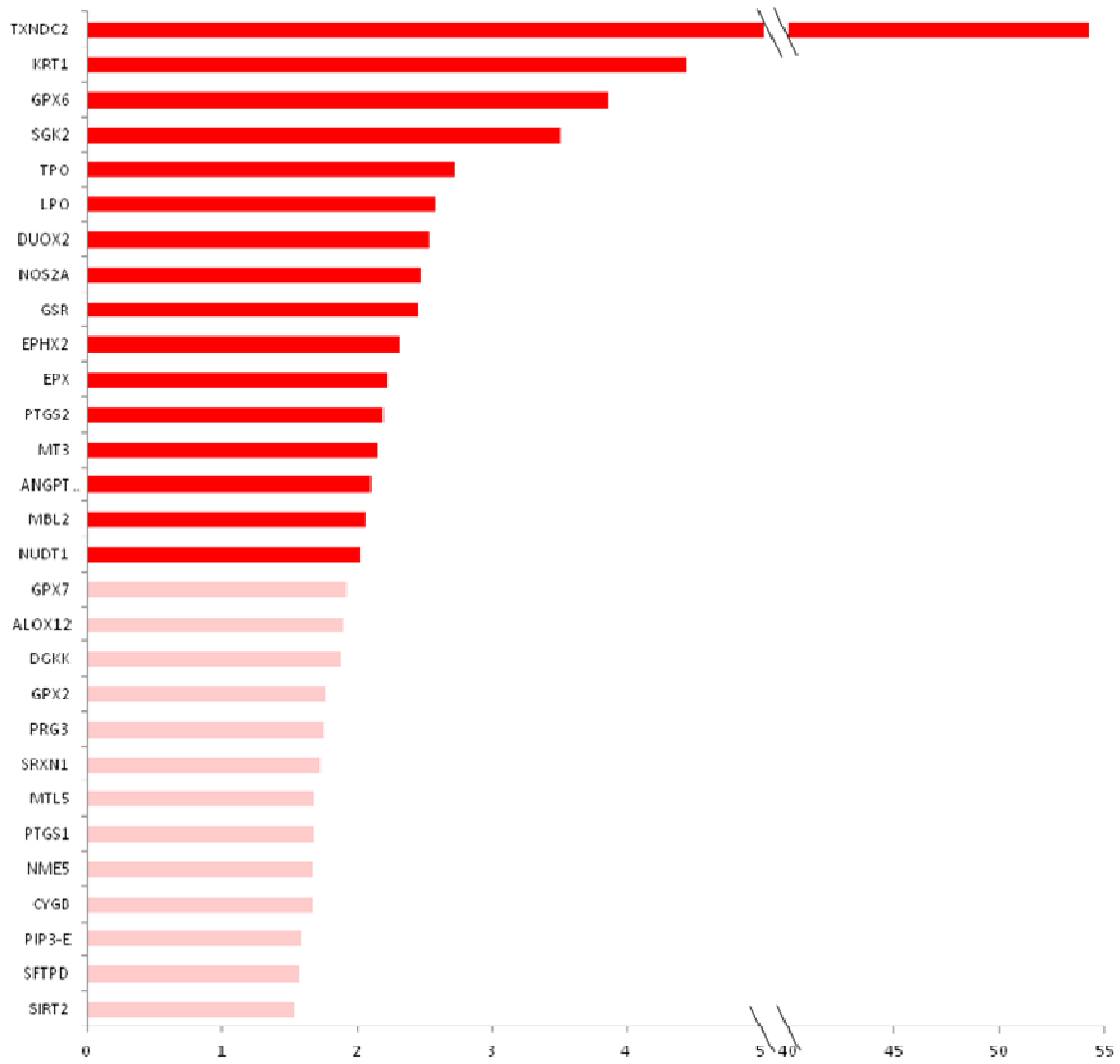


Figura 31. Se representan los valores RQ de expresión de los genes cuya expresión es mayor en Sintomáticos que en Asintomáticos.

- Comparación entre los grupos ApoD elevada y ApoD baja

En el estudio de expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo se ha estudiado la expresión de RNA mensajero de todos los genes que se muestran a continuación en la tabla. Para los valores de expresión calculados (RQ, ya comentado anteriormente) en la comparativa de los dos grupos, ApoD elevada en tejido y ApoD baja en tejido, hemos considerado que son significativos para un valor de incremento o decremento de expresión del 150%, por tanto, valores de RQ por debajo de 0,75 o por encima de 1,50. No obstante, consideramos de mayor importancia los valores mayores de 200% (RQ por debajo de 0,50 o por encima de 2,00).

De esta manera, podemos describir que en pacientes con ApoD elevada, con referencia a los pacientes con ApoD baja, se sobreexpresan los genes sombreados en rojo y se expresan menos los genes sombreados en verde. Los genes que no están sombreados consideramos que no tienen una expresión significativamente diferente entre los dos grupos de pacientes.

Gen	DCt ApoD ELEVADA	DCt ApoD BAJA	RQ
DUOX2	12,33	9,70	0,16
ALOX12	10,05	7,92	0,22
LPO	9,32	7,29	0,24
DGKK	9,64	7,61	0,24
MPO	9,70	7,68	0,24
ANGPTL7	9,56	7,59	0,25
MTL5	8,43	6,63	0,28
SGK2	10,38	8,62	0,29
NOS2A	7,07	5,36	0,30
TXNDC2	9,92	8,28	0,32
SRXN1	9,55	7,97	0,33
TPO	9,49	7,92	0,33
DUOX1	8,13	6,67	0,36
EPHX2	8,64	7,22	0,37
GSR	11,39	9,98	0,37
TTN	8,57	7,18	0,38
GPX6	9,52	8,15	0,38
MBL2	8,99	7,63	0,38
EPX	8,96	7,62	0,39
ALB	8,37	7,06	0,40

MT3	9,94	8,64	0,40
PRG3	9,83	8,56	0,41
AOX1	8,01	6,81	0,43
GPX5	8,50	7,36	0,45
SFTPD	11,78	10,70	0,47
NOX5	8,43	7,36	0,47
NME5	7,97	6,90	0,47
PIP3-E	8,76	7,74	0,49
GPX2	9,35	8,44	0,53
PNKP	8,22	7,33	0,54
FOXM1	7,88	7,01	0,54
OXSRI	7,30	6,45	0,55
GSTZ1	8,09	7,28	0,57
CYGB	8,95	8,18	0,58
NCF1	7,08	6,38	0,61
OXR1	6,19	5,51	0,62
SOD1	2,74	2,08	0,63
DHCR24	9,07	8,41	0,63
PRDX2	6,92	6,28	0,64
PXDNL	8,57	7,95	0,65
GSS	7,31	6,71	0,65
GLRX2	6,07	5,48	0,66
SELS	6,61	6,02	0,66
PRDX3	4,82	4,23	0,66
SIRT2	8,40	7,84	0,67
STK25	7,50	7,04	0,72
SCARA3	8,86	8,43	0,74
GPX7	6,92	6,54	0,77
GPR156	9,42	9,07	0,78
PRDX4	5,51	5,17	0,78
PDLIM1	4,16	3,85	0,80
PXDN	4,67	4,39	0,82
CSDE1	4,89	4,63	0,83
MPV17	5,46	5,20	0,83
NUDT1	8,69	8,44	0,83
RNF7	5,34	5,11	0,85
KRT1	8,50	8,28	0,86
TXNRD1	5,43	5,24	0,87
GTF2I	4,97	4,78	0,87
PTGS1	6,94	6,75	0,88
PRDX6	4,91	4,77	0,91
MGST3	3,07	2,94	0,91
PRDX1	6,24	6,14	0,93
PTGS2	5,97	5,90	0,95
PRNP	8,61	8,62	1,01
BNIP3	6,35	6,38	1,02

CCS	7,91	7,95	1,03
ATOX1	3,95	4,03	1,05
MSRA	6,71	6,79	1,05
TXNRD2	5,76	5,87	1,07
CAT	5,38	5,62	1,18
PRDX5	4,28	4,58	1,23
PREX1	8,78	9,11	1,25
SOD3	4,88	5,28	1,32
CCL5	6,24	6,65	1,32
GPX4	3,04	3,46	1,34
NCF2	5,59	6,09	1,41
GPX3	4,96	5,56	1,51
GPX1	1,34	2,21	1,83
DUSP1	3,00	3,88	1,83
CYBA	3,73	4,83	2,14
SEPP1	2,79	4,04	2,37
SOD2	2,24	3,84	3,02
APOE	2,41	5,00	6,03

Tabla 12.- Comparación de la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo entre los grupos ApoD elevada y ApoD baja.

Genes con mayor nivel de expresión en sujetos con ApoD elevada

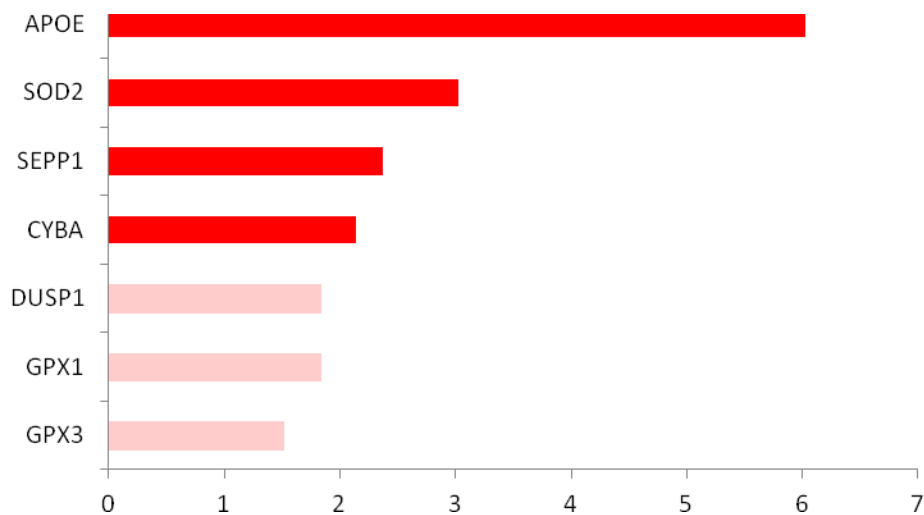


Figura 32. Se representan los valores RQ de expresión de los genes con mayor nivel de expresión en pacientes con ApoD elevada que en pacientes con ApoD baja.

Genes con menor nivel de expresión en sujetos con ApoD elevada

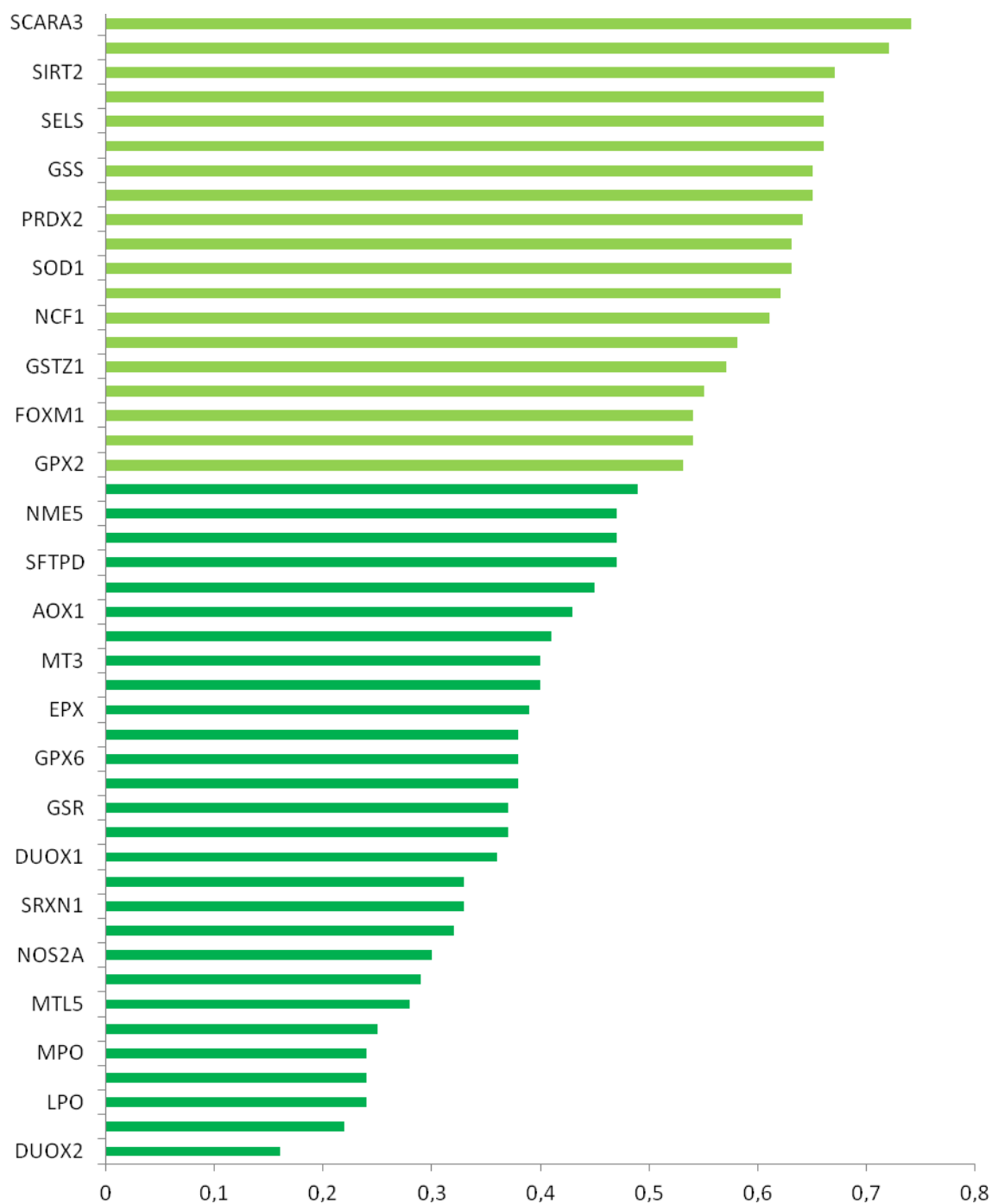


Figura 33. Se representan los valores RQ de expresión de los genes con menor nivel de expresión en pacientes con ApoD elevada que en pacientes con ApoD baja.

6.3.3.2. Gen de ApoD

Se ha medido la expresión del gen de ApoD en tejido mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Como se trata de muestras de pacientes diferentes, en este caso, en el que no existe un grupo control con el que comparar los resultados, no tiene sentido comparar el grupo de sintomáticos respecto al de asintomáticos o viceversa.

Por esta razón, se ha calculado para cada grupo el valor $2^{-\Delta Ct}$ y se ha realizado el t-test de Student para determinar si existen diferencias significativas. En este caso, tal y como se muestra en la Figura 16, las diferencias no resultaron significativas.

Por otra parte, se ha considerado la comparación de las medias de expresión del gen de ApoD entre los grupos Asintomáticos ($DCt=16,21$) y Sintomáticos ($DCt=16,15$), no obteniéndose tampoco resultados estadísticamente significativos.

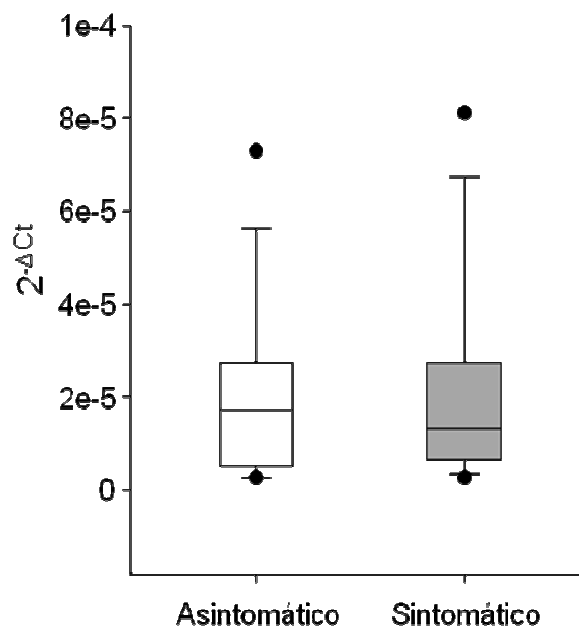


Figura 34. Se muestran los datos de expresión del gen de ApoD en pacientes asintomáticos y sintomáticos. Valores de las medianas: Asintomáticos $1,74 \cdot 10^{-5}$ y Sintomáticos $1,30 \cdot 10^{-5}$.

6.3.3.3. Gen de PON1

No se obtuvieron resultados comparables entre los dos grupos ya que no se sobrepasaba el nivel umbral de detección de la técnica en ninguna de las muestras.

7. DISCUSIÓN

La aterosclerosis carotídea es una enfermedad cuyas consecuencias pueden afectar a al territorio cerebral en un momento dado. El ictus es una de las principales causas de muerte que conllevan una incapacidad devastadora. La mayoría de los ictus son isquémicos y casi una tercera parte son debidos a enfermedad carotídea. El primer mecanismo de ictus relacionado con arteria carótida es un evento ateroembólico que proviene de la ruptura de una placa aterosclerótica inestable (251).

Los factores implicados en la patogenia del ictus isquémico de origen carotídeo son básicamente el estado de la circulación intracerebral, el grado de estenosis de la arteria carótida interna y la morfología de la placa. Es conocido que en la modificación de estos factores influyen, por una parte, los hábitos y antecedentes patológicos de los individuos y por otra parte, los cambios de una serie de parámetros que podemos medir, ya sea en la circulación sanguínea o directamente en la placa de aterosclerosis. En nuestro estudio hemos realizado un amplio análisis de estos parámetros, tal y como se ha expuesto en el apartado de resultados.

7.1. Características demográficas

El objetivo de las Tablas 3, 4 y 5 es mostrar cómo están distribuidos los pacientes en las diferentes clasificaciones (A, B y C) indicadas previamente. De esta manera podemos analizar de qué forma afectan estos parámetros propios de cada paciente (edad, sexo, fumador, antecedentes patológicos y tratamientos) a las variables estudiadas en suero o plasma y tejido carotídeo. Hay que tener en cuenta que se trata de variables descriptivas elegidas para el presente estudio y que a la hora de compararlas con otros estudios no tienen por qué coincidir en la forma en la que se distribuyen los grupos que hemos considerado.

Con respecto a la edad, podemos observar que la diferencia entre los grupos es significativa en las tres clasificaciones. En la clasificación A la edad del grupo control es considerablemente menor que la de los otros dos grupos. Esto es debido a que los controles procedían de Salud Laboral, con lo cual se trata de trabajadores en activo y, por tanto, más jóvenes que la media de los enfermos reclutados. Las diferencias entre

asintomáticos y sintomáticos también son significativas, siendo mayor la media de edad en el grupo de sintomáticos, lo cual concuerda con estudios previos (252).

La proporción de varones en nuestro estudio es mayor en enfermos que en controles en concordancia con la bibliografía (253,254), lo cual es lógico atendiendo a que el sexo masculino representa un factor de riesgo para la enfermedad aterosclerótica (1,253).

Respecto al hábito de fumar, lo que describimos como "fumador", obtenemos proporciones claramente superiores entre los enfermos, tanto en la clasificación A como en la B, lo cual concuerda con la bibliografía (252) ya que el tabaco supone uno de los factores de riesgo más importantes para la enfermedad, tal y como se describió previamente. En la clasificación C podemos observar cómo el porcentaje de fumadores es casi el doble entre los asintomáticos, lo cual indica que los pacientes sintomáticos son, probablemente, más conscientes de su enfermedad y del riesgo que supone el tabaco en su evolución, por lo que habrían seguido con más entusiasmo la recomendación de abandonar este hábito nocivo. No obstante, no hay estudios al respecto y lo expuesto tendría que ser demostrado en estudios más amplios.

La cardiopatía isquémica y la diabetes mellitus, factores de riesgo ya descritos, son más prevalentes en enfermos que en controles en nuestro estudio, tal y como se ha descrito previamente (252,255,256). Sin embargo, en la clasificación C, como se trata de enfermos en todos los casos, no se obtienen diferencias estadísticamente significativas. La proporción de diabéticos entre los enfermos (40,9%) se asemeja bastante al 33,3% descrito en otros estudios en pacientes con enfermedad arterial coronaria (257).

La relación de asociación entre la aterosclerosis y EPOC ya está previamente descrita (258) y en nuestro estudio así se corrobora. El EPOC es más frecuente en enfermos con aterosclerosis carotídea que en los sujetos control.

Otro factor de riesgo importante es la hipertensión arterial, claramente más prevalente en enfermos, como ya está descrito (252). Por ello, el tratamiento de la hipertensión, así como el de la hipercolesterolemia es muy importante en estos pacientes

(255,256). En nuestro estudio así queda reflejado, ya que tanto en la clasificación A como en la B, se aprecian diferencias estadísticamente significativas en cuanto al tratamiento con estatinas.

Tanto en pacientes asintomáticos como en sintomáticos, con o sin tratamiento de revascularización, el manejo óptimo de la estenosis carotídea requiere, además de cambios en el estilo de vida (dejar de fumar y controlar la hipertensión, la hiperlipidemia y la diabetes), tratamiento con antiagregantes. En nuestro caso, es evidente la diferencia de seguir o no un tratamiento de este tipo respecto a los controles en las clasificaciones A y B. Aunque en nuestro estudio no se han encontrado diferencias entre asintomáticos y sintomáticos, tal y como se muestra en la clasificación C, hay poca evidencia del beneficio de los antiagregantes en pacientes asintomáticos para frenar la progresión de la estenosis, aunque sí es más evidente la prevención secundaria de infartos recurrentes en pacientes sintomáticos. Además, el AAS se debe incluir en el perioperatorio de los pacientes, mientras que el clopidogrel tiene una indicación más discutida y se individualizada en cada caso (256). Aunque no sean tan eficaces, se pueden utilizar anticoagulantes en aterosclerosis carotídea, dato que se refleja en las clasificaciones A y B de nuestro estudio.

El grado de estenosis en nuestro estudio, en concordancia con Musialek et al. (259), no presenta diferencias significativas entre pacientes sintomáticos y asintomáticos.

7.2. Variables analíticas medidas en suero o plasma

En este apartado se discuten los resultados expuestos anteriormente en las Tablas 6, 7 y 8.

Existen datos experimentales que sugieren que los lípidos circulantes en el suero pueden ser iniciadores de la inflamación de la placa carotídea en pacientes con estenosis carotídea sintomática (260). En nuestro caso, la diferencia entre grupos en las tres clasificaciones no ha sido significativa para los triglicéridos. Sin embargo, sí lo han sido el **colesterol total** y las **LDL, a diferencia de lo observado en otro estudio**. En este último no se observaron diferencias en el colesterol total y las LDL aunque sí en los

niveles de triglicéridos al comparar sintomáticos y asintomáticos, siendo más bajos en asintomáticos, al contrario de lo observado en nuestro caso, si bien las diferencias no fueron significativas (259). De las clasificaciones A y B se deduce que, al tomar estatinas, que son fármacos hipolipemiantes que reducen la biosíntesis de colesterol al inhibir la hidroximetilglutaril-Coenzima A reductasa, los enfermos obtienen valores menores en la circulación sanguínea. En lo referente a la clasificación C, la diferencia también resulta significativa, de forma que los pacientes sintomáticos tienen valores inferiores de ambos parámetros, lo cual podría explicarse por una mejor adhesión al tratamiento o que el tratamiento es más intensivo.

Respecto a la medida de LDL oxidadas, marcadores de estrés oxidativo implicadas en la patogénesis de la formación de la placa y su inestabilidad, deberían estar aumentadas en la aterosclerosis (261). En nuestro estudio podemos observar cómo en las clasificaciones A y B las diferencias son significativas, de forma que los sujetos control tienen valores superiores al resto de grupos. Esto no concuerda con un aumento del nivel de estrés oxidativo en la aterosclerosis, sin embargo, este hecho se explica por varios motivos. El primero de ellos consiste en que la cantidad de macrófagos aumenta en los estados inflamatorios y esto hace que la captura de LDLox esté aumentada y, por tanto, estas partículas se encuentren en menor concentración en la circulación sanguínea, tal y como se describe en estudios previos (262). Por otra parte, la mayoría de los enfermos están siguiendo un tratamiento con estatinas, lo cual hace que la peroxidación lipídica disminuya y, por tanto, la concentración de LDLox, tal y como se indica en estudios previos (263,264).

Ya es conocido que el tratamiento con estatinas, cuyo principal objetivo es disminuir los niveles de colesterol a base de reducir fundamentalmente los niveles de LDL, provoca una elevación de los niveles de HDL en plasma (265). Sin embargo, en nuestro caso, los niveles de HDL siguen siendo mayores en el grupo control, por lo que las estatinas podrían haber hecho cierto efecto pero no llegan a normalizar los valores de dicho parámetro. Teniendo en cuenta la clasificación C, se observa cómo en sintomáticos los niveles son menores que en asintomáticos, al igual que se observa en otros estudios, aunque la diferencia no es significativa, hecho que se explicaría debido a que probablemente tengan un grado de aterosclerosis más avanzado. Algunos autores proponen este parámetro como predictor independiente de estado sintomático (259),

aunque en nuestro caso este uso sería dudoso, probablemente por considerar una muestra menor a los estudios consultados.

En este trabajo se ha comprobado que existen diferencias significativas para proteínas totales, urea y glucosa en las clasificaciones A y B, y sólo para glucosa en la clasificación C. Las diferencias son significativas para la urea pero no para la creatinina, al igual que observan Batagini et al. en grupos de pacientes con aterosclerosis carotídea con y sin progresión de la estenosis (141). Este aumento de la urea se asocia con la progresión de la enfermedad, debido al deterioro que provoca la aterosclerosis en la función renal. Aunque en nuestro estudio no hubo diferencias significativas en cuanto a antecedentes de enfermedad renal, sí encontramos aumentados los niveles de urea en enfermos y más aún en los sintomáticos de forma significativa, por lo que podría emplearse, junto con otros parámetros, como marcador de la progresión de la enfermedad aterosclerótica.

Existen datos que avalan que la glucosa ingerida en la dieta se considera un factor de riesgo para el infarto, sobre todo se asocian niveles elevados de glucosa con estenosis arterial cerebral asintomática, especialmente en arterias intracraneales y en arteria carótida extracraneal (266). Este dato se corrobora en nuestro estudio ya que los pacientes asintomáticos tienen niveles de glucosa superiores a los de los controles, sin embargo, hemos llegado un poco más lejos al observar que los pacientes sintomáticos todavía alcanzan valores más elevados que los asintomáticos aunque no de forma significativa, debido probablemente a que se trata de una muestra escasa.

Aunque algunos estudios mantienen que no existe una relación clara entre PCR y estenosis carotídea (141), otros demuestran que sí existe (267,268) y que puede utilizarse esta proteína como marcador de estenosis carotídea, tal y como hemos observado en nuestro caso en las clasificaciones A y B. La PCR está ligada al proceso inflamatorio y está todavía más aumentada en placas inestables frente a las estables, por lo que se puede utilizar como marcador de inestabilidad. En nuestro caso se marca una clara diferencia entre los niveles de PCR en sanos y en enfermos. En los sintomáticos los valores son mayores de promedio pero la diferencia con los asintomáticos no resulta estadísticamente significativa. Musialek et al. (259) sí observaron diferencias significativas entre estos dos grupos al medir PCR de alta sensibilidad. Aún así, existen

revisiones sobre este tema que indican que el screening rutinario y la estratificación del riesgo continúan siendo temas pendientes (269).

Respecto a la mieloperoxidasa, otro marcador de inflamación que se eleva en situaciones de estrés oxidativo, resultó significativamente mayor en enfermos que en sanos, aunque entre sintomáticos y asintomáticos la diferencia no fue significativa, de la misma manera que en otro estudio (259). No existen muchos datos acerca de la MPO en aterosclerosis carotídea, aunque está bastante más documentado el aumento de MPO en enfermedad coronaria (161,164,166,167).

La lipoproteína (a) y fosfolipasa A2 no presentan diferencias estadísticamente significativas, igual que observaron Musialek et al.(259). Probablemente este hecho se deba a que se trata de población no seleccionada de sujetos sintomáticos y asintomáticos que ya están en tratamiento farmacológico y esto dificulta la confirmación de la utilidad de estos biomarcadores de sintomatología medidos en suero o plasma. Existen estudios previos que relacionan la fosfolipasa A2 con procesos inflamatorios y con aterosclerosis (247), sobre todo a nivel cardiovascular, de forma que unida a HDL contribuye a la reducción de la aterosclerosis y unida a LDL estimula el proceso (48,239). A nivel carotídeo se ha estudiado también la relación que existe entre la actividad de la fosfolipasa A2 secretada y la mortalidad (241) o el pronóstico de evento cardíaco a largo plazo (240,246).

La osteopontina, un conocido inhibidor de la calcificación, aunque con un papel poco definido a nivel vascular, tiene una buena correlación con la inflamación y la incidencia de eventos cardiovasculares relacionados con la aterosclerosis. Sus niveles en plasma, que se incrementan en situaciones de estrés oxidativo, se pueden utilizar como marcador de aterosclerosis en pacientes con enfermedad arterial coronaria (211,228). En concordancia con Kadoglou et al. (270) encontramos una elevación de la OPN en el grupo de enfermos respecto al grupo control. Estos autores afirman que, además, la OPN se encuentra significativamente más elevada en pacientes sintomáticos frente a los asintomáticos. En nuestro caso, esta diferencia no ha resultado significativa, aunque la denominación de "sintomáticos" no es exactamente la misma que en el estudio anterior. Por otro lado, Berezin et al. (271) proponen unos niveles de OPN de 48,5 ng/mL como el mejor potencial predictor de riesgo de aterosclerosis coronaria en pacientes con

diabetes mellitus tipo 2 con enfermedad arterial coronaria asintomática, mientras que en nuestro estudio no se alcanzan valores tan bajos ni siquiera en el grupo control, cuya mediana es de 60,0 ng/mL. Parece que las medidas de OPN no se correlacionan bien entre los diferentes estudios, ya que Ohmori et al. (216) describen valores de 443 ng/mL en un grupo control frente a valores de 616 ng/mL en pacientes con enfermedad arterial coronaria.

ApoA1 y ApoB son factores de riesgo ampliamente aceptados en enfermedad arterial coronaria, sin embargo, en ictus la correlación no ha sido establecida con la misma claridad. Parece esperable, por tanto, que la concentración de ApoB aumente, ya que refleja la concentración de LDL, y que ApoA1 disminuya, ya que refleja la concentración de HDL (261). Esto es lo que observaron As et al. (229) en un estudio de casos de accidente cerebrovascular y controles. Otros autores han observado asociación entre ApoB en suero y aumento del grosor de la intima-media carotídea (233). En concordancia con estos datos, en nuestro estudio encontramos niveles disminuidos de ApoA1 en enfermos frente a controles. **Además, dentro del grupo de enfermos, en sintomáticos los niveles son significativamente menores que en asintomáticos, lo cual no ha sido previamente descrito.** Podemos considerar por tanto a la Apo A1 un marcador que se encuentra disminuido en aquellos pacientes con enfermedad más avanzada. por lo tanto estos enfermos podrían ser los candidatos a tratamiento quirúrgico. No hay que desdeñar el hecho de que la Apo A1 está relacionada con el estrés oxidativo, ya que es conocido que sus niveles en plasma son modulados por los niveles de oxidación. Respecto a ApoB, a diferencia de Wiseman et al. (272), en nuestro estudio está también disminuida en enfermos frente a controles y entre los enfermos, en sintomáticos los niveles son significativamente menores que en asintomáticos. Quizás esto pueda justificarse por el tratamiento exhaustivo con estatinas en enfermos, como se ha comentado anteriormente, ya que estos fármacos reducen los niveles de HDL y de ApoB (273,274).

En referencia a las sustancias antioxidantes, sólo se han encontrado diferencias significativas para β -carotenos, vitamina E y vitaminaC en las clasificaciones A y B, es decir, que podemos afirmar que encontramos niveles reducidos de estas sustancias en enfermos respecto al grupo control. Sin embargo, las diferencias entre asintomáticos y sintomáticos no son relevantes. Los niveles elevados de β -carotenos en plasma se

asocian a menor riesgo de aterosclerosis, ya que disminuyen las concentraciones de ROS y de LDL oxidadas (275–278), lo cual concuerda con nuestros hallazgos. Así mismo, bajas concentraciones de vitamina A, vitamina E y β -carotenos se asocian con aterosclerosis carotídea (279). Sin embargo, otros autores no encontraron diferencias significativas en lo referente a β -carotenos, vitaminas A, E y C en aterosclerosis carotídea (275,280). Por otro lado, algunos autores sí que han observado que los niveles de vitamina A, vitamina E y β -carotenos están descendidos en pacientes con enfermedad renal y aterosclerosis carotídea asintomática (281,282). Además, niveles mayores de carotenoides en suero parece que pueden proteger frente a estadios precoces de aterosclerosis (283).

7.3. Variables analíticas en tejido

La medida de **TBARS** se utiliza para estudiar la **peroxidación lipídica**. Aunque la especificidad del ensayo es limitada cuando se utiliza con materiales biológicos ya que hay otras sustancias que también reaccionan con el ácido tiobarbitúrico, es un método sensible y aceptado para la medida de MDA formado como producto de la peroxidación. Existen pocos estudios que midan TBARS en tejido, sin embargo, no nos consta que se haya medido en tejido carotídeo distinguiendo entre pacientes asintomáticos y sintomáticos. Nishi et al. midieron TBARS en placas carotídeas en relación con la histopatología concluyendo que los valores de TBARS se correlacionaban con la morfología y especialmente con la inestabilidad de la placa (284). En otro estudio se relacionan TBARS con aterosclerosis carotídea de forma no significativa en pacientes con rápida progresión y no progresión de la enfermedad (154). Por eso, **nuestro estudio resulta novedoso, ya que se ha estudiado el nivel de peroxidación lipídica en la placa aterosclerótica distinguiendo entre pacientes asintomáticos y sintomáticos** sometidos a endarterectomía carotídea. Además, la diferencia de peroxidación entre los dos grupos resulta significativa ($p=0,009$) lo cual permite postular que **el nivel de TBARS** en la placa está **relacionado** con la inestabilidad de la placa y, por tanto, **con la aparición de sintomatología**, siendo más frecuente la aparición de síntomas cuanto mayor sea el nivel de lípidos peroxidados en la placa aterosclerótica.

Por otro lado, bien es verdad que no se podría utilizar este parámetro como predictor de la aparición de sintomatología en la placa, ya que hay que extraer tejido de forma cruenta y no se debe someter a cirugía a un paciente por padecer la enfermedad, sino en función del grado de estenosis y del riesgo que ello suponga. No obstante, el nivel de estrés oxidativo en tejido es muy posible que se relacione con el nivel de estrés oxidativo en suero. Aunque en nuestro estudio los niveles de estrés oxidativo en suero entre sintomáticos y asintomáticos no han resultado significativos probablemente se puedan encontrar diferencias utilizando otros marcadores (lípidos peroxidados en suero, proteínas nitrosiladas en suero) que no se vean tan afectados por los tratamientos farmacológicos de estos pacientes.

La **ApoD** circulante está unida fundamentalmente a HDL y se asocia a ApoAII, participando así en el transporte de lípidos. Por otra parte, se ha observado depósito de ApoD en placas ateroscleróticas de humanos (194). Sin embargo, no nos consta que se haya medido ApoD en tejido mediante inmunohistoquímica. En nuestro estudio, se mide ApoD por un método semicuantitativo en pacientes asintomáticos y sintomáticos intervenidos de endarterectomía carotídea. Los resultados no muestran diferencias significativas entre los grupos ($p=0,082$), y esto probablemente se trate de un error β , debido al tamaño muestral reducido. Además, el hecho de que sólo haya cuatro valores posibles y que se hayan utilizado medianas, no nos deja apreciar lo que puede estar ocurriendo, es decir, que con mayor potencia estadística probablemente se hubieran encontrado diferencias.

Como una de las limitaciones del estudio, cabe destacar un análisis poco riguroso de las tinciones de muestras de tejido aterosclerótico, ya que no se utilizó ningún método morfométrico de medida para cuantificar ApoD. No se consideró repetir el estudio ya que este trabajo se centra fundamentalmente en el análisis bioquímico.

En nuestro estudio hemos medido la **expresión de determinados genes relacionados con estrés oxidativo** utilizando una micromatriz. Se han medido la expresión génica en el propio tejido de la placa. Todos los resultados obtenidos en cuanto a la expresión de genes son novedosos y no han sido descritos previamente en la literatura.

Entre ellos se encuentra el gen APOE, que codifica la apolipoproteína E, y que tiene genotipos asociados con LDL elevadas y con alto riesgo coronario, sin embargo, la asociación con el infarto isquémico no está tan clara aunque existe asociación con el grosor de la íntima-media carotídea (285,286). **En nuestro estudio, este gen es el que, con más diferencia, muestra mayores niveles de expresión en pacientes asintomáticos que en sintomáticos.** Este hecho difiere de lo observado por otros autores que estudiaron de forma similar, la expresión de APOE en placas de aterosclerosis sintomáticas y asintomáticas mediante microarrays, aunque no todas las placas eran de arteria carótida. Ellos observaron que en pacientes sintomáticos con lesiones incipientes había un depósito mayor de ApoE y que en lesiones ateroscleróticas avanzadas la cantidad de ApoE era mayor independientemente de la sintomatología (287). Por otra parte, también observamos que APOE es el gen que, con más diferencia, se expresa en mayor medida en pacientes con ApoD elevada.

En cuanto a la familia de las superóxido dismutasas (SOD), compuesta por SOD1 (citoplasmática), SOD2 (mitocondrial) y SOD3 (extracelular), encontramos que en pacientes sintomáticos, SOD3 muestra menores niveles de expresión que en pacientes asintomáticos, al igual que lo hacen SOD1 y CAT (catalasa, relacionada con SOD) aunque en menor grado de importancia. **Un incremento en la expresión de SOD1 confiere protección frente al daño oxidativo tanto agudo como crónico, incluyendo de esta manera la enfermedad aterosclerótica.** Este hecho concuerda con nuestros hallazgos, ya que se puede pensar que los pacientes sintomáticos tienen un estado más avanzado de la enfermedad. Por otra parte, se ha encontrado que SOD1 puede tener una actividad patológica en estas situaciones, de forma que el aumento de expresión de SOD1 y catalasa retrasan el desarrollo de la aterosclerosis en ratones ApoE^{-/-} (288). SOD3 está presente en la pared de los vasos y es sintetizada en las lesiones ateroscleróticas, aunque su actividad disminuye en las lesiones ricas en tejido conectivo. Su expresión se incrementa en macrófagos y disminuye en células de músculo liso vascular. Sin embargo, esta expresión está regulada por la biodisponibilidad de NO, por citoquinas inflamatorias, por la homocisteína (que disminuye su expresión perdiendo así la capacidad protectora frente al estrés oxidativo) y el estado de metilación de la región 5' del gen de SOD3 (que aumenta la expresión del enzima SOD3 en estadios precoces de aterosclerosis) (288).

Hemos encontrado que **la expresión de CSDE1** (Cold shock domain-containing protein E1), una proteína que se une a RNA en la regulación post-transcripcional de un subconjunto de RNA mensajeros celulares, **está disminuida en sintomáticos respecto a asintomáticos**. Se ha descrito que este gen codifica una proteína con un papel crucial en el control de la migración radial y tangencial de neuronas precerebelosas (289).

La expresión de DUSP1, también conocido como MKP1 (MAP quinasa fosfatasa 1), **está disminuida en sintomáticos respecto a los asintomáticos**. Lai et al. (290) describieron una disminución de la expresión de este gen en arteria carótida de rata tras producir un daño arterial con un balón. Esta reducción de la expresión puede contribuir en parte a la proliferación de células de músculo liso tras sufrir un daño en la arteria. Esto puede concordar con nuestros hallazgos, ya que se espera que la progresión, el daño, de la aterosclerosis sea mayor en pacientes sintomáticos.

El gen PDLIM1 (PDZ and LIM domain1) ha sido estudiado a nivel molecular y se expresa en distintos tejidos humanos como hígado, riñón, páncreas, bazo, timo y próstata, y parece que sintetiza una proteína que se localiza en el núcleo celular (291). También ha sido relacionada con el recambio de fibras de actina y con migración celular en cáncer de mama (292,293). Sin embargo, no nos consta que se haya relacionado en ningún caso este gen con la aterosclerosis ni con la clínica. En nuestro estudio este gen **ha resultado expresarse menos en pacientes sintomáticos**.

El gen SCARA3 (scavenger receptor class A, member 3) codifica una proteína que interviene en la respuesta hipóxica celular y que aumenta en situaciones de estrés oxidativo protegiendo a las células (294,295). Sin embargo, lo que hemos observado en nuestro estudio es que este gen disminuye su expresión en pacientes sintomáticos, en los cuales existe un estado de estrés oxidativo mayor, respecto a los asintomáticos. Esto indica que puede existir algún mecanismo a nivel de la regulación de este gen que impida su correcta expresión y que por tanto la proteína que codifica no pueda proteger las células. Esto daría lugar a una progresión del daño histológico y evolucionaría la enfermedad a la fase de sintomáticos.

La familia de peroxirredoxinas, cuyo gen se nombra como PRDX, son eliminadoras de peróxido de hidrógeno, por lo que constituyen un sistema de

prevención frente al daño inducido por radicales libres. Estos genes codifican enzimas antioxidantes con propiedades antiaterogénicas, y aumentarían su expresión en situaciones de estrés oxidativo. Algunos autores describen este hecho en referencia a la PRDX1 (296,297) y Guo et al. lo hacen en referencia a PRDX4 (298). En nuestro caso se han estudiado PRDX2, cuya expresión es menor en sintomáticos respecto a asintomáticos, y PRDX1, PRDX3, PRDX4, PRDX5 y PRDX6, cuya expresión ha sido indiferente entre los dos grupos. En caso de PRDX2 parece que existe un mecanismo en el contexto de la enfermedad avanzada (sintomáticos) que está disminuyendo la expresión de la proteína, lo que produciría un aumento del estrés oxidativo y un aumento del daño.

Otros genes que, con quizás menor importancia, se expresan menos en sintomáticos que en asintomáticos son: PRNP (prion protein), GPX3 (glutathione peroxidase 3), TXNRD1 (thioredoxin reductase), MGST3 (microsomal glutathione *S*-transferase 3), MPV17 (*mitochondrial inner membrane protein*), CYBA (*cytochrome b-245, alpha polypeptide*) y GPX4 (*glutathione peroxidase 4*). Parece ser que estos genes también codifican proteínas con efectos antioxidantes, por lo que en condiciones normales deberían estar aumentados en caso de aumento de estrés oxidativo. Como ya hemos comentado parece existir un mecanismo en la patogenia de la enfermedad que impide la correcta expresión de estos genes, propiciando la aparición de síntomas. CYBA es uno de los genes que, con más diferencia, se expresa en pacientes con ApoD elevada respecto a aquellos con ApoD baja. Siendo ApoD una proteína protectora frente al estrés oxidativo parece lógica esta asociación.

Todos los genes que hemos comentado hasta ahora codifican proteínas protectoras del estrés oxidativo. Por primera vez en la literatura describimos que estos genes se encuentran silenciados en pacientes con sintomatología. Además esta ausencia de expresión se corresponde con un aumento del estrés oxidativo en tejido (medido por TBARs como ya hemos comentado). Podemos decir por tanto que existe un mecanismo en la fisiopatología de la enfermedad que disminuye la expresión de estos genes, permitiendo así un aumento de los niveles de estrés oxidativo en la placa que a su vez tiene como consecuencia una progresión de la enfermedad y la aparición de la sintomatología. Hasta ahora todo eran hipótesis y suposiciones sobre que esto era así, pero este estudio consigue arrojar los primeros datos sobre lo que hasta ahora solo

era una hipótesis. Hasta ahora se sabía que los niveles de estrés oxidativo estaban aumentados en enfermos con respecto a sanos. Esto lo hemos corroborado con los marcadores en suero que hemos comentado anteriormente. Se suponía que la oxidación seguía aumentando propiciando la progresión de la enfermedad. Ahora mediante este trabajo lo hemos confirmado.

En nuestro estudio, el gen que con mayor diferencia muestra mayores niveles de expresión en sintomáticos que en asintomáticos es el TXNDC2 (thioredoxin domain containing 2, spermatozoa), también conocido como SPTRX o SPTRX1. Este gen codifica una proteína de la familia de las tiorredoxinas con un patrón de expresión específico de tejido encontrado exclusivamente en el tallo de elongación de espermátides y espermatozoides. Funcionalmente se comporta como un agente oxidante in vitro cuando se utiliza selenito (299) y es un protector importante de los espermatozoides frente al estrés oxidativo asociado a la edad paterna (300). En un estudio de ratones se plantea el efecto cardioprotector que tiene la sobreexpresión de TRX1 (*thioredoxin 1*), procurando una recuperación más rápida tras un infarto isquémico y una reducción del tamaño del mismo (301). También se ha relacionado con un efecto de incremento del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y con un aumento de la angiogénesis en tumores (302). En nuestro caso no tenemos muy claro que función puede tener la mayor expresión en sintomáticos, ya que podríamos esperar que la expresión fuera menor en sintomáticos por presentar supuestamente unos valores mayores de estrés oxidativo, ya que parece que la tiorredoxina tiene poder antioxidante, como pasa con la expresión de los otros genes protectores frente al estrés oxidativo. Sin embargo el patrón de expresión no tiene porqué ser igual para todos los genes. De hecho, es posible que la sobreexpresión de este gen pueda estar intentando compensar el déficit de expresión de los demás.

El gen KRT1 (keratin 1) parece que está relacionado con la respuesta al estrés provocado en los queratinocitos de la piel provocado mediante radiación ultravioleta, ya que aumenta su expresión en estas condiciones para proteger a la célula (303). El patrón de expresión de los filamentos de queratina en epitelios humanos es complejo y, a veces, característico, como es el caso de algunas neoplasias (304). Aunque se ha estudiado la expresión del gen en tumores endoteliales, no nos consta que se haya estudiado el patrón de expresión de este gen en endotelio vascular aterosclerótico. Se ha

detectado citoqueratina ocasionalmente en células de la media de arterias musculares, en muchas células endoluminales y formando aglomerados en la íntima coronaria y células de músculo liso en la media de arterias elásticas (305). **Nosotros hemos observado que la expresión del gen KRT1 es mayor en tejido arterial de pacientes sintomáticos que en asintomáticos.** Dado que está relacionado el aumento de expresión del gen con el estrés oxidativo, podría ser lógico este hallazgo, considerando que en pacientes sintomáticos el nivel del estrés oxidativo es mayor.

La aterosclerosis es una enfermedad crónica inflamatoria de la pared de los vasos en la que las vías de transcripción que implican ROS, mediante reacciones de reducción y oxidación, son capaces de afectar a la progresión de la placa. Las NADPH oxidasas son determinantes críticos del estado de reducción-oxidación de la pared del vaso y tienen un papel importante en la fisiopatología de la aterosclerosis. En esta familia de NADPH oxidasas se han identificado Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 y Duox2. En células de músculo liso vascular de ratón se han identificado como predominantes Nox1 y Nox4. Vendrov et al. proponen mecanismos moleculares por los que la activación de NADPH oxidasa favorece la formación de la lesión aterosclerótica (306). NOX5 calcio-dependiente es la forma implicada en el daño oxidativo en aterosclerosis en humanos (307,308). En el panel de expresión de genes llevado a cabo en nuestro estudio, se analizaron DUOX1, DUOX2 y NOX5. Observamos cómo DUOX2 tiene mayores niveles de expresión en sintomáticos que en asintomáticos de forma significativa, sin embargo, DUOX1 y NOX5 no presentan diferencias de expresión entre los dos grupos. Otros autores sí que han encontrado sobreexpresión de genes NOX en placas ateroscleróticas de arterias coronarias (309). Por otra parte, al analizar estos mismos genes respecto a los niveles de ApoD, en pacientes con ApoD elevada se expresan menos DUOX1, DUOX2 y NOX5. Esto concuerda con el hecho de que ApoD protege frente al estado de oxidación disminuyendo el nivel de estrés oxidativo.

El estrés oxidativo, como ya es conocido desde hace tiempo, acumula ROS, que tienen un papel regulador de los genes y vías de transducción implicados en los mecanismos de defensa frente al mismo. Este estrés oxidativo puede estar causado a su vez por la inactivación de los sistemas glutatión peroxidasa. Este sistema glutatión peroxidasa está constituido por 8 enzimas, de las cuales se ha estudiado la expresión

génica en todas ellas: GPX1(citosólica, en eritrocitos y gran variedad de células), GPX2 (citoplasmática y nuclear, en hígado y tracto gastrointestinal), GPX3 (citoplasmática, en plasma), GPX4 (citoplasmática, nuclear y mitocondrial), GPX5 (similar a GPX3, en esperma), GPX6 (secretada, en epitelio olfativo), GPX7 (citosólica y secretada, en diversos tejidos, relacionada con estrés oxidativo en cáncer de mama) y GPX8 (membranosa).

Se ha estudiado que la actividad de GPX1 disminuye en casos de aterosclerosis, sobre todo a nivel cardiovascular (310), sin embargo, no parece que se haya estudiado el patrón de expresión del gen. Nosotros no hemos encontrado diferencias reseñables en cuanto a la expresión del gen en pacientes sintomáticos y asintomáticos.

Sacks et al. observaron sobreexpresión de GPX3 en pacientes con aterosclerosis coronaria severa estable frente a controles (311). En nuestro caso, GPX3 muestra mayores niveles de expresión en asintomáticos que en sintomáticos, no habiendo sido posible la comparación con un grupo control, lo que explicaría el aumento de estrés oxidativo al fallar la expresión del gen.

La sobreexpresión de GPX4 mitocondrial inhibe la apoptosis protegiendo la cardiolipina de la oxidación, mientras que la sobreexpresión de GPX4 no mitocondrial suprime la activación de lipooxigenasas y ciclooxigenasas en respuesta a varios estímulos. La pérdida de la actividad de GPX4 se ha asociado a aterosclerosis. Hemos observado que **la expresión de GPX4 es mayor en pacientes asintomáticos que en sintomáticos**, lo cual concuerda con un mayor daño en este último grupo debido a que se expresa menos y pierde la protección frente a la oxidación.

Por otro lado, hemos encontrado que la expresión de GPX6, GPX7 y GPX2 es mayor en sintomáticos que en asintomáticos, lo que indicaría que la expresión de estos genes no estaría dañada e intentarían proteger a la célula del estrés oxidativo GPX1 y GPX5 tienen patrones de expresión similares en los dos grupos.

Otro de los genes que muestra mayores niveles de expresión en sintomáticos es SGK2 (Serum/glucocorticoid regulated kinase 2), cuya proteína es similar en un 80% a sgk1, un mediador de transporte de sodio regulado por mineralocorticoides en la

nefrona distal del riñón (312). Este aumento de la expresión podría estar relacionado con la hipertensión y la nefropatía diabética, como parece estarlo la *sgk1* (313), sin embargo, no parece que esté estudiada directamente su relación con la aterosclerosis. Otros autores relacionan a esta enzima con la vasculitis coronaria y la respuesta fibrótica intestinal y perivascular (314).

Los genes de LPO (lactoperoxidasa), TPO (thyroid peroxidase), EPX (eosinophil peroxidase) y NOS2A (*nitric oxide synthase 2a, inducible*) se expresan en mayor medida en sintomáticos que en asintomáticos. Parece que la expresión de estas enzimas no se han relacionado previamente con aterosclerosis. La expresión de TPO, LPO y MPO son mayores cuando los pacientes tienen ApoD baja.

El gen GSR (glutathione reductase), vemos que tiene mayores niveles de expresión en sintomáticos que en asintomáticos. Lapenna et al. observaron que, en lesiones ateroscleróticas humanas, existe un efecto protector antioxidante de carácter enzimático relacionado con el glutation, lo cual parece relacionar el desequilibrio entre antioxidantes y prooxidantes en la pared vascular en procesos de aterosclerosis (315). Sin embargo, parece que la expresión de este gen no está estudiada en relación con este tema.

EPHX2 (epoxide hydrolase 2) es un gen relacionado con la formación de ácidos epoxieicosatrienoicos, que tienen múltiples funciones biológicas, entre ellas influye en la inflamación y la aterosclerosis. Tanto es así que se postulan tratamientos de inhibición de estos ácidos como terapia frente a la aterosclerosis (316). En nuestro estudio se ha encontrado mayor expresión de este gen en sintomáticos frente a asintomáticos, lo que indica una mayor progresión de la enfermedad.

Respecto a PTGS2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, también conocida como COX2) y PTGS1 (prostaglandin-endoperoxide synthase 1, también conocida como COX1), Liu et al. encontraron que la expresión de COX2 era mayor en placas ateroscleróticas que en el grupo control, lo cual sugiere que la enzima codificada por este gen participa en la patogénesis de la aterosclerosis y la modulación del proceso inflamatorio involucrado en la estabilidad de la placa (317). Otros autores demostraron que aumentaba la expresión de este gen in vitro en extracto lipídico de placas carotídeas

humanas (318) y que la expresión de COX2 era mayor en arterias ateroscleróticas que en controles, mientras que la expresión de COX1 no fue determinante (319). Nosotros hemos observado, que en concordancia con estos hallazgos, la expresión de ambos genes es mayor en el grupo de pacientes sintomáticos, aunque es más significativa la diferencia en el caso de PTGS2.

MT3 (metallothionein 3) se expresa en células de músculo liso de arterias coronarias y en macrófagos en la placa aterosclerótica humana. Uzui et al. demostraron que las moléculas proinflamatorias aumentaban la expresión de este gen en cultivos de macrófagos, contribuyendo así a la desestabilización de la placa (320). Nuestros hallazgos concuerdan con estos autores, ya que encontramos mayor expresión en pacientes sintomáticos.

ANGPTL7 (angiopoietin-like 7) es un gen que expresa una proteína implicada en la angiogénesis y relacionada con el cáncer, aunque su función no está bien definida. Parri et al. consideran que hay evidencia de que su expresión aumenta en situaciones de hipoxia (321). Nuestros pacientes sintomáticos expresan en mayor medida este gen que los asintomáticos. Esto podría explicarse en base al hallazgo de Parri et al. si en la placa de los sintomáticos la hipoxia fuera mayor. Además, es conocido que en situaciones de hipoxia aumentan los niveles de estrés oxidativo, por lo que podría estar en consonancia.

La proteína codificada por el gen MBL 2 (mannose-binding lectin 2), perteneciente al sistema inmune innato, parece que modifica el desarrollo de la aterosclerosis, ya que esta proteína se ve favorecida en estados de inflamación crónica e infecciones subclínicas. Tanto los niveles altos de lectina de unión a manosa en suero, como los bajos, se asocian con enfermedad cardiovascular y también con aumento del grosor de la arteria carótida común (322). En nuestro caso no se estudian niveles en suero sino la expresión del gen en tejido, observando que se expresa en mayor medida en pacientes sintomáticos que en asintomáticos. Esto podría asociarse con niveles elevados de la proteína en suero, lo que podríamos confirmar en posteriores estudios. No obstante, los resultados obtenidos concuerdan con los de la bibliografía.

En referencia a NUDT1 (nucleoside diphosphate linked moiety X o también conocida como *MTH1*) observamos que su expresión es mayor en sintomáticos que en asintomáticos. Este hecho estaría apoyado por Risom et al. (323), que estudiaron la expresión de NUDT1 en relación de hipoxia y reoxigenación sin encontrar alteraciones tras las mismas, con lo cual apoyan que la hipoxia aguda no influye en la regulación de genes implicados en la reparación de DNA oxidado en situaciones de estrés oxidativo.

El gen ALOX12 (arachidonate 12-lipoxygenase) hemos visto que tiene mayor nivel de expresión en sintomáticos que en asintomáticos y en pacientes con ApoD baja respecto a los que tienen ApoD elevada. Gertow et al. (324) estudiaron la expresión de ALOX12 entre otros genes de la familia de las lipooxigenasas (ALOX) en placas de carótida y estudiando dos grupos similares a los nuestros, sintomáticos y asintomáticos. En este caso no encontraron niveles de expresión significativos en el caso de ALOX12.

Otros genes que hemos detectado que muestran mayor nivel de expresión en sintomáticos que en asintomáticos pero con menos intensidad son los siguientes, que no se comentan por no ser específicos del proceso aterosclerótico y no haberse encontrado bibliografía en relación con el mismo: DGKK (diacylglycerol kinase, kappa), PRG3 (proteoglycan 3), SRXN1 (sulfiredoxin 1), MTL5 (metallothionein-like 5), NME5 (NME/NM23 family member 5), CYGB (cytoglobin), PIP3-E (interaction protein for cytohesin exchange factors 1 o IPCEF1), SFTPD (surfactant protein D) y SIRT2 (sirtuin 2). DGKK, MTL5, SRXN1 SFTPD, NME5 Y PIP3-E se expresan más en pacientes con ApoD baja.

SEPP1 (*selenoprotein P*) es uno de los genes cuya expresión es indiferente entre sintomáticos y asintomáticos. Sin embargo, es uno de los que, con mayor diferencia, se expresa más en pacientes con ApoD elevada que en aquellos con ApoD baja.

De forma general, observamos que los genes que muestran mayor nivel de expresión en los pacientes sintomáticos son de dos tipos. Por una parte, encontramos genes pro-oxidantes, lo que constituye un mecanismo coadyuvante para que se produzca un aumento del estrés oxidativo. Por otra parte, encontramos incrementada la expresión de genes antioxidantes en un claro intento de compensar el papel defensivo. Estos últimos genes intentarían mitigar el daño sustituyendo a los genes silenciados. No

obstante, parece no ser suficiente este mecanismo ya que los niveles de estrés oxidativo se encuentran incrementados.

8. CONCLUSIONES

- I) **La mieloperoxidasa**, marcador de inflamación, **está elevada en enfermos respecto a sanos**, aunque no existen diferencias entre sintomáticos y asintomáticos. Los niveles de MPO en suero reflejan mayores niveles de estrés oxidativo, por lo que se puede utilizar como un marcador en suero.
- II) **ApoA1 tiene valores menores en el grupo de enfermos respecto a los controles**. Además, dentro del grupo de enfermos, **en sintomáticos los niveles son significativamente menores que en asintomáticos**. La ApoA1 se puede utilizar como marcador de estabilidad de placa en esta enfermedad.
- III) **La osteopontina se encuentra más elevada en el grupo de enfermos respecto al grupo control**, no habiéndose encontrado diferencias significativas entre sintomáticos y asintomáticos. Este parámetro se comporta como un biomarcador de inestabilidad de placa carotídea, siendo más elevada en pacientes con eventos isquémicos cerebrovasculares. **La determinación en plasma de sus niveles puede ser útil para caracterizar aquellos pacientes con riesgo de ictus**.
- IV) Los niveles de sustancias antioxidantes como β -carotenos, vitamina E y vitamina C son más bajos en enfermos que en el grupo control. Dado que la fuente de estas moléculas es la dieta, este hecho indica que los sujetos enfermos consumen menos alimentos ricos en antioxidantes.
- V) **La peroxidación lipídica en tejido carotídeo medida a través de TBARS se encuentra más elevada en pacientes sintomáticos que en los asintomáticos, es decir, tienen unos valores de estrés oxidativo en tejido más elevados**, lo cual es un aspecto novedoso en la literatura.
- VI) No se encuentran diferencias significativas en la cuantificación ni en la expresión del gen de ApoD en tejido carotídeo en pacientes sintomáticos y asintomáticos, probablemente debido a un tamaño muestral pequeño (error β).
- VII) **Los genes relacionados con el estrés oxidativo que tienen mayor nivel de expresión, de forma destacada, en pacientes asintomáticos que en sintomáticos son: APOE y SOD3**, seguidos de CSDE1, SOD1, DUSP1, PDLIM1, SCARA3 y PRDX2, entre otros. Estos genes codifican proteínas protectoras para el estrés oxidativo, lo cual indica que existe algún mecanismo

en la patogénesis de la enfermedad que impide la correcta expresión de estos genes, lo que conlleva un aumento del estrés oxidativo y una progresión de la enfermedad.

VIII) Los genes relacionados con el estrés oxidativo que tienen mayor nivel de expresión en pacientes sintomáticos que en asintomáticos son: TXNDC2, KRT1, GPX6, SGK2, TPO, LPO y DUOX2, entre otros.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84(4):1381-478.
2. Heistad DD, Wakisaka Y, Miller J, Chu Y, Pena-Silva R. Novel aspects of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 2009;73(2):201-7.
3. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407(6801):233-41.
4. Mamarelis I, Pissaridi K, Dritsa V, Kotileas P, Tsiligiris V, Tzilalis V, et al. Oxidative stress and atherogenesis. An FT-IR spectroscopic study. *Vivo Athens Greece.* 2010;24(6):883-8.
5. Sacco RL, Hauser WA, Mohr JP. Hospitalized stroke in blacks and Hispanics in northern Manhattan. *Stroke J Cereb Circ.* 1991;22(12):1491-6.
6. Brass LM, Isaacsohn JL, Merikangas KR, Robinette CD. A study of twins and stroke. *Stroke J Cereb Circ.* 1992;23(2):221-3.
7. Graffagnino C, Gasecki AP, Doig GS, Hachinski VC. The importance of family history in cerebrovascular disease. *Stroke J Cereb Circ.* 1994;25(8):1599-604.
8. Vlek ALM, van der Graaf Y, Sluman MA, Moll FL, Visseren FLJ, SMART Study Group. Metabolic syndrome and vascular risk in patients with peripheral arterial occlusive disease. *J Vasc Surg.* 2009;50(1):61-9.
9. DAWBER TR, MEADORS GF, MOORE FE Jr. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am J Public Health Nations Health.* 1951;41(3):279-81.
10. Frohlich J, Al-Sarraf A. Cardiovascular risk and atherosclerosis prevention. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol.* 2013;22(1):16-8.
11. Saely CH, Rein P, Vonbank A, Huber K, Drexel H. Type 2 diabetes and the progression of visualized atherosclerosis to clinical cardiovascular events. *Int J Cardiol.* 2013;167(3):776-80.
12. Park YM, R Kashyap S, A Major J, Silverstein RL. Insulin promotes macrophage foam cell formation: potential implications in diabetes-related atherosclerosis. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* 2012;92(8):1171-80.
13. Fernández-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev.* 2003;24(3):278-301.
14. Vitale E, Zuliani G, Baroni L, Bicego L, Grego F, Valerio G, et al. Lipoprotein abnormalities in patients with extra-coronary arteriosclerosis. *Atherosclerosis.* 1990;81(2):95-102.
15. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med.* 1977;62(5):707-14.

16. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest.* 2001;108(6):785-91.
17. Yu X-H, Fu Y-C, Zhang D-W, Yin K, Tang C-K. Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2013;424:245-52.
18. Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest.* 2002;110(7):905-11.
19. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002;106(25):3143-421.
20. Sarwar N, Sattar N. Triglycerides and coronary heart disease: have recent insights yielded conclusive answers? *Curr Opin Lipidol.* 2009;20(4):275-81.
21. Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(10):1731-7.
22. Mayhan WG, Sharpe GM. Effect of cigarette smoke extract on arteriolar dilatation in vivo. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1996;81(5):1996-2003.
23. Bermudez EA, Rifai N, Buring JE, Manson JE, Ridker PM. Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women. *Am J Cardiol.* 2002;89(9):1117-9.
24. Ichiki K, Ikeda H, Haramaki N, Ueno T, Imaizumi T. Long-term smoking impairs platelet-derived nitric oxide release. *Circulation.* 1996;94(12):3109-14.
25. Heitzer T, Ylä-Herttuala S, Luoma J, Kurz S, Münzel T, Just H, et al. Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL. *Circulation.* 1996;93(7):1346-53.
26. Nishio E, Watanabe Y. Cigarette smoke extract inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;236(2):289-93.
27. Assmann G, Cullen P, Jossa F, Lewis B, Mancini M. Coronary Heart Disease: Reducing the Risk The Scientific Background to Primary and Secondary Prevention of Coronary Heart Disease A Worldwide View. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(8):1819-24.
28. Dwyer JH, Paul-Labrador MJ, Fan J, Shircore AM, Merz CNB, Dwyer KM. Progression of Carotid Intima-Media Thickness and Plasma Antioxidants: The Los Angeles Atherosclerosis Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(2):313-9.

29. Ciccone MM, Cortese F, Gesualdo M, Carbonara S, Zito A, Ricci G, et al. Dietary Intake of Carotenoids and Their Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects in Cardiovascular Care. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:782137.
30. Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med.* 1993;328(20):1444-9.
31. Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med.* 1993;328(20):1450-6.
32. De Gaetano G, Collaborative Group of the Primary Prevention Project. Low-dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomised trial in general practice. Collaborative Group of the Primary Prevention Project. *Lancet.* 2001;357(9250):89-95.
33. Sesso HD, Buring JE, Christen WG, Kurth T, Belanger C, MacFadyen J, et al. Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. *JAMA J Am Med Assoc.* 2008;300(18):2123-33.
34. Zioncheck TF, Powell LM, Rice GC, Eaton DL, Lawn RM. Interaction of recombinant apolipoprotein(a) and lipoprotein(a) with macrophages. *J Clin Invest.* 1991;87(3):767-71.
35. Kitta Y, Obata J, Nakamura T, Hirano M, Kodama Y, Fujioka D, et al. Persistent impairment of endothelial vasomotor function has a negative impact on outcome in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53(4):323-30.
36. Anderson TJ, Meredith IT, Charbonneau F, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, et al. Endothelium-dependent coronary vasomotion relates to the susceptibility of LDL to oxidation in humans. *Circulation.* 1996;93(9):1647-50.
37. Harrison DG, Armstrong ML, Freiman PC, Heistad DD. Restoration of endothelium-dependent relaxation by dietary treatment of atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1987;80(6):1808-11.
38. John S, Schlaich M, Langenfeld M, Weihprecht H, Schmitz G, Weidinger G, et al. Increased bioavailability of nitric oxide after lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic patients: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Circulation.* 1998;98(3):211-6.
39. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352(16):1685-95.
40. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med.* 2011;17(11):1410-22.
41. Szmítko PE, Wang C-H, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation.* 2003;108(16):1917-23.

42. Brizzi MF, Formato L, Dentelli P, Rosso A, Pavan M, Garbarino G, et al. Interleukin-3 stimulates migration and proliferation of vascular smooth muscle cells: a potential role in atherogenesis. *Circulation*. 2001;103(4):549-54.
43. Tintut Y, Patel J, Parhami F, Demer LL. Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation*. 2000;102(21):2636-42.
44. Kushner I. The phenomenon of the acute phase response. *Ann N Y Acad Sci*. 1982;389:39-48.
45. Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation*. 2001;103(9):1194-7.
46. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*. 2000;102(18):2165-8.
47. Pasceri V, Cheng JS, Willerson JT, Yeh ET, Chang J. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation*. 2001;103(21):2531-4.
48. Davidson MH, Corson MA, Alberts MJ, Anderson JL, Gorelick PB, Jones PH, et al. Consensus panel recommendation for incorporating lipoprotein-associated phospholipase A2 testing into cardiovascular disease risk assessment guidelines. *Am J Cardiol*. 2008;101(12A):51F - 57F.
49. Garza CA, Montori VM, McConnell JP, Somers VK, Kullo IJ, Lopez-Jimenez F. Association between lipoprotein-associated phospholipase A2 and cardiovascular disease: a systematic review. *Mayo Clin Proc*. 2007;82(2):159-65.
50. Rosenson RS, Hurt-Camejo E. Phospholipase A2 enzymes and the risk of atherosclerosis. *Eur Heart J*. 2012;33(23):2899-909.
51. Halvorsen B, Dahl TB, Smedbakken LM, Singh A, Michelsen AE, Skjelland M, et al. Increased levels of CCR7 ligands in carotid atherosclerosis: different effects in macrophages and smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2014;
52. Young JL, Libby P, Schönbeck U. Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2002;88(4):554-67.
53. Abbas A, Aukrust P, Russell D, Krohg-Sørensen K, Almås T, Bundgaard D, et al. Matrix metalloproteinase 7 is associated with symptomatic lesions and adverse events in patients with carotid atherosclerosis. *PloS One*. 2014;9(1):e84935.
54. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(8 Suppl):C7-12.
55. Wettinger SB, Doggen CJM, Spek CA, Rosendaal FR, Reitsma PH. High throughput mRNA profiling highlights associations between myocardial infarction and aberrant expression of inflammatory molecules in blood cells. *Blood*. 2005;105(5):2000-6.

56. Hao W, Friedman A. The LDL-HDL profile determines the risk of atherosclerosis: a mathematical model. *PloS One*. 2014;9(3):e90497.
57. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med*. 2002;347(3):185-92.
58. Hasenstab D, Lea H, Hart CE, Lok S, Clowes AW. Tissue factor overexpression in rat arterial neointima models thrombosis and progression of advanced atherosclerosis. *Circulation*. 2000;101(22):2651-7.
59. Potter DD, Sobey CG, Tompkins PK, Rossen JD, Heistad DD. Evidence that macrophages in atherosclerotic lesions contain angiotensin II. *Circulation*. 1998;98(8):800-7.
60. Mathew V, Cannan CR, Miller VM, Barber DA, Hasdai D, Schwartz RS, et al. Enhanced endothelin-mediated coronary vasoconstriction and attenuated basal nitric oxide activity in experimental hypercholesterolemia. *Circulation*. 1997;96(6):1930-6.
61. Hasdai D, Holmes DR Jr, Garratt KN, Edwards WD, Lerman A. Mechanical pressure and stretch release endothelin-1 from human atherosclerotic coronary arteries in vivo. *Circulation*. 1997;95(2):357-62.
62. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001;107(10):1255-62.
63. Inoue T, Uchida T, Kamishirado H, Takayanagi K, Hayashi T, Morooka S. Clinical significance of antibody against oxidized low density lipoprotein in patients with atherosclerotic coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(3):775-9.
64. Yu E, Calvert PA, Mercer JR, Harrison J, Baker L, Figg NL, et al. Mitochondrial DNA damage can promote atherosclerosis independently of reactive oxygen species through effects on smooth muscle cells and monocytes and correlates with higher-risk plaques in humans. *Circulation*. 2013;128(7):702-12.
65. Davidson SM, Yellon DM. Mitochondrial DNA damage, oxidative stress, and atherosclerosis: where there is smoke there is not always fire. *Circulation*. 2013;128(7):681-3.
66. Calvert PA, Obaid DR, O'Sullivan M, Shapiro LM, McNab D, Densem CG, et al. Association between IVUS findings and adverse outcomes in patients with coronary artery disease: the VIVA (VH-IVUS in Vulnerable Atherosclerosis) Study. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2011;4(8):894-901.
67. Stone GW, Maehara A, Lansky AJ, de Bruyne B, Cristea E, Mintz GS, et al., PROSPECT Investigators. A prospective natural-history study of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2011;364(3):226-35.

68. Tsao PS, Buitrago R, Chan JR, Cooke JP. Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation*. 1996;94(7):1682-9.
69. Gnasso A, Carallo C, Irace C, Spagnuolo V, De Novara G, Mattioli PL, et al. Association between intima-media thickness and wall shear stress in common carotid arteries in healthy male subjects. *Circulation*. 1996;94(12):3257-62.
70. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary Plaque Disruption. *Circulation*. 1995;92(3):657-71.
71. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber DK, Malcom GT, Smialek J, et al. Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation*. 2001;103(7):934-40.
72. Cacciapuoti F. Hyper-homocysteinemia: a novel risk factor or a powerful marker for cardiovascular diseases? Pathogenetic and therapeutical uncertainties. *J Thromb Thrombolysis*. 2011;32(1):82-8.
73. Schneider JA, Bienias JL, Wilson RS, Berry-Kravis E, Evans DA, Bennett DA. The apolipoprotein E epsilon4 allele increases the odds of chronic cerebral infarction [corrected] detected at autopsy in older persons. *Stroke J Cereb Circ*. 2005;36(5):954-9.
74. Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Thudium D, Moes Grønholdt ML, Tybjaerg-Hansen A. APOE genotype predicts AD and other dementia but not ischemic cerebrovascular disease. *Neurology*. 2001;56(2):194-200.
75. Sturgeon JD, Folsom AR, Bray MS, Boerwinkle E, Ballantyne CM, Atherosclerosis Risk in Communities Study Investigators. Apolipoprotein E genotype and incident ischemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Stroke J Cereb Circ*. 2005;36(11):2484-6.
76. Muhlestein JB, Hammond EH, Carlquist JF, Radicke E, Thomson MJ, Karagounis LA, et al. Increased incidence of Chlamydia species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerotic versus other forms of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27(7):1555-61.
77. Sorlie PD, Nieto FJ, Adam E, Folsom AR, Shahar E, Massing M. A prospective study of cytomegalovirus, herpes simplex virus 1, and coronary heart disease: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Arch Intern Med*. 2000;160(13):2027-32.
78. Danesh J, Peto R. Risk factors for coronary heart disease and infection with *Helicobacter pylori*: meta-analysis of 18 studies. *BMJ*. 1998;316(7138):1130-2.
79. Epstein SE, Zhou YF, Zhu J. Infection and atherosclerosis: emerging mechanistic paradigms. *Circulation*. 1999;100(4):e20-8.
80. Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, et al. 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, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92(5):1355-74.
81. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J Off J Jpn Circ Soc*. 2009;73(3):411-8.
 82. Bonithon-Kopp C, Coudray C, Berr C, Touboul PJ, Fève JM, Favier A, et al. Combined effects of lipid peroxidation and antioxidant status on carotid atherosclerosis in a population aged 59-71 y: The EVA Study. *Etude sur le Vieillissement Artériel*. *Am J Clin Nutr*. 1997;65(1):121-7.
 83. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med*. 2003;349(24):2316-25.
 84. Hollander M, Bots ML, Del Sol AI, Koudstaal PJ, Witteman JCM, Grobbee DE, et al. Carotid plaques increase the risk of stroke and subtypes of cerebral infarction in asymptomatic elderly: the Rotterdam study. *Circulation*. 2002;105(24):2872-7.
 85. González-Fajardo JA, Cenizo-Revuelta N, San José-Barrachina I, del Río-Solá ML, Gutiérrez-Alonso C, Vaquero-Puerta C. Relación entre la morfología de la placa y la clínica. *Angiología*. 2004;56(Supl 1):97-108.
 86. Mundkur L, Mukhopadhyay R, Samson S, Varma M, Kale D, Chen D, et al. Mucosal tolerance to a combination of ApoB and HSP60 peptides controls plaque progression and stabilizes vulnerable plaque in Apob(tm2Sgy)Ldlr(tm1Her)/J mice. *PLoS One*. 2013;8(3):e58364.
 87. Li Z-Y, Howarth SPS, Tang T, Gillard JH. How critical is fibrous cap thickness to carotid plaque stability? A flow-plaque interaction model. *Stroke J Cereb Circ*. 2006;37(5):1195-9.
 88. Cicha I, Wörner A, Urschel K, Beronov K, Goppelt-Struebe M, Verhoeven E, et al. Carotid plaque vulnerability: a positive feedback between hemodynamic and biochemical mechanisms. *Stroke J Cereb Circ*. 2011;42(12):3502-10.
 89. Hermus L, Lefrandt JD, Tio RA, Breek J-C, Zeebregts CJ. Carotid plaque formation and serum biomarkers. *Atherosclerosis*. 2010;213(1):21-9.
 90. Thrysøe SA, Oikawa M, Yuan C, Eldrup N, Klaerke A, Paaske WP, et al. Longitudinal distribution of mechanical stresses in carotid plaques of symptomatic patients. *Stroke J Cereb Circ*. 2010;41(5):1041-3.
 91. Lovett JK, Rothwell PM. Site of carotid plaque ulceration in relation to direction of blood flow: an angiographic and pathological study. *Cerebrovasc Dis Basel Switz*. 2003;16(4):369-75.
 92. Mallat Z, Nakamura T, Ohan J, Lesèche G, Tedgui A, Maclouf J, et al. The relationship of hydroxyeicosatetraenoic acids and F2-isoprostanes to plaque instability in human carotid atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1999;103(3):421-7.

93. Carr S, Farb A, Pearce WH, Virmani R, Yao JS. Atherosclerotic plaque rupture in symptomatic carotid artery stenosis. *J Vasc Surg.* 1996;23(5):755-65; discussion 765-6.
94. Saam T, Hetterich H, Hoffmann V, Yuan C, Dichgans M, Poppert H, et al. Meta-analysis and systematic review of the predictive value of carotid plaque hemorrhage on cerebrovascular events by magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(12):1081-91.
95. Gupta A, Baradaran H, Schweitzer AD, Kamel H, Pandya A, Delgado D, et al. Carotid plaque MRI and stroke risk: a systematic review and meta-analysis. *Stroke J Cereb Circ.* 2013;44(11):3071-7.
96. Hosseini AA, Kandiyil N, Macsweeney STS, Altaf N, Auer DP. Carotid plaque hemorrhage on magnetic resonance imaging strongly predicts recurrent ischemia and stroke. *Ann Neurol.* 2013;73(6):774-84.
97. Hatsukami TS, Ferguson MS, Beach KW, Gordon D, Detmer P, Burns D, et al. Carotid plaque morphology and clinical events. *Stroke J Cereb Circ.* 1997;28(1):95-100.
98. Pickett CA, Jackson JL, Hemann BA, Atwood JE. Carotid bruits and cerebrovascular disease risk: a meta-analysis. *Stroke J Cereb Circ.* 2010;41(10):2295-302.
99. Sauv e JS, Thorpe KE, Sackett DL, Taylor W, Barnett HJ, Haynes RB, et al. Can bruits distinguish high-grade from moderate symptomatic carotid stenosis? The North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial. *Ann Intern Med.* 1994;120(8):633-7.
100. Lanari A, Silvestrelli G. Acute and chronic carotid occlusion syndromes. *Front Neurol Neurosci.* 2012;30:185-90.
101. Mohr JP. Transient ischemic attacks and the prevention of strokes. *N Engl J Med.* 1978;299(2):93-5.
102. Duncan GW, Pessin MS, Mohr JP, Adams RD. Transient cerebral ischemic attacks. *Adv Intern Med.* 1976;21:1-20.
103. Fields WS, Lemak NA. Joint study of extracranial arterial occlusion. X. Internal carotid artery occlusion. *JAMA J Am Med Assoc.* 1976;235(25):2734-8.
104. Furlan AJ, Whisnant JP, Baker HL Jr. Long-term prognosis after carotid artery occlusion. *Neurology.* 1980;30(9):986-8.
105. Dyken ML, Klatte E, Kolar OJ, Surgeon C. Complete occlusion of common or internal carotid arteries. Clinical significance. *Arch Neurol.* 1974;30(5):343-6.
106. Hedera P, Bujd akova J, Traubner P. Effect of collateral flow patterns on outcome of carotid occlusion. *Eur Neurol.* 1995;35(4):212-6.

107. Kleiser B, Widder B. Course of carotid artery occlusions with impaired cerebrovascular reactivity. *Stroke J Cereb Circ.* 1992;23(2):171-4.
108. Silvestrini M, Vernieri F, Pasqualetti P, Matteis M, Passarelli F, Troisi E, et al. Impaired cerebral vasoreactivity and risk of stroke in patients with asymptomatic carotid artery stenosis. *JAMA J Am Med Assoc.* 2000;283(16):2122-7.
109. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial. Methods, patient characteristics, and progress. *Stroke J Cereb Circ.* 1991;22(6):711-20.
110. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). *Lancet.* 1998;351(9113):1379-87.
111. MRC European Carotid Surgery Trial: interim results for symptomatic patients with severe (70-99%) or with mild (0-29%) carotid stenosis. European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. *Lancet.* 1991;337(8752):1235-43.
112. Wardlaw JM, Lewis SC, Humphrey P, Young G, Collie D, Warlow CP. How does the degree of carotid stenosis affect the accuracy and interobserver variability of magnetic resonance angiography? *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2001;71(2):155-60.
113. Rothwell PM, Eliasziw M, Gutnikov SA, Fox AJ, Taylor DW, Mayberg MR, et al., Carotid Endarterectomy Trialists' Collaboration. Analysis of pooled data from the randomised controlled trials of endarterectomy for symptomatic carotid stenosis. *Lancet.* 2003;361(9352):107-16.
114. Rothwell PM, Gibson RJ, Slattery J, Sellar RJ, Warlow CP. Equivalence of measurements of carotid stenosis. A comparison of three methods on 1001 angiograms. European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. *Stroke J Cereb Circ.* 1994;25(12):2435-9.
115. Zwiebel WJ. Duplex sonography of the cerebral arteries: efficacy, limitations, and indications. *AJR Am J Roentgenol.* 1992;158(1):29-36.
116. Huston J 3rd, James EM, Brown RD Jr, Lefsrud RD, Ilstrup DM, Robertson EF, et al. Redefined duplex ultrasonographic criteria for diagnosis of carotid artery stenosis. *Mayo Clin Proc.* 2000;75(11):1133-40.
117. Sabeti S, Schillinger M, Mlekusch W, Willfort A, Haumer M, Nachtmann T, et al. Quantification of internal carotid artery stenosis with duplex US: comparative analysis of different flow velocity criteria. *Radiology.* 2004;232(2):431-9.
118. Gray-Weale AC, Graham JC, Burnett JR, Byrne K, Lusby RJ. Carotid artery atheroma: comparison of preoperative B-mode ultrasound appearance with carotid endarterectomy specimen pathology. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 1988;29(6):676-81.
119. Martorell Lossius, MP, Escribano Ferrer, JM, Vila Coll, R, Puras Mallagray, E. Guía básica para el estudio no invasivo de los troncos supraorticicos en el

laboratorio vascular. Documento de consenso del capítulo de diagnóstico vascular no invasivo de la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular.

120. Kessler C, von Maravic M, Brückmann H, Kömpf D. Ultrasound for the assessment of the embolic risk of carotid plaques. *Acta Neurol Scand.* 1995;92(3):231-4.
121. AbuRahma AF, Wulu JT, Crotty B. Carotid Plaque Ultrasonic Heterogeneity and Severity of Stenosis. *Stroke.* 2002;33(7):1772-5.
122. Wilterdink JL, Feldmann E, Furie KL, Bragoni M, Benavides JG. Transcranial Doppler ultrasound battery reliably identifies severe internal carotid artery stenosis. *Stroke J Cereb Circ.* 1997;28(1):133-6.
123. Sloan MA, Alexandrov AV, Tegeler CH, Spencer MP, Caplan LR, Feldmann E, et al., Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. Assessment: transcranial Doppler ultrasonography: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology.* 2004;62(9):1468-81.
124. Partovi S, Loebe M, Aschwanden M, Baldi T, Jäger KA, Feinstein SB, et al. Contrast-enhanced ultrasound for assessing carotid atherosclerotic plaque lesions. *AJR Am J Roentgenol.* 2012;198(1):W13-9.
125. Staub D, Schinkel AFL, Coll B, Coli S, van der Steen AFW, Reed JD, et al. Contrast-enhanced ultrasound imaging of the vasa vasorum: from early atherosclerosis to the identification of unstable plaques. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2010;3(7):761-71.
126. Ten Kate GL, van den Oord SCH, Sijbrands EJG, van der Lugt A, de Jong N, Bosch JG, et al. Current status and future developments of contrast-enhanced ultrasound of carotid atherosclerosis. *J Vasc Surg.* 2013;57(2):539-46.
127. Landry A, Spence JD, Fenster A. Measurement of carotid plaque volume by 3-dimensional ultrasound. *Stroke J Cereb Circ.* 2004;35(4):864-9.
128. Hankey GJ, Warlow CP, Sellar RJ. Cerebral angiographic risk in mild cerebrovascular disease. *Stroke J Cereb Circ.* 1990;21(2):209-22.
129. Kappelle LJ, Eliasziw M, Fox AJ, Sharpe BL, Barnett HJ. Importance of intracranial atherosclerotic disease in patients with symptomatic stenosis of the internal carotid artery. The North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial. *Stroke J Cereb Circ.* 1999;30(2):282-6.
130. Debrey SM, Yu H, Lynch JK, Lövblad K-O, Wright VL, Janket S-JD, et al. Diagnostic accuracy of magnetic resonance angiography for internal carotid artery disease: a systematic review and meta-analysis. *Stroke J Cereb Circ.* 2008;39(8):2237-48.
131. Corti R, Ferrari C, Roberti M, Alerci M, Pedrazzi PL, Gallino A. Spiral computed tomography: a novel diagnostic approach for investigation of the extracranial

- cerebral arteries and its complementary role in duplex ultrasonography. *Circulation*. 1998;98(10):984-9.
132. Koelemay MJW, Nederkoorn PJ, Reitsma JB, Majoie CB. Systematic review of computed tomographic angiography for assessment of carotid artery disease. *Stroke J Cereb Circ*. 2004;35(10):2306-12.
 133. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *N Engl J Med*. 1991;325(7):445-53.
 134. Rerkasem K, Rothwell PM. Carotid endarterectomy for symptomatic carotid stenosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011;(4):CD001081.
 135. Brott TG, Brown RD Jr, Meyer FB, Miller DA, Cloft HJ, Sullivan TM. Carotid revascularization for prevention of stroke: carotid endarterectomy and carotid artery stenting. *Mayo Clin Proc*. 2004;79(9):1197-208.
 136. Bonati LH, Lyrer P, Ederle J, Featherstone R, Brown MM. Percutaneous transluminal balloon angioplasty and stenting for carotid artery stenosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;9:CD000515.
 137. Gensicke H, Engelter S, Bonati L. [Endovascular treatment for carotid artery stenosis]. *Ther Umsch Rev Thérapeutique*. 2012;69(9):523-35.
 138. Furie KL, Kasner SE, Adams RJ, Albers GW, Bush RL, Fagan SC, et al., American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular Nursing, Council on Clinical Cardiology, and Interdisciplinary Council on Quality of Care and Outcomes Research. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke or transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke J Cereb Circ*. 2011;42(1):227-76.
 139. Grant EG, Benson CB, Moneta GL, Alexandrov AV, Baker JD, Bluth EI, et al. Carotid artery stenosis: gray-scale and Doppler US diagnosis--Society of Radiologists in Ultrasound Consensus Conference. *Radiology*. 2003;229(2):340-6.
 140. Ricotta JJ, AbuRahma A, Ascher E, Eskandari M, Faries P, Lal BK. Updated Society for Vascular Surgery guidelines for management of extracranial carotid disease. *J Vasc Surg*. 2011;54(3):e1-31.
 141. Batagini NC, da Silva ES, Pinto CA, Puech-Leão P, de Luccia N. Analysis of risk factors and diseases associated with atherosclerosis in the progression of carotid artery stenosis. *Vascular*. 2015. Feb 16. pii: 1708538115571404. [Epub ahead of print]
 142. Hobson RW 2nd, Weiss DG, Fields WS, Goldstone J, Moore WS, Towne JB, et al. Efficacy of carotid endarterectomy for asymptomatic carotid stenosis. The Veterans Affairs Cooperative Study Group. *N Engl J Med*. 1993;328(4):221-7.

143. Halliday A, Mansfield A, Marro J, Peto C, Peto R, Potter J, et al., MRC Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST) Collaborative Group. Prevention of disabling and fatal strokes by successful carotid endarterectomy in patients without recent neurological symptoms: randomised controlled trial. *Lancet*. 2004;363(9420):1491-502.
144. Wolff T, Guirguis-Blake J, Miller T, Gillespie M, Harris R. Screening For Asymptomatic Carotid Artery Stenosis [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2007 [citado 2 de marzo de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK33504/>
145. Chambers BR, Donnan GA. Carotid endarterectomy for asymptomatic carotid stenosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005;(4):CD001923.
146. Raman G, Moorthy D, Hadar N, Dahabreh IJ, O'Donnell TF, Thaler DE, et al. Management strategies for asymptomatic carotid stenosis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2013;158(9):676-85.
147. Abbott AL. Medical (nonsurgical) intervention alone is now best for prevention of stroke associated with asymptomatic severe carotid stenosis: results of a systematic review and analysis. *Stroke J Cereb Circ*. 2009;40(10):e573-83.
148. Constantinou J, Jayia P, Hamilton G. Best evidence for medical therapy for carotid artery stenosis. *J Vasc Surg*. 2013;58(4):1129-39.
149. Spence JD. Asymptomatic Carotid Stenosis. *Circulation*. 2013;127(6):739-42.
150. Goldstein LB, Bushnell CD, Adams RJ, Appel LJ, Braun LT, Chaturvedi S, et al., American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular Nursing, Council on Epidemiology and Prevention, Council for High Blood Pressure Research,, Council on Peripheral Vascular Disease, and Interdisciplinary Council on Quality of Care and Outcomes Research. Guidelines for the primary prevention of stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke J Cereb Circ*. 2011;42(2):517-84.
151. Pryor WA. Bio-assays for Oxidative Stress Status (BOSS). Gulf Professional Publishing; 2001. 306 p.
152. Percival, Mark. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*. Advanced Nutrition Publications, Inc.; 1996.
153. Terman A, Brunk UT. Oxidative stress, accumulation of biological «garbage», and aging. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(1-2):197-204.
154. Salonen JT, Nyssönen K, Salonen R, Porkkala-Sarataho E, Tuomainen TP, Diczfalusy U, et al. Lipoprotein oxidation and progression of carotid atherosclerosis. *Circulation*. 1997;95(4):840-5.
155. Sigala F, Kotsinas A, Savari P, Filis K, Markantonis S, Iliodromitis EK, et al. Oxidized LDL in human carotid plaques is related to symptomatic carotid disease and lesion instability. *J Vasc Surg*. 2010;52(3):704-13.

156. Julius U, Drel VR, Grässler J, Obrosova IG. Nitrosylated proteins in monocytes as a new marker of oxidative-nitrosative stress in diabetic subjects with macroangiopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes Off J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc.* 2009;117(2):72-7.
157. Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(7):1716-23.
158. Hazen SL, Zhang R, Shen Z, Wu W, Podrez EA, MacPherson JC, et al. Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes: pathways for monocyte-mediated protein nitration and lipid peroxidation *In vivo*. *Circ Res.* 1999;85(10):950-8.
159. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol.* 2005;77(5):598-625.
160. Hansson M, Olsson I, Nauseef WM. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys.* 2006;445(2):214-24.
161. Loria V, Dato I, Graziani F, Biasucci LM. Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. *Mediators Inflamm.* 2008:135625.
162. Scheffer PG, van der Zwan LP, Schindhelm RK, Vermue HPA, Teerlink T. Myeloperoxidase concentrations in EDTA-plasma of healthy subjects are discordant with concentrations in heparin-plasma and serum. *Clin Biochem.* 2009;42(13-14):1490-2.
163. Brennan M-L, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, et al. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med.* 2003;349(17):1595-604.
164. Roman RM, Wendland AE, Polanczyk CA. Myeloperoxidase and coronary arterial disease: from research to clinical practice. *Arq Bras Cardiol.* 2008;91(1):e11-9.
165. Liu C, Desikan R, Ying Z, Gushchina L, Kampfrath T, DeJulius J, et al. Effects of a novel pharmacologic inhibitor of myeloperoxidase in a mouse atherosclerosis model. *PLoS One.* 2012;7(12):e50767.
166. Esporcatte R, Rey HCV, Rangel FOD, Rocha RM, Mendonça Filho HTF de, Dohmann HFR, et al. Predictive value of myeloperoxidase to identify high risk patients admitted to the hospital with acute chest pain. *Arq Bras Cardiol.* 2007;89(6):377-84.
167. Dominguez-Rodriguez A, Samimi-Fard S, Abreu-Gonzalez P, Garcia-Gonzalez MJ, Kaski JC. Prognostic value of admission myeloperoxidase levels in patients with ST-segment elevation myocardial infarction and cardiogenic shock. *Am J Cardiol.* 2008;101(11):1537-40.

168. Henry JB. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 20th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2001.
169. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med*. 1994;97(3A):5S - 13S; discussion 22S - 28S.
170. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest*. 2000;105(11):1631-9.
171. Leopold JA, Zhang Y-Y, Scribner AW, Stanton RC, Loscalzo J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase overexpression decreases endothelial cell oxidant stress and increases bioavailable nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(3):411-7.
172. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med*. 2014;66:75-87.
173. Weids AJ, Grant CM. The yeast Tsa1 peroxiredoxin protects against protein aggregate-induced oxidative stress. *J Cell Sci*. 2014;127(6):1327-35
174. Ani M, Moshtaghi AA, Ahmadvand H. Comparative effects of copper, iron, vanadium and titanium on low density lipoprotein oxidation in vitro. *Iran Biomed J*. 2007;11(2):113-8.
175. Chauhan A, Chauhan V, Brown WT, Cohen I. Oxidative stress in autism: increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin--the antioxidant proteins. *Life Sci*. 2004;75(21):2539-49.
176. Stocker R. Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. *Free Radic Res Commun*. 1990;9(2):101-12.
177. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*. 1993;300(2):535-43.
178. Erbs S, Gielen S, Linke A, Möbius-Winkler S, Adams V, Baither Y, et al. Improvement of peripheral endothelial dysfunction by acute vitamin C application: different effects in patients with coronary artery disease, ischemic, and dilated cardiomyopathy. *Am Heart J*. 2003;146(2):280-5.
179. Ellis GR, Anderson RA, Lang D, Blackman DJ, Morris RH, Morris-Thurgood J, et al. Neutrophil superoxide anion--generating capacity, endothelial function and oxidative stress in chronic heart failure: effects of short- and long-term vitamin C therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36(5):1474-82.
180. Prashberger M, Hermann M, Wanner J, Jirovetz L, Exner M, Kapiotis S, et al. The uremic toxin indoxyl sulfate acts as a pro- or antioxidant on LDL oxidation. *Free Radic Res*. 2014;48(6): 641-648.

181. Neuzil J, Stocker R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem*. 1994;269(24):16712-9.
182. Rifici VA, Khachadurian AK. Dietary supplementation with vitamins C and E inhibits in vitro oxidation of lipoproteins. *J Am Coll Nutr*. 1993;12(6):631-7.
183. Shi J, Le Maguer M. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Crit Rev Biotechnol*. 2000;20(4):293-334.
184. Zou Z-Y, Xu X-R, Lin X-M, Zhang H-B, Xiao X, Ouyang L, et al. Effects of lutein and lycopene on carotid intima-media thickness in Chinese subjects with subclinical atherosclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Br J Nutr*. 2014;111(3):474-80.
185. Madmani ME, Solaiman AY, Tamr Agha K, Madmani Y, Shahrour Y, Essali A, et al. Coenzyme Q10 for heart failure. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;9:CD008684.
186. Liu C, Cao F, Tang Q-Z, Yan L, Dong Y-G, Zhu L-H, et al. Allicin protects against cardiac hypertrophy and fibrosis via attenuating reactive oxygen species-dependent signaling pathways. *J Nutr Biochem*. 2010;21(12):1238-50.
187. Flower DR, North AC, Sansom CE. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1482(1-2):9-24.
188. Navarro-Incio AM, Tolivia-Fernández J. [The involvement of apolipoprotein D in pathologies affecting the nervous system]. *Rev Neurol*. 2004;38(12):1166-75.
189. Ganfornina MD, Gutiérrez G, Bastiani M, Sánchez D. A phylogenetic analysis of the lipocalin protein family. *Mol Biol Evol*. 2000;17(1):114-26.
190. Helisalmi S, Hiltunen M, Vepsäläinen S, Iivonen S, Corder EH, Lehtovirta M, et al. Genetic variation in apolipoprotein D and Alzheimer's disease. *J Neurol*. 2004;251(8):951-7.
191. Ganfornina MD, Sánchez D, Pagano A, Tonachini L, Descalzi-Cancedda F, Martínez S. Molecular characterization and developmental expression pattern of the chicken apolipoprotein D gene: implications for the evolution of vertebrate lipocalins. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat*. 2005;232(1):191-9.
192. Sánchez D, Ganfornina MD, Martínez S. Expression pattern of the lipocalin apolipoprotein D during mouse embryogenesis. *Mech Dev*. 2002;110(1-2):225-9.
193. Rassart E, Bedirian A, Do Carmo S, Guinard O, Sirois J, Terrisse L, et al. Apolipoprotein D. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1482(1-2):185-98.
194. Perdomo G, Henry Dong H. Apolipoprotein D in lipid metabolism and its functional implication in atherosclerosis and aging. *Aging*. 2009;1(1):17-27.

195. Leung WCY, Lawrie A, Demaries S, Massaeli H, Burry A, Yablonsky S, et al. Apolipoprotein D and platelet-derived growth factor-BB synergism mediates vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res*. 2004;95(2):179-86.
196. Thomas EA, George RC, Sutcliffe JG. Apolipoprotein D modulates arachidonic acid signaling in cultured cells: implications for psychiatric disorders. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003;69(6):421-7.
197. Breustedt DA, Schönfeld DL, Skerra A. Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1764(2):161-73.
198. Sarjeant JM, Lawrie A, Kinnear C, Yablonsky S, Leung W, Massaeli H, et al. Apolipoprotein D inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation by preventing translocation of phosphorylated extracellular signal regulated kinase 1/2 to the nucleus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(12):2172-7.
199. Do Carmo S, Séguin D, Milne R, Rassart E. Modulation of apolipoprotein D and apolipoprotein E mRNA expression by growth arrest and identification of key elements in the promoter. *J Biol Chem*. 2002;277(7):5514-23.
200. Do Carmo S, Levros L-C Jr, Rassart E. Modulation of apolipoprotein D expression and translocation under specific stress conditions. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(6):954-69.
201. Do Carmo S, Jacomy H, Talbot PJ, Rassart E. Neuroprotective effect of apolipoprotein D against human coronavirus OC43-induced encephalitis in mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2008;28(41):10330-8.
202. Ganfornina MD, Do Carmo S, Lora JM, Torres-Schumann S, Vogel M, Allhorn M, et al. Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell*. 2008;7(4):506-15.
203. Sanchez D, López-Arias B, Torroja L, Canal I, Wang X, Bastiani MJ, et al. Loss of glial lazarus, a homolog of apolipoprotein D, reduces lifespan and stress resistance in *Drosophila*. *Curr Biol CB*. 2006;16(7):680-6.
204. Walker DW, Muffat J, Rundel C, Benzer S. Overexpression of a *Drosophila* homolog of apolipoprotein D leads to increased stress resistance and extended lifespan. *Curr Biol CB*. 2006;16(7):674-9.
205. Tavori H, Aviram M, Khatib S, Musa R, Nitecki S, Hoffman A, et al. Human carotid atherosclerotic plaque increases oxidative state of macrophages and low-density lipoproteins, whereas paraoxonase 1 (PON1) decreases such atherogenic effects. *Free Radic Biol Med*. 2009;46(5):607-15.
206. Fortunato G, Di Taranto MD, Bracale UM, Del Guercio L, Carbone F, Mazzaccara C, et al. Decreased paraoxonase-2 expression in human carotids during the progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(3):594-600.

207. Proudfoot JM, Barden AE, Loke WM, Croft KD, Puddey IB, Mori TA. HDL is the major lipoprotein carrier of plasma F2-isoprostanes. *J Lipid Res.* 2009;50(4):716-22.
208. Nguyen SD, Sok D-E. Oxidative inactivation of paraoxonase1, an antioxidant protein and its effect on antioxidant action. *Free Radic Res.* 2003;37(12):1319-30.
209. Coloma JL, Ros C, Castelo-Blanco C. Osteoporosis. *Fisiología y Patología-1. REVCOG.* 2009;14(3):178-87.
210. Lamour V, Nokin M-J, Henry A, Castronovo V, Bellahcène A. [SIBLING proteins: molecular tools for tumor progression and angiogenesis]. *Médecine Sci MS.* 2013;29(11):1018-25.
211. Cho H-J, Cho H-J, Kim H-S. Osteopontin: a multifunctional protein at the crossroads of inflammation, atherosclerosis, and vascular calcification. *Curr Atheroscler Rep.* 2009;11(3):206-13.
212. Pagel CN, Wasgewater Wijesinghe DK, Taghavi Esfandouni N, Mackie EJ. Osteopontin, inflammation and myogenesis: influencing regeneration, fibrosis and size of skeletal muscle. *J Cell Commun Signal.* 2013;8(2):95-103.
213. Ikeda H, Tsuruya K, Toyonaga J, Masutani K, Hayashida H, Hirakata H, et al. Spironolactone suppresses inflammation and prevents L-NAME-induced renal injury in rats. *Kidney Int.* 2009;75(2):147-55.
214. Zhang X, Eirin A, Lerman A, Lerman LO. Osteopontin: an emerging therapeutic target in uraemic vascular disease. *Cardiovasc Res.* 2013;98(3):332-3.
215. Isoda K, Nishikawa K, Kamezawa Y, Yoshida M, Kusuhara M, Moroi M, et al. Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation. *Circ Res.* 2002;91(1):77-82.
216. Ohmori R, Momiyama Y, Taniguchi H, Takahashi R, Kusuhara M, Nakamura H, et al. Plasma osteopontin levels are associated with the presence and extent of coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2003;170(2):333-7.
217. O'Brien ER, Garvin MR, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM, et al. Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb J Vasc Biol Am Heart Assoc.* 1994;14(10):1648-56.
218. Mazière C, Gomila C, Mazière J-C. Oxidized low-density lipoprotein increases osteopontin expression by generation of oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(10):1382-7.
219. Pedersen TX, Madsen M, Junker N, Christoffersen C, Vikeså J, Bro S, et al. Osteopontin deficiency dampens the pro-atherogenic effect of uraemia. *Cardiovasc Res.* 2013;98(3):352-9.

220. Jiménez-Corona AE, Damián-Zamacona S, Pérez-Torres A, Moreno A, Mas-Oliva J. Osteopontin upregulation in atherogenesis is associated with cellular oxidative stress triggered by the activation of scavenger receptors. *Arch Med Res.* 2012;43(2):102-11.
221. Wolak T, Sion-Vardi N, Novack V, Greenberg G, Szendro G, Tarnowski T, et al. N-terminal rather than full-length osteopontin or its C-terminal fragment is associated with carotid-plaque inflammation in hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 2013;26(3):326-33.
222. Chen NX, O'Neill KD, Duan D, Moe SM. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* 2002;62(5):1724-31.
223. Liaw L, Lombardi DM, Almeida MM, Schwartz SM, deBlois D, Giachelli CM. Neutralizing antibodies directed against osteopontin inhibit rat carotid neointimal thickening after endothelial denudation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(1):188-93.
224. Matsui Y, Rittling SR, Okamoto H, Inobe M, Jia N, Shimizu T, et al. Osteopontin deficiency attenuates atherosclerosis in female apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(6):1029-34.
225. Isoda K, Kamezawa Y, Ayaori M, Kusuhara M, Tada N, Ohsuzu F. Osteopontin transgenic mice fed a high-cholesterol diet develop early fatty-streak lesions. *Circulation.* 2003;107(5):679-81.
226. Georgiadou P, Iliodromitis EK, Varounis C, Mavroidis M, Kolokathis F, Andreadou I, et al. Relationship between plasma osteopontin and oxidative stress in patients with coronary artery disease. *Expert Opin Ther Targets.* agosto de 2008;12(8):917-20.
227. Rosenberg M, Zugck C, Nelles M, Juenger C, Frank D, Remppis A, et al. Osteopontin, a new prognostic biomarker in patients with chronic heart failure. *Circ Heart Fail.* 2008;1(1):43-9.
228. Abdel-Azeez HA-H, Al-Zaky M. Plasma osteopontin as a predictor of coronary artery disease: association with echocardiographic characteristics of atherosclerosis. *J Clin Lab Anal.* 2010;24(3):201-6.
229. As S, Sahukar S, Murthy J, Kumar K. A study of serum apolipoprotein A1, apolipoprotein B and lipid profile in stroke. *J Clin Diagn Res JCDR.* 2013;7(7):1303-6.
230. Hwang Y-C, Ahn H-Y, Lee WJ, Park C-Y, Park S-W. An equation to estimate the concentration of serum apolipoprotein B. *PloS One.* 2012;7(12):e51607.
231. Haas ME, Attie AD, Biddinger SB. The regulation of ApoB metabolism by insulin. *Trends Endocrinol Metab TEM.* 2013;24(8):391-7.
232. Jung CH, Hwang JY, Shin MS, Yu JH, Kim EH, Bae SJ, et al. Association of apolipoprotein b/apolipoprotein A1 ratio and coronary artery stenosis and plaques

- detected by multi-detector computed tomography in healthy population. *J Korean Med Sci.* 2013;28(5):709-16.
233. Huang F, Yang Z, Xu B, Bi Y, Xu M, Xu Y, et al. Both serum apolipoprotein B and the apolipoprotein B/apolipoprotein A-I ratio are associated with carotid intima-media thickness. *PloS One.* 2013;8(1):e54628.
 234. Hewing B, Parathath S, Barrett T, Kellie Chung WK, Astudillo YM, Hamada T, et al. Effects of Native and Myeloperoxidase-Modified Apolipoprotein A-I on Reverse Cholesterol Transport and Atherosclerosis in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014. DOI 10.1161/ATVBAHA.113.303044.
 235. Ditiatkovski M, D'Souza W, Kesani R, Chin-Dusting J, de Haan JB, Remaley A, et al. An apolipoprotein A-I mimetic peptide designed with a reductionist approach stimulates reverse cholesterol transport and reduces atherosclerosis in mice. *PloS One.* 2013;8(7):e68802.
 236. DiDonato JA, Huang Y, Aulak KS, Even-Or O, Gerstenecker G, Gogonea V, et al. Function and distribution of apolipoprotein A1 in the artery wall are markedly distinct from those in plasma. *Circulation.* 2013;128(15):1644-55.
 237. Vuilleumier N, Dayer J-M, von Eckardstein A, Roux-Lombard P. Pro- or anti-inflammatory role of apolipoprotein A-1 in high-density lipoproteins? *Swiss Med Wkly.* 2013;143:w13781.
 238. Didonato JA, Aulak K, Huang Y, Wagner M, Gerstenecker G, Topbas C, et al. Site-specific nitration of apolipoprotein A-I at tyrosine 166 is both abundant within human atherosclerotic plaque and dysfunctional. *J Biol Chem.* 2014; DOI 10.1074/jbc.M114.556506
 239. Silva IT, Mello APQ, Damasceno NRT. Antioxidant and inflammatory aspects of lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂): a review. *Lipids Health Dis.* 2011;10:170.
 240. Cai A, Zheng D, Qiu R, Mai W, Zhou Y. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA(2)): a novel and promising biomarker for cardiovascular risks assessment. *Dis Markers.* 2013;34(5):323-31.
 241. Lind L, Simon T, Johansson L, Kotti S, Hansen T, Machecourt J, et al. Circulating levels of secretory- and lipoprotein-associated phospholipase A₂ activities: relation to atherosclerotic plaques and future all-cause mortality. *Eur Heart J.* 2012;33(23):2946-54.
 242. Matsuzawa A, Hattori K, Aoki J, Arai H, Inoue K. Protection against oxidative stress-induced cell death by intracellular platelet-activating factor-acetylhydrolase II. *J Biol Chem.* 1997;272(51):32315-20.
 243. Lourida ES, Papathanasiou AI, Goudevenos JA, Tselepis AD. The low-density lipoprotein (LDL)-associated PAF-acetylhydrolase activity and the extent of LDL oxidation are important determinants of the autoantibody titers against oxidized LDL in patients with coronary artery disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2006;75(2):117-26.

244. Rosenson RS, Stafforini DM. Modulation of oxidative stress, inflammation, and atherosclerosis by lipoprotein-associated phospholipase A2. *J Lipid Res.* 2012;53(9):1767-82.
245. Burchardt P, Zurawski J, Zuchowski B, Kubacki T, Murawa D, Wiktorowicz K, et al. Low-density lipoprotein, its susceptibility to oxidation and the role of lipoprotein-associated phospholipase A2 and carboxyl ester lipase lipases in atherosclerotic plaque formation. *Arch Med Sci AMS.* 2013;9(1):151-8.
246. Herrmann J, Mannheim D, Wohler C, Versari D, Meyer FB, McConnell JP, et al. Expression of lipoprotein-associated phospholipase A(2) in carotid artery plaques predicts long-term cardiac outcome. *Eur Heart J.* 2009;30(23):2930-8.
247. Cavigiolio G, Jayaraman S. Proteolysis of Apolipoprotein A-I by Secretory Phospholipase A2. A new Link between Inflammation and Atherosclerosis. *J Biol Chem.* 2014; DOI 10.1074/jbc.M113.525717.
248. Nambi V, Hoogeveen RC, Chambless L, Hu Y, Bang H, Coresh J, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and high-sensitivity C-reactive protein improve the stratification of ischemic stroke risk in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Stroke J Cereb Circ.* 2009;40(2):376-81.
249. Mohler ER 3rd, Ballantyne CM, Davidson MH, Hanefeld M, Ruilope LM, Johnson JL, et al., Darapladib Investigators. The effect of darapladib on plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and cardiovascular biomarkers in patients with stable coronary heart disease or coronary heart disease risk equivalent: the results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51(17):1632-41.
250. Thompson A, Gao P, Orfei L, Watson S, Di Angelantonio E, Kaptoge S, et al. with Lp-PLA(2) Studies Collaboration. Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet.* 2010;375(9725):1536-44.
251. Bazan HA, Smith TA, Donovan MJ, Sternbergh WC. Future management of carotid stenosis: role of urgent carotid interventions in the acutely symptomatic carotid patient and best medical therapy for asymptomatic carotid disease. *Ochsner J.* 2014;14(4):608-15.
252. Tsialtas D, Bolognesi MG, Tecchio T, Azzarone M, Quaini F, Bolognesi R. Clinical, electrocardiographic and echocardiographic features in patients with major arterial vascular disease assigned to surgical revascularization. *Vasa.* 2014;43(6):443-9.
253. Yahagi K, Davis HR, Arbustini E, Virmani R. Sex differences in coronary artery disease: Pathological observations. *Atherosclerosis.* 2015;239(1):260-7.
254. Brown MM, Czuriga-Kovács KR. Carotid artery: overview on current trials - selecting the low-risk patient. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 2015;56(2):177-88.
255. Sun Q-A, Runge MS, Madamanchi NR. Oxidative stress, NADPH oxidases, and arteries. *Hamostaseologie.* 2015;35(2).

256. Paciaroni M, Bogousslavsky J. Antithrombotic therapy in carotid artery stenosis: an update. *Eur Neurol.* 2015;73(1-2):51-6.
257. Wei Y, Guo H, The E, Che W, Shen J, Hou L, et al. Persistent lipid abnormalities in statin-treated coronary artery disease patients with and without diabetes in China. *Int J Cardiol.* 2015;182C:469-75.
258. Romme EAPM, McAllister DA, Murchison JT, Van Beek EJR, Petrides GS, Price COS, et al. Associations between COPD related manifestations: a cross-sectional study. *Respir Res.* 2013;14:129.
259. Musialek P, Tracz W, Tekieli L, Pieniazek P, Kablak-Ziembicka A, Przewlocki T, et al. Multimarker approach in discriminating patients with symptomatic and asymptomatic atherosclerotic carotid artery stenosis. *J Clin Neurol Seoul Korea.* 2013;9(3):165-75.
260. Chróinín DN, Marnane M, Akijian L, Merwick A, Fallon E, Horgan G, et al. Serum lipids associated with inflammation-related PET-FDG uptake in symptomatic carotid plaque. *Neurology.* 2014;82(19):1693-9.
261. Chan DC, Barrett PHR, Watts GF. The metabolic and pharmacologic bases for treating atherogenic dyslipidaemia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2014;28(3):369-85.
262. Osorio A, Ortega E, de Haro T, Torres JM, Sánchez P, Ruiz-Requena E. Lipid profiles and oxidative stress parameters in male and female hemodialysis patients. *Mol Cell Biochem.* 2011;353(1-2):59-63.
263. Moon GJ, Kim SJ, Cho YH, Ryoo S, Bang OY. Antioxidant effects of statins in patients with atherosclerotic cerebrovascular disease. *J Clin Neurol Seoul Korea.* 2014;10(2):140-7.
264. Tsai N-W, Lee L-H, Huang C-R, Chang W-N, Chang Y-T, Su Y-J, et al. Statin therapy reduces oxidized low density lipoprotein level, a risk factor for stroke outcome. *Crit Care Lond Engl.* 2014;18(1):R16.
265. Subedi BH, Joshi PH, Jones SR, Martin SS, Blaha MJ, Michos ED. Current guidelines for high-density lipoprotein cholesterol in therapy and future directions. *Vasc Health Risk Manag.* 2014;10:205-16.
266. Wang J, Wu J, Zhang S, Zhang L, Wang C, Gao X, et al. Elevated fasting glucose as a potential predictor for asymptomatic cerebral artery stenosis: a cross-sectional study in Chinese adults. *Atherosclerosis.* 2014;237(2):661-5.
267. Mullenix PS, Steele SR, Martin MJ, Starnes BW, Andersen CA. C-reactive protein level and traditional vascular risk factors in the prediction of carotid stenosis. *Arch Surg Chic Ill 1960.* 2007;142(11):1066-71.
268. Lombardo A, Biasucci LM, Lanza GA, Coli S, Silvestri P, Cianflone D, et al. Inflammation as a possible link between coronary and carotid plaque instability. *Circulation.* 2004;109(25):3158-63.

269. Hackam DG, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *JAMA*. 2003;290(7):932-40.
270. Kadoglou NPE, Gerasimidis T, Golemati S, Kapelouzou A, Karayannacos PE, Liapis CD. The relationship between serum levels of vascular calcification inhibitors and carotid plaque vulnerability. *J Vasc Surg*. 2008;47(1):55-62.
271. Berezin AE, Kremzer AA. Circulating osteopontin as a marker of early coronary vascular calcification in type two diabetes mellitus patients with known asymptomatic coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2013;229(2):475-81.
272. Wiseman SA, Powell JT, Barber N, Humphries SE, Greenhalgh RM. Influence of apolipoproteins on the anatomical distribution of arterial disease. *Atherosclerosis*. 1991;89(2-3):231-7.
273. Bays HE. Lowering low-density lipoprotein cholesterol levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Gen Med*. 2014;7:355-64.
274. Farnier M, Chen E, Johnson-Levonas AO, McCrary Sisk C, Mitchel YB. Effects of extended-release niacin/laropiprant, simvastatin, and the combination on correlations between apolipoprotein B, LDL cholesterol, and non-HDL cholesterol in patients with dyslipidemia. *Vasc Health Risk Manag*. 2014;10:279-90.
275. D'Odorico A, Martines D, Kiechl S, Egger G, Oberhollenzer F, Bonvicini P, et al. High plasma levels of alpha- and beta-carotene are associated with a lower risk of atherosclerosis: results from the Bruneck study. *Atherosclerosis*. 2000;153(1):231-9.
276. Gale CR, Ashurst HE, Powers HJ, Martyn CN. Antioxidant vitamin status and carotid atherosclerosis in the elderly. *Am J Clin Nutr*. 2001;74(3):402-8.
277. Giordano P, Scicchitano P, Locorotondo M, Mandurino C, Ricci G, Carbonara S, et al. Carotenoids and cardiovascular risk. *Curr Pharm Des*. 2012;18(34):5577-89.
278. Xu X-R, Zou Z-Y, Huang Y-M, Xiao X, Ma L, Lin X-M. Serum carotenoids in relation to risk factors for development of atherosclerosis. *Clin Biochem*. 2012;45(16-17):1357-61.
279. Riccioni G, Bucciarelli T, D'Orazio N, Palumbo N, di Ilio E, Corradi F, et al. Plasma antioxidants and asymptomatic carotid atherosclerotic disease. *Ann Nutr Metab*. 2008;53(2):86-90.
280. De Oliveira Otto MCC, Alonso A, Lee D-H, Delclos GL, Jenny NS, Jiang R, et al. Dietary micronutrient intakes are associated with markers of inflammation but not with markers of subclinical atherosclerosis. *J Nutr*. 2011;141(8):1508-15.
281. Riccioni G, D Orazio N, Scotti L, Petruzzelli R, Latino A, Bucciarelli V, et al. Circulating plasma antioxidants, inflammatory markers and asymptomatic carotid atherosclerosis in end-stage renal disease patients: a case control study. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2010;23(1):327-34.

282. Riccioni G, D’Orazio N, Speranza L, Di Ilio E, Glade M, Bucciarelli V, et al. Carotenoids and asymptomatic carotid atherosclerosis. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2010;24(4):447-52.
283. Karppi J, Kurl S, Ronkainen K, Kauhanen J, Laukkanen JA. Serum carotenoids reduce progression of early atherosclerosis in the carotid artery wall among Eastern Finnish men. *PloS One*. 2013;8(5):e64107.
284. Nishi K, Uno M, Fukuzawa K, Horiguchi H, Shinno K, Nagahiro S. Clinicopathological significance of lipid peroxidation in carotid plaques. *Atherosclerosis*. 2002;160(2):289-96.
285. Khan TA, Shah T, Prieto D, Zhang W, Price J, Fowkes GR, et al. Apolipoprotein E genotype, cardiovascular biomarkers and risk of stroke: systematic review and meta-analysis of 14,015 stroke cases and pooled analysis of primary biomarker data from up to 60,883 individuals. *Int J Epidemiol*. 2013;42(2):475-92.
286. Juo S-HH. Genetics of carotid atherosclerosis. *Front Biosci Landmark Ed*. 2009;14:4525-34.
287. Wyler von Ballmoos M, Dubler D, Mirlacher M, Cathomas G, Muser J, Biedermann BC. Increased apolipoprotein deposits in early atherosclerotic lesions distinguish symptomatic from asymptomatic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(2):359-64.
288. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(6):1583-606.
289. Kobayashi H, Kawauchi D, Hashimoto Y, Ogata T, Murakami F. The control of precerebellar neuron migration by RNA-binding protein Csde1. *Neuroscience*. 2013;253:292-303.
290. Lai K, Wang H, Lee WS, Jain MK, Lee ME, Haber E. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in rat arterial smooth muscle cell proliferation. *J Clin Invest*. 1996;98(7):1560-7.
291. Guo L, Ji C, Gu S, Ying K, Cheng H, Ni X, et al. Molecular cloning and characterization of a novel human kinase gene, PDIK1L. *J Genet*. 2003;82(1-2):27-32.
292. Vallenius T, Scharm B, Vesikansa A, Luukko K, Schäfer R, Mäkelä TP. The PDZ-LIM protein RIL modulates actin stress fiber turnover and enhances the association of alpha-actinin with F-actin. *Exp Cell Res*. 2004;293(1):117-28.
293. Liu Z, Zhan Y, Tu Y, Chen K, Liu Z, Wu C. PDZ and LIM domain protein 1(PDLIM1)/CLP36 promotes breast cancer cell migration, invasion and metastasis through interaction with α -actinin. *Oncogene*. 2015;34(10):1300-11.
294. Oguro A, Koyama C, Xu J, Imaoka S. A cellular stress response (CSR) that interacts with NADPH-P450 reductase (NPR) is a new regulator of hypoxic response. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;445(1):43-7.

295. Han HJ, Tokino T, Nakamura Y. CSR, a scavenger receptor-like protein with a protective role against cellular damage caused by UV irradiation and oxidative stress. *Hum Mol Genet.* 1998;7(6):1039-46.
296. Hossain GS, Lynn EG, Maclean KN, Zhou J, Dickhout JG, Lhoták S, et al. Deficiency of TDAG51 protects against atherosclerosis by modulating apoptosis, cholesterol efflux, and peroxiredoxin-1 expression. *J Am Heart Assoc.* 2013;2(3):e000134.
297. Kisucka J, Chauhan AK, Patten IS, Yesilaltay A, Neumann C, Van Etten RA, et al. Peroxiredoxin1 prevents excessive endothelial activation and early atherosclerosis. *Circ Res.* 2008;103(6):598-605.
298. Guo X, Yamada S, Tanimoto A, Ding Y, Wang K-Y, Shimajiri S, et al. Overexpression of peroxiredoxin 4 attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Antioxid Redox Signal.* 2012;17(10):1362-75.
299. Jiménez A, Johansson C, Ljung J, Sagemark J, Berndt KD, Ren B, et al. Human spermatid-specific thioredoxin-1 (Sptrx-1) is a two-domain protein with oxidizing activity. *FEBS Lett.* 2002;530(1-3):79-84.
300. Smith TB, Baker MA, Connaughton HS, Habenicht U, Aitken RJ. Functional deletion of Txndc2 and Txndc3 increases the susceptibility of spermatozoa to age-related oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:872-81.
301. Turoczi T, Chang VW-H, Engelman RM, Maulik N, Ho YS, Das DK. Thioredoxin redox signaling in the ischemic heart: an insight with transgenic mice overexpressing Trx1. *J Mol Cell Cardiol.* 2003;35(6):695-704.
302. Welsh SJ, Bellamy WT, Briehl MM, Powis G. The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 2002;62(17):5089-95.
303. Moravcová M, Libra A, Dvořáková J, Víšková A, Muthný T, Velebný V, et al. Modulation of keratin 1, 10 and involucrin expression as part of the complex response of the human keratinocyte cell line HaCaT to ultraviolet radiation. *Interdiscip Toxicol.* 2013;6(4):203-8.
304. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology.* 2002;40(5):403-39.
305. Johansson B, Eriksson A, Virtanen I, Thornell LE. Intermediate filament proteins in adult human arteries. *Anat Rec.* 1997;247(4):439-48.
306. Vendrov AE, Madamanchi NR, Niu X-L, Molnar KC, Runge M, Szyndralewicz C, et al. NADPH oxidases regulate CD44 and hyaluronic acid expression in thrombin-treated vascular smooth muscle cells and in atherosclerosis. *J Biol Chem.* 2010;285(34):26545-57.
307. Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, Guzik TJ. NADPH oxidases in vascular pathology. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(17):2794-814.

308. Guzik TJ, Chen W, Gongora MC, Guzik B, Lob HE, Mangalat D, et al. Calcium-dependent NOX5 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase contributes to vascular oxidative stress in human coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(22):1803-9.
309. Sorescu D, Weiss D, Lassègue B, Clempus RE, Szöcs K, Sorescu GP, et al. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(12):1429-35.
310. Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Bickel C, Schnabel R, Genth-Zotz S, Torzewski M, et al., AtheroGene Investigators. Glutathione peroxidase-1 activity, atherosclerotic burden, and cardiovascular prognosis. *Am J Cardiol*. 2007;99(6):808-12.
311. Sacks HS, Fain JN, Cheema P, Bahouth SW, Garrett E, Wolf RY, et al. Depot-specific overexpression of proinflammatory, redox, endothelial cell, and angiogenic genes in epicardial fat adjacent to severe stable coronary atherosclerosis. *Metab Syndr Relat Disord*. 2011;9(6):433-9.
312. Pao AC, Bhargava A, Di Sole F, Quigley R, Shao X, Wang J, et al. Expression and role of serum and glucocorticoid-regulated kinase 2 in the regulation of Na⁺/H⁺ exchanger 3 in the mammalian kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;299(6):F1496-506.
313. Lang F, Cohen P. Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ*. 2001;2001(108):re17.
314. Funder J. Mineralocorticoids and cardiac fibrosis: the decade in review. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001;28(12):1002-6.
315. Lapenna D, de Gioia S, Ciofani G, Mezzetti A, Uchino S, Calafiore AM, et al. Glutathione-related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1998;97(19):1930-4.
316. Wang Y-XJ, Ulu A, Zhang L-N, Hammock B. Soluble epoxide hydrolase in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2010;12(3):174-83.
317. Liu H, Li X, Yang Q, Miao W, Qi S, Song X, et al. [COX-2 and mPGES-1 expression in carotid atherosclerotic plaques]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi Chin J Med Genet*. 2007;24(4):453-6.
318. Yehuda H, Szuchman-Sapir A, Khatib S, Musa R, Tamir S. Human atherosclerotic plaque lipid extract promotes expression of proinflammatory factors in human monocytes and macrophage-like cells. *Atherosclerosis*. 2011;218(2):339-43.
319. Stemme V, Swedenborg J, Claesson H, Hansson GK. Expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic carotid arteries. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg*. 2000;20(2):146-52.

320. Uzui H, Harpf A, Liu M, Doherty TM, Shukla A, Chai N-N, et al. Increased expression of membrane type 3-matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque: role of activated macrophages and inflammatory cytokines. *Circulation*. 2002;106(24):3024-30.
321. Parri M, Pietrovito L, Grandi A, Campagnoli S, De Camilli E, Bianchini F, et al. Angiopoietin-like 7, a novel pro-angiogenic factor over-expressed in cancer. *Angiogenesis*. 2014;17(4):881-96.
322. Troelsen LN, Garred P, Christiansen B, Torp-Pedersen C, Christensen IJ, Narvestad E, et al. Double role of mannose-binding lectin in relation to carotid intima-media thickness in patients with rheumatoid arthritis. *Mol Immunol*. 2010;47(4):713-8.
323. Risom L, Lundby C, Thomsen JJ, Mikkelsen L, Loft S, Friis G, et al. Acute hypoxia and reoxygenation-induced DNA oxidation in human mononuclear blood cells. *Mutat Res*. 2007;625(1-2):125-33.
324. Gertow K, Nobili E, Folkersen L, Newman JW, Pedersen TL, Ekstrand J, et al. 12- and 15-lipoxygenases in human carotid atherosclerotic lesions: associations with cerebrovascular symptoms. *Atherosclerosis*. 2011;215(2):411-6.

ANEXO I: Datos de la Historia Clínica recogidos para cada paciente incluido en el estudio.

CÓDIGO	
NOMBRE	
APELLIDO 1	
APELLIDO 2	
Nº HISTORIA	
FECHA DE CUMPLIMENTACIÓN	
FECHA DE NACIMIENTO	
SEXO	
EDAD	
FUMADOR	SI - NO
ENFERMEDAD SISTEMA NERVIOSO	SI - NO
ENFERMEDAD PSIQUIÁTRICA.	SI - NO
ENFERMEDAD CORONARIA	SI - NO
ATEROSCLEROSIS	SI - NO
ENFERMEDAD RENAL	SI - NO
ENFERMEDAD REUMÁTICA	SI - NO
ASMA	SI - NO
EPOC	SI - NO
DIABETES MELLITUS 1	SI - NO
DIABETES MELLITUS 2	SI - NO
HIPERTENSION ARTERIAL (HTA)	SI - NO
NEOPLASIA PREVIA	SI - NO
TRATAMIENTO CON:	
ESTROGENOS	SI - NO
ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINE)	SI - NO
ACIDO ACETILSALICILICO (AAS)	SI - NO
ESTATINAS	SI - NO
ANTIAGREGANTES PLAQUETARIOS (CLOPIDOGREL, TRIFUSAL)	SI - NO
ANTICOAGULANTES (ACENOCUMAROL= SINTROM® Y/O HEPARINA DE BAJO PESO MOLECULAR)	SI - NO
SÍNTOMAS NEUROLÓGICOS:	SI - NO
Accidente isquémico transitorio	SI - NO
Accidente cerebrovascular agudo (ACV)	SI - NO
Amaurosis fugax	SI - NO
PRUEBAS DE IMAGEN	SI - NO CUAL:
TIPO DE INFARTO ISQUÉMICO	HEMISFÉRICO - LACUNAR
TIEMPO DE EVOLUCIÓN DESDE ISCTUS HASTA INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA (DÍAS)	
GRADO DE ESTENOSIS (MEDIDO POR ECOGRAFÍA-DOPPLER)	50-69% - 70% o más